

2009

ESTABELECIMENTO DE CONDIÇÕES ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS ESTRÓGENOS EM ÁGUA POTÁVEL DISTRIBUÍDA NA CIDADE DE SÃO LUÍS-MA



Raphael Teixeira Verbinnen

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO EM QUÍMICA

São Luís - MA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO EM QUÍMICA

**ESTABELECIMENTO DE CONDIÇÕES ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO
DE HORMÔNIOS ESTRÓGENOS EM ÁGUA POTÁVEL DISTRIBUÍDA NA
CIDADE DE SÃO LUÍS-MA**

RAPHAEL TEIXEIRA VERBINNEN

Profa. Dra. GILVANDA SILVA NUNES (orientadora)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Química.

São Luís-MA
abril/2009

RAPHAEL TEIXEIRA VERBINNEN

**ESTABELECIMENTO DE CONDIÇÕES ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO
DE HORMÔNIOS ESTRÓGENOS EM ÁGUA POTÁVEL DISTRIBUÍDA NA
CIDADE DE SÃO LUÍS-MA**

Dissertação de Mestrado defendida por Raphael Teixeira Verbinnen e aprovada em 28 de abril de 2009 pela banca examinadora constituída por:

Profa. Dra. Gilvanda Silva Nunes (orientadora)
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Profa. Dra. Eny Maria Vieira
Instituto de Química de São Carlos - USP

Profa. Dra. Teresa Cristina Rodrigues dos Santos Franco
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Àqueles que me compreendem e me
incentivam na busca de meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Várias foram as pessoas que contribuíram e participaram, mesmo que inconscientemente, para a realização desta conquista. Citar os nomes e registrá-los em documento de relevante importância como este, é um pequeno gesto de agradecimento, diante do sentimento que esta palavra sintetiza. Porém, àqueles que porventura não sejam aqui citados, tenham certeza que foi por traquinagem da minha memória, porque o reconhecimento por sua contribuição e o sentimento de gratidão persistem em minha emoção. Meus agradecimentos a:

Familiares: Raphaelle, Cecilma, Christian, Cenidalva, Hailton, Rozilândia, Janaína, avô Hamilton (*em memória*) e avó Cecília, tios, tias, primos e primas, pela educação, incentivo e compreensão dos meus vários momentos ausentes do convívio familiar em detrimento da dedicação ao curso de mestrado.

Profa. Dra. Gilvanda Nunes, por ter aceitado me orientar, recolhendo-me no NARP/UFMA, pela orientação sempre concisa, por confiar no meu trabalho e pela oportunidade de fazer-me descobrir novos horizontes.

Demais conviventes da UFMA: Profa. Dra. Teresa Cristina, Profa. Dra. Aldaléa Marques, Profa. Dra. Cristina Lacerda, Prof. Dr. Auro Tanaka, Prof. Dr. José Wilson, Prof. Dr. Marlus Rolemberg, Prof. Dr. Edmar Marques, Prof. Dr. Hildo, pelos conhecimentos transmitidos; e os amigos Verônica, Rosivalda, Thiessa, Virgínia, Gilvan, Álvaro. Especialmente a Gilvan, parceiro de trabalhos e uma boa surpresa em minha vida.

Amigos da CAEMA: Selísio Freire, Lenimar, Nazareth, Iranaldo e Daniel pelo incentivo e apoio; a Rubem Brito, George Aragão, Wilson Andrade e Durval Nascimento, ex-diretores da CAEMA, que por entenderem a importância do desenvolvimento profissional garantiram minha participação no curso de mestrado; e Emília, Ana Luiza, Odnea e Edmeé que me auxiliaram e incentivaram em busca desta conquista.

Profa. Dra. Eny Vieira, que tão bem me recebeu e me conduziu durante minha estada no IQSC, além da prontidão em me atender nas orientações acadêmicas; e Vanessa por sua receptividade e competência em me auxiliar nas questões administrativas do IQSC/USP.

Prof. Dr. Vitor Paccos, pelo incentivo e pelos esclarecimentos e orientações para a validação do método.

Membros (alunos, profissionais atuais e egressos) do Laboratório de Cromatografia (CROMA/IQSC), que tive a oportunidade de conhecer, pela receptividade e companheirismo durante o XII COLACRO.

Amigos: Renata, Eliane, Daniela, Luciana, Yandra, Ricardo (Cabelo), Guilherme, Sérgio, William e Daniel, com os quais tive o prazer de conviver, por um período de 4 meses, no Laboratório de Química Analítica Aplicada a Medicamentos e a Ecossistemas Aquáticos e Terrestres do IQSC-USP. Especialmente à Renata e ao Ricardo (Cabelo) pelo incentivo e momentos de esclarecimentos, de descontração e de trabalho compartilhados.

Nádia Torres, que tão bem me recebeu no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) em Piracicaba, pelas informações e auxílios prestados.

Amigos do Maranhão que reencontrei em São Carlos-SP: Quésia, Ulisses, Maikon, Márcio, Manoel e Benedito, por terem me recebido muito bem, pelos momentos de descontração, e especialmente aos dois primeiros pela bicicleta e colchão emprestados e pela hospedagem.

UFMA e Coordenação de Pós-graduação em Química (CPGQUIM), pela oportunidade de cursar o mestrado, e pelos esclarecimentos, lembretes e informações do próprio curso e do mundo acadêmico.

CAPES que, por meio do projeto submetido ao Programa de Cooperação Acadêmica (PROCAD 2008), oportunizou-me vivenciar o ambiente acadêmico da USP-São Carlos e conhecer os amigos que lá fiz.

“Todo método fornece uma resposta. O melhor detector é seu cérebro. Não se deixe escravizar e não se torne piloto de equipamento.”

*Prof. Dr. Reinaldo C. de Campos – PUC-RJ
Durante encerramento do EspeQBrasil 2008*

PARA REFLETIR...

*“O **déficit de água**, produto da modificação ambiental cujo processo encontra-se acelerado, atinge a higidez humana não somente pela sede, principal consequência da escassez de água, mas também por doenças e queda de produção de alimentos, o que gera **tensões sociais e políticas** que, por sua vez, **podem acarretar guerras.**”*

WREGE APUD MORAES E JORDÃO

RESUMO

Diante da percepção do homem sobre a necessidade de se preservar o ambiente e da busca incessante pelo desenvolvimento sustentável, hoje a proteção das fontes de água natural é de longe um dos fatores mais preocupantes para a conservação da vida. Além dos poluentes aquáticos mais comuns, existem também os chamados poluentes emergentes, que nas últimas décadas vêm sendo detectados em função do aprimoramento de métodos e técnicas de detecção. Estes envolvem principalmente os micropoluentes orgânicos, que por sua vez apresentam os desreguladores endócrinos (DEs) como principal grupo. Dentre os DEs, os hormônios sexuais esteróides, naturais e sintéticos, têm significativa importância, devido ao seu uso diário na medicina, em terapias de reposição e métodos contraceptivos, o que tem provocado o contínuo lançamento em esgotos sanitários. Várias são as consequências do efeito destas substâncias, dentre elas: diminuição da fertilidade, ocorrência de cânceres diversos e perturbações no desenvolvimento e na homeostase de organismos. Os esgotos sanitários e industriais, além da lixiviação de campos de agricultura adubados com lodo proveniente de estações de tratamento de esgotos (ETEs) são as principais fontes de contaminação. Este trabalho possibilitou a separação cromatográfica dos hormônios estriol (E3), 17 β -estradiol (E2), estrona (E1) e 17 α -etinilestradiol (EE2) em tempo relativamente curto (16,5 min), utilizando como fase móvel a mistura acetonitrila:água (ACN:H₂O), em modo gradiente, fluxo de 1 mL min⁻¹, λ = 280 nm e temperatura de 27 °C. O método foi desenvolvido em dois laboratórios, envolvendo dois instrumentos diferentes. Foram testados 4 procedimentos e 2 adsorventes de extração em fase sólida (C₁₈ e OPT). O método de preparo da amostra, incluindo a descloração e o procedimento de EFS, com cartucho C₁₈ resultou em valores de recuperação dentro dos limites considerados adequados. O método desenvolvido foi validado segundo as orientações do “Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos” publicado pela ANVISA, tomando-se por base os procedimentos para os métodos bioanalíticos, os quais foram adaptados para este estudo. O método foi, então, aplicado na análise dos hormônios naturais (17 β -estradiol, estrona e estriol) e o sintético (17 α -etinilestradiol) em água potável distribuída na cidade de São Luís. Para as amostras analisadas, não foram identificados picos referentes às substâncias de interesse, portanto pode-se afirmar que estas foram encontradas em concentrações inferiores aos limites de detecção e de quantificação do método.

Palavras-chave: Hormônios estrógenos. CLAE-DAD. Abastecimento de água. São Luís.

ABSTRACT

Given the humanity perception of necessity to preserve the environment and the incessant search for sustainable development, today the preservation of natural water sources is by far one of the most worrying factors for the preservation of life. Besides the most common aquatics pollutants, also there is one called emerging pollutants, which in recent decades have been detected due the technological advances. These involve mainly the organic micropollutants, which present the endocrine disrupters (ED's) main group. Among the ED's, the natural and synthetic sex steroids hormones have significant importance because their daily use in medicine, in the replacement therapy and contraceptive methods, which has contributed to the continuous release in domestic sewage. There are several consequences of this effect, including fertility declining, occurrence of various cancers and disorders in the development and homeostasis of organisms. The domestic and industrial sewage and leaching from agricultural fields fertilized with sludge from sewage treatment plants (STP's) are the main sources of contamination. This study allowed the chromatographic separation of the hormones estriol (E3), 17 β -estradiol (E2), estrone (E1) and 17 α -ethynylestradiol (EE2) in relatively short duration (16,5 minutes), using the acetonitrile:water (ACN: H₂O) mixture as mobile phase in gradient mode, constant flow of 1 mL min⁻¹, injection volume of 20 μ L, λ = 280 nm and temperature of 27 °C. The method was developed in two laboratories, involving different instruments. Four procedures and two adsorbents (C₁₈ e OPT) of SPE were tested. The sample preparation method, including dechlorination and the SPE procedure with C₁₈ cartridge, resulted in the recovery values within the acceptable limit. The developed method was validated according to guidelines of the ANVISA's Guide for Validation, and bioanalytical methods was adapted for this study. The method was then applied in the analysis of the natural (17 β -estradiol, estrone and estriol) and the synthetic (17 α -ethynylestradiol) hormone in drinking water from the city of São Luís. Peaks were not identified for the substances studied, probably substances concentrations below the limits of detection and quantification of the method were found.

Keywords: Estrogen hormones. HPLC-DAD. Water supply. São Luís.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias de entrada de desreguladores endócrinos hormonais em sistemas aquáticos...	17
Figura 2. Estrutura molecular dos hormônios estrógenos analisados e do colesterol.....	23
Figura 3. Ciclo e rota de exposição de hormônios estrógenos.	27
Figura 4. Principais etapas empregadas em EFS visando à retenção do analito.	31
Figura 5. Situação geográfica do município de São Luís, na Ilha do Maranhão, Estado do Maranhão.	35
Figura 6. Bacia Hidrográfica do Itapecuru. No detalhe as divisões entre os cursos Alto, Médio e Baixo.....	37
Figura 7. Dimensão do Parque Estadual do Bacanga, São Luís, Maranhão.	38
Figura 8. Organograma da estrutura do Ministério da Saúde.....	41
Figura 9. Espectros de absorção na região do UV dos hormônios estrógenos estudados. No detalhe, ampliação do sinal na faixa de 240 a 350 nm	61
Figura 10. Picos dos analitos sobrepostos. Em azul cromatograma do branco (MeOH). Condições: FM ACN:H ₂ O (60:40) em modo isocrático, fluxo de 1 mL min ⁻¹ , modo isocrático, λ = 210 nm e corrida de 20 min	63
Figura 11. Superposição dos cromatogramas obtidos para MeOH (em azul), E3 (em marrom), E2 (em vermelho), EE2 (em verde) e E1 (em rosa). Condições: FM ACN:H ₂ O (50:50) em modo isocrático, fluxo de 1 mL min ⁻¹ , λ = 280 nm e corrida de 12 min.	63
Figura 12. Superposição dos cromatogramas obtidos para MeOH (em azul), E3 (em marrom), E2 (em vermelho), EE2 (em verde) e E1 (em rosa). Condições: FM ACN:H ₂ O (40:60) em modo isocrático, fluxo de 1 mL min ⁻¹ , modo isocrático, λ = 280 nm e corrida de 23 min	64
Figura 13. Superposição dos cromatogramas obtidos para MeOH (em azul), E3 (em marrom), E2 (em vermelho), EE2 (em verde) e E1 (em rosa). Condições: FM MeOH:H ₂ O (40:60) em modo isocrático, fluxo de 1 mL min ⁻¹ , modo isocrático, λ = 280 nm e corrida de 25 min	65
Figura 14. Cromatograma da solução-padrão mista dos hormônios estrógenos, na concentração 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cada composto (FM ACN:H ₂ O, em gradiente, fluxo de 1 mL min ⁻¹ , volume de injeção de 20 μL , λ = 280 nm, temp. = 27 °C).....	66
Figura 15. Comparação de cromatogramas (FM ACN:H ₂ O, em gradiente, fluxo de 1 mL min ⁻¹ , volume de injeção de 20 μL , λ = 280 nm, temp. = 27 °C): A) solução-padrão 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$; B) amostra- testemunha não-fortificada, e C) sobreposição dos cromatogramas A (azul) e B (vermelho)	67

Figura 16. Curvas analíticas (do equipamento), individuais para cada estrógeno. Condições cromatográficas: FM ACN:H ₂ O (gradiente), fluxo de 1 mL min ⁻¹ , volume de injeção de 20 µL, λ = 280 nm, temp. = 27 °C	68
Figura 17. Comparação dos valores de recuperação entre adsorventes C ₁₈ e OPT (polimérico), para os quatro procedimentos de extração (P-1, P-2, P-3 e P-4). As linhas vermelhas correspondem ao valor máximo (120%) e mínimo (70%) aceitos para análises de resíduos.....	70
Figura 18. Comparação de cromatogramas de amostras-testemunhas, fortificadas com 2,5 µg L ⁻¹ de cada estrógeno (FM ACN:H ₂ O, em gradiente, fluxo de 1 mL min ⁻¹ , volume de injeção de 20 µL, λ = 280 nm): A) amostra-testemunha contendo cloro residual; B) amostra-testemunha desclorada com Na ₂ S ₂ O ₅ ; e C) sobreposição dos cromatogramas A (azul) e B (vermelho), em comparação com um cromatograma de uma mistura dos padrões a 1000 µg L ⁻¹ cada (verde).....	72
Figura 19. Sobreposição de cromatogramas, mostrando a não ocorrência de interferentes no t _R dos analitos. Em azul, amostra não-fortificada (branco) e, em vermelho, solução-padrão mista a 3 mg L ⁻¹ . Condição usada: ACN:H ₂ O, em gradiente, fluxo de 1 mL min ⁻¹ , volume de injeção de 20 µL, λ = 280 nm, temp. ambiente ~ 28 °C.....	74
Figura 20. Avaliação do volume de ruptura, mediante aplicação do procedimento P-2, com cartucho C ₁₈ e 3 µg de cada substância.	76
Figura 21. Curvas analíticas do método individuais para cada estrógeno. Condições cromatográficas: FM ACN:H ₂ O (gradiente), fluxo de 1 mL min ⁻¹ , volume de injeção de 20 µL, λ = 280 nm, temp. ambiente = 27 °C.....	77
Figura 22. Flutuação dos desvios padrão relativos calculados a partir das áreas obtidas na construção das curvas analíticas. As regiões em destaque representam a faixa de valores adequados	78
Figura 23. Fluxograma do método analítico otimizado para determinação dos hormônios estrógenos E3, E2, E1 e EE2 em água potável	81
Figura 24. Sobreposição dos cromatogramas das 5 amostras analisadas e da amostra-testemunha fortificada em nível baixo (CQB).....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais características dos estrógenos.	23
Tabela 2. Concentrações de estrogênios no afluente e no efluente de ETEs, e em água superficial e potável de vários países.	29
Tabela 3. Alguns métodos analíticos empregados na determinação de estrogênios em águas naturais ou tratadas.....	33
Tabela 4. Padrões utilizados no desenvolvimento do estudo.	45
Tabela 5. Procedimentos de EFS pesquisados para uso no método	50
Tabela 6. Volume, concentrações e massa das soluções empregadas para determinação do volume de ruptura.	54
Tabela 7. Parâmetros cromatográficos para a condição: ACN:H ₂ O, em gradiente, fluxo de 1 mL min ⁻¹ , volume de injeção de 20 µL, λ = 280 nm, temp. = 27 °C	66
Tabela 8. Curvas analíticas, coeficientes de regressão e limites de detecção e de quantificação do equipamento.....	68
Tabela 9. Parâmetros cromatográficos para a condição ACN:H ₂ O, em modo gradiente, fluxo de 1 mL min ⁻¹ , volume de injeção de 20 µL, λ = 280 nm, temp. ambiente = 27 °C	75
Tabela 10. Curvas analíticas, coeficientes de regressão e limites de detecção e de quantificação do método	78
Tabela 11. Resultados de recuperação, precisão e exatidão obtidos para cada hormônio estrógeno em três níveis de fortificação e cinco repetições (n=5).....	79
Tabela 12. Identificação das amostras coletadas para análise de E1, E2, EE2 e E3	81
Tabela 13. Níveis usados no controle de qualidade durante aplicação do método.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	acetonitrila
ACT	acetona
BSTFA	bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida
CG	cromatografia a gás
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
C ₁₈	octadecilsilano
DAD	detector de arranjo de diodos
DCM	diclorometano
DE	desreguladores endócrinos
DTE	ditioeritrol
E1	estrone
E2	17 β -estradiol
E3	estriol
EE2	17 α -etinilestradiol
EFS	extração em fase sólida
EM	espectrômetro de massas
ETA	Estação de Tratamento de Água
EtOAc	acetato de etila
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
FL	fluorescência
Hex	hexano
IQSC	Instituto de Química de São Carlos
LD	limite de detecção
LIQ	limite inferior de quantificação
LQ	limite de quantificação
MeOH	metanol
MSTFA	N metil N (trimetilsilil) trifluoroacetamida
NARP	Núcleo de Análises de Resíduos de Pesticidas
PEB	Parque Estadual do Bacanga
PNRH	Plano Nacional de Recursos Hídricos
RSD	desvio-padrão relativo
SPE	solid phase extraction
temp	temperatura
TMSI	trimetilsilil imidazol
t _{calc}	valor de “t” de Student calculado
t _R	tempo de retenção
t _{tab}	valor de “t” de Student tabelado
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
USP	Universidade de São Paulo
UT	unidade de turbidez
UV	ultravioleta
VTG	vitelogenina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	20
2.1 Geral	20
2.2 Específicos	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 Poluição dos recursos hídricos	21
3.2 Hormônios estrógenos.....	22
3.2.1 Características físicas e químicas.....	24
3.3 Sistema endócrino e sua desregulação.....	25
3.4 Estrógenos e a poluição ambiental.....	26
3.5 Análise de estrógenos em água.....	29
3.5.1 Extração em fase sólida (EFS).....	31
3.5.2 Métodos de análises	32
3.6 Local de estudo	34
3.6.1 Fontes de captação de água.....	35
3.6.1.1 Rio Itapecuru.....	36
3.6.1.2 Reservatório do Batatã	37
3.6.2 Estação de tratamento de água (ETA).....	39
3.6.2.1 ETA do Sistema Italuís.....	39
3.6.2.2 ETA do Sistema Sacavém	40
3.7 Validação de métodos e o Sistema Nacional de Vigilância Ambiental em Saúde	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Material utilizado	45
4.1.1 Solventes e soluções.....	45
4.1.2 Demais materiais	46
4.1.2.1 Extração em fase sólida	46
4.1.2.2 Separação cromatográfica.....	46
4.1.3 Equipamentos.....	46
4.1.3.1 Universidade de São Paulo	46
4.1.3.2 Universidade Federal do Maranhão	47
4.2 Preparo e armazenamento de soluções.....	47
4.3 Coleta, transporte e preparo de amostras.....	48
4.4 Otimização das condições cromatográficas.....	51
4.5 Linearidade, curva analítica, LD e LQ.....	52
4.6 Seletividade da separação cromatográfica	53
4.7 Volume de ruptura	54
4.8 Validação do método desenvolvido	55

4.8.1 Limite inferior de quantificação (LIQ), limite de detecção (LD) e seletividade do método.....	55
4.8.2 Curva analítica e linearidade.....	56
4.8.3 Precisão.....	57
4.8.4 Exatidão.....	57
4.8.5 Ensaio de recuperação.....	57
4.8.6 Controle de qualidade.....	58
4.9 Aplicação do método	58
4.10 Destinação dos resíduos gerados durante a pesquisa	59
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 Seleção do comprimento de onda (λ) dos analitos.....	61
5.2 Desenvolvimento de método para análise de hormônios estrógenos	62
5.3 Condições cromatográficas para análise de estrógenos	65
5.4 Experimentos realizados no IQSC/USP	67
5.4.2 Linearidade, curva analítica, LD e LQ do equipamento	68
5.4.3 Eficiências dos procedimentos de EFS e seleção do método analítico	69
5.4.4 Descloração.....	71
5.5 Experimentos realizados na UFMA.....	74
5.6 Verificação de interferentes	74
5.7 Volume de ruptura.....	75
5.8.1 Curva analítica, linearidade, LD e LIQ	77
5.9 Método desenvolvido para análise de hormônios estrógenos	80
5.10 Aplicação do método desenvolvido e validado na determinação de resíduos de hormônios estrógenos em água potável distribuída na cidade de São Luís	81
6 CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS.....	85
ANEXOS.....	92

1 INTRODUÇÃO

O uso de águas superficiais para o consumo humano, como também de seus mananciais como receptores de esgotos sanitários, tratados ou não, têm sido os principais motivos de preocupação acerca da contaminação das fontes de água (RODRIGUEZ-MOZAZ, ALDA e BARCELÓ, 2004).

Em 1999, a água já era reconhecida como recurso mundialmente escasso, seja por limitações quantitativas, em função de condições climáticas, por exemplo, seja por limitações qualitativas, fruto da poluição. No Brasil, as regiões Sul e Sudeste enfrentam problemas de escassez de água, principalmente devido à poluição originária das intensas atividades agroindustriais. As condições climáticas na região Nordeste são as principais responsáveis pela baixa disponibilidade hídrica (PEREIRA, 1999).

Apesar de ser enquadrado na Região Nordeste, o Maranhão, em sua maioria, é coberto pela vegetação de floresta, refletindo transição entre o Nordeste semi-árido e a Amazônia úmida. É, portanto, o Estado nordestino que menos se identifica com uma das principais características dessa região: a escassez de recursos hídricos. Com efeito, o Maranhão é detentor de rede hidrográfica abundante, com pelo menos dez bacias perenes. Contudo, em 1997, o desenvolvimento implantado na região, embora relativamente tardio, já apresentava impactos ambientais e sociais (MONTES, 1997).

A questão se agrava observando o aumento da demanda por água oriunda do crescimento populacional e de atividades econômicas (PEREIRA, 1999).

O aumento de sensibilidade na detecção de poluentes químicos e seus efeitos biológicos, com o advento de novos métodos, têm chamado a atenção da comunidade científica para os contaminantes que anteriormente não eram detectados ou considerados de risco. Estes são denominados contaminantes emergentes, os quais têm uso no dia-a-dia e ainda não são regulamentados como poluentes pela legislação (ALDA et al, 2003).

Sendo os micropoluentes orgânicos os principais representantes dos contaminantes emergentes, estes se constituem de substâncias que podem causar efeitos adversos nos sistemas em que são inseridos, mesmo em baixas concentrações, até na ordem de nanogramas por litro. Dentre os milhares de compostos deste grupo, os desreguladores endócrinos (DEs) vêm se destacando em importância (REIS FILHO, ARAÚJO e VIEIRA, 2006).

Os primeiros registros sobre os efeitos dos DEs surgiram na década de 1980, quando foram observadas mudanças de comportamento em animais selvagens, tanto nos EUA (REIS FILHO, ARAÚJO e VIEIRA, 2006), quanto no Reino Unido (GOMES, SCRISHAW e

NESTER, 2003). Os DEs são definidos como substâncias exógenas capazes de causar efeitos adversos à saúde do organismo, levando a disfunções endócrinas, diminuição da fertilidade, por exemplo, inclusive a seu primogênito. Constituem uma classe de substâncias que são definidas por seus efeitos biológicos e não pela natureza química. Portanto, uma variedade de poluentes, incluindo pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, ftalatos, dioxinas, furanos, alquilfenóis e esteróides sintéticos são consideradas substâncias de ação endócrino-desreguladora (ALDA e BARCELÓ, 2000; AERNI et al, 2004).

As principais fontes destes poluentes em corpos hídricos são os esgotos sanitários e industriais lançados sem tratamento ou mesmo após este, como também as áreas de agricultura que utilizam lodo ativado, oriundo de estação de tratamento de esgoto (ETE), como condicionador de solo (REIS FILHO, ARAÚJO e VIEIRA, 2006). A Figura 1 representa esquematicamente as principais vias de entrada dos desreguladores endócrinos em ambientes aquáticos.

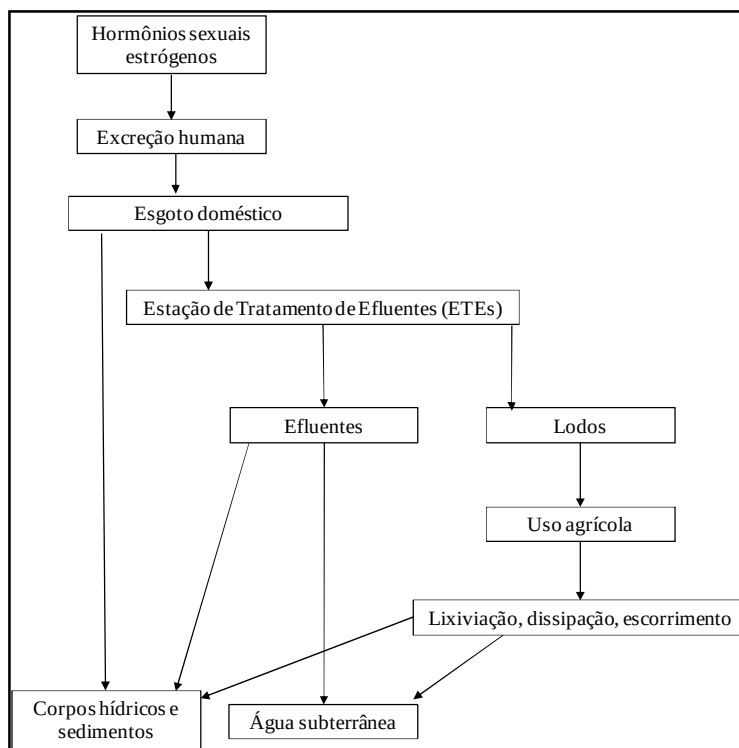


Figura 1. Vias de entrada de desreguladores endócrinos hormonais em sistemas aquáticos.
Fonte: Reis Filho, Araújo e Vieira (2006).

Em seu trabalho de mestrado, Araújo (2006) apresenta vários estudos que demonstraram relacionamento de DEs com diversos distúrbios do organismo humano. Assim, em nível de sistema reprodutor, podem aparecer cânceres de testículos e de mamas,

infertilidade, irregularidade menstrual, aborto espontâneo e anomalias em bebês; em nível de sistema nervoso, podem surgir distúrbios nas diversas funções cerebrais responsáveis pelos controles homeostáticos e fisiológicos, além da leitura, da emoção e da memória

Este mesmo autor relata também que, em ambientes aquáticos poluídos, foram identificados peixes machos com características sexuais femininas, uma vez que foi observada a presença de vitelogenina (VTG), proteína específica de ovíparos femininos, nos peixes estudados. Tal ocorrência foi relacionada à exposição a estrogênios em quantidade suficiente para induzir a biossíntese da proteína.

Dentre os variados compostos que evidenciam propriedades endócrino-desreguladoras, os hormônios sexuais femininos e os esteróides sintéticos são considerados os de maior poder estrogênico, pois têm capacidade de afetar peixes em concentrações menores que 1 ng L^{-1} , podendo ser encontrados no ambiente em concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} (ALDA e BARCELÓ, 2001; BILA e DEZOTTI, 2007).

Hormônios sexuais femininos – ou estrógenos – são substâncias consideradas de alta atividade biológica e têm sido associados à etiologia de vários cânceres. Infelizmente, tais substâncias têm sido continuamente introduzidas no ambiente. Por exemplo, o estrógeno sintético 17α -etinilestradiol (EE2), amplamente usado na medicina em terapias de reposição e métodos contraceptivos, e os naturais estrona (E1), 17β -estradiol (E2) e estriol (E3) são considerados como responsáveis pela maioria dos efeitos desreguladores desencadeados pela disposição inadequada de esgoto sanitário (REIS FILHO, ARAÚJO e VIEIRA, 2006; ARAÚJO, 2006; JOHNSON e WILLIAMS, 2004).

Tendo em vista que estradiol é o principal e mais potente estrogênio natural ovariano biologicamente ativo, seguido de seus metabólitos estrona e estriol, respectivamente o segundo e o terceiro em potência de atividade; considerando que etinilestradiol é o hormônio estrogênio sintético mais comumente usado em contraceptivos orais e o que possui maior persistência (REIS FILHO, ARAÚJO e VIEIRA, 2006; ALDA e BARCELÓ, 2000; JOHNSON e WILLIAMS, 2004; RODRIGUEZ-MOZAZ, ALDA e BARCELÓ, 2004); que há baixo índice de tratamento de esgotos no Brasil, e principalmente na Região Nordeste (PROGRAMA DE MODERNIZAÇÃO..., 2005; REIS FILHO, BARREIRO, VIEIRA e CASS, 2007), e considerando ainda, o fato de que os tratamentos de água potável mais comuns, os ditos convencionais, são geralmente pouco eficientes na remoção destes poluentes (BILA e DEZOTTI, 2007), torna-se evidente a importância em se estudar a presença destes químicos em água potável.

No Brasil, pesquisadores da Unicamp revelaram, em dezembro de 2006, a presença de hormônios sexuais no Rio Atibaia, principal manancial da região, que abastece 92% do município de Campinas-SP (SIMIONATO, 2006). Em 2007, publicaram artigo com detalhes deste estudo. Nele, dentre os poluentes estudados, os níveis mais elevados de 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol, que chegaram a 2,51 e 0,31 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, foram determinados a jusante da cidade de Campinas, evidenciando contaminação do corpo hídrico (SODRÉ et al, 2007).

A água potável distribuída na cidade de São Luís, MA, possui diferentes fontes de captação de água, dentre estas, o rio Itapecuru e o Reservatório do Batatã, principais fornecedores de água superficial. O rio Itapecuru, ao longo de seus mais de 1.400 Km de comprimento, recebe efluentes gerados por cerca de 3 milhões de pessoas (SILVA et al, 2005). Já o Batatã recebe impactos antrópicos gerados por mais de 40 mil pessoas (PINHEIRO JÚNIOR et al, 2007). Portanto, é possível imaginar a carga poluidora recebida por estes corpos hídricos que fornecem a água que é consumida por grande parte dos moradores da cidade de São Luís, MA, após a potabilização.

No município de São Luís, MA, ainda não há estudos voltados para a detecção destes contaminantes orgânicos em águas destinadas ao consumo humano, e o presente trabalho pode ser considerado pioneiro. Trata, portanto, do desenvolvimento de uma metodologia analítica rápida e simples para análise dos hormônios sintéticos mais comumente utilizados, e que podem ser encontrados nestes tipos de amostras.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver e estabelecer condições analíticas para determinação de hormônios femininos naturais (17β -estradiol, estrona e estriol) e sintético (17α -etinilestradiol), em amostras de água potável distribuída na cidade de São Luís, MA, e aplicá-la em estudos de verificação da eficiência do tratamento de água convencional na remoção destas substâncias, consideradas desreguladoras endócrinas.

2.2 Específicos

- a) Desenvolver um método de separação cromatográfica dos compostos 17β -estradiol, estrona, estriol e 17α -etinilestradiol, empregando o sistema de cromatografia a líquido acoplada a detecção por arranjo de diodos – CLAE-DAD;
- b) Determinar a eficiência do procedimento de extração e purificação dos extratos obtidos de água potável, mediante a realização de ensaios de recuperação, empregando amostras fortificadas, extração em fase sólida (EFS) e detecção final por CLAE-DAD;
- c) Validar o método analítico através da otimização de figuras de mérito como: linearidade, limites de detecção e de quantificação, repetitividade, etc.;
- d) Determinar a concentração dos hormônios em amostras de água potável distribuída em São Luís, e
- e) Obter valores de referência para medir possíveis mudanças por contaminação, no futuro.

3 REVISÃO DE LITERATURA

As atividades antrópicas de urbanização, agricultura, pecuária, indústria e outras, vêm ocasionando sérios problemas ambientais. As substâncias usadas nas atividades agropastoris são lançadas nos rios, e podem ocasionar a contaminação de organismos aquáticos, que acabam por servir de alimentação aos seres humanos, o que pode provocar sérios riscos à saúde (FALONE, 2007).

Há poucas regiões no mundo ainda livres dos problemas da perda de fontes potenciais de água doce, da degradação na qualidade da água e da poluição das fontes de superfície e subterrâneas. Os problemas mais graves que afetam a qualidade da água de rios e lagos decorrem, em ordem variável de importância, segundo as diferentes situações, principalmente de esgotos sanitários, de controles inadequados dos efluentes industriais, do desmatamento, da agricultura migratória sem controle e de práticas agrícolas deficientes (MORAES e JORDÃO, 2002).

3.1 Poluição dos recursos hídricos

A preocupação da humanidade em relação às fontes de água torna-se cada vez maior. Diante da percepção do homem da necessidade de se preservar o ambiente, além da busca incessante por desenvolvimento sustentável, hoje a preservação das fontes de água natural é, de longe, um dos fatores mais preocupantes para a preservação da vida.

No Brasil, com a adoção de diversas iniciativas, por parte da sociedade civil, e de políticas públicas, nota-se maior preocupação em relação à causa, embora esta ainda seja insuficiente para provocar ações largamente eficazes. O Plano Nacional de Recursos Hídricos (PNRH) é fruto da Política Nacional de Recursos Hídricos, a qual bem conceitua a importância da qualidade da água, visto que, dentre seus objetivos, consta “assegurar à atual e às futuras gerações a necessária disponibilidade de água, em padrões de qualidade adequados aos respectivos usos” (art. 2, cap. II, tit. I, Lei n. 9.433/97).

O PNRH, na seção referente à qualidade da água superficial, conclui que uma das principais fontes que alteram a qualidade das águas do país, e principal problema observado em todas as regiões hidrográficas, são os esgotos sanitários, sendo mais crítico nas regiões metropolitanas (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2006).

Pesquisa realizada com os gestores ambientais dos municípios brasileiros, revelou que, dentre as causas para a poluição da água, o despejo de esgoto sanitário é a principal (75%), seguido do uso de agrotóxicos e de fertilizantes na agricultura (43%), dos resíduos oriundos

da criação de animais (39%) e da disposição inadequada de resíduos sólidos (39%). Tal quadro não se constitui em resultado inesperado, pois, em âmbito nacional, o principal problema de qualidade da água é o lançamento de esgotos sanitários, já que apenas 47% dos municípios brasileiros possuem rede coletora de esgoto, e somente 18% dos esgotos recebem algum tratamento. Ademais, percebe-se que, embora seja em muitos casos mais perceptível a poluição em centros urbanos, a zona rural também é atingida, pois das quatro causas previamente apresentadas, duas são tipicamente de áreas mais urbanizadas e duas de áreas rurais (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2006).

Assim, em se tratando de desreguladores endócrinos, precisamente de hormônios estrógenos, cuja principal via de contaminação das águas são os esgotos sanitários, pode-se imaginar o nível de exposição a que consumidores de água potável estão sujeitos. Deste modo, observa-se que as fontes de captação de água passíveis de potabilização são continuamente contaminadas com despejos in natura de grande proporção, e considera-se o fato de que os tratamentos de água potável mais comuns e ditos convencionais são geralmente pouco eficientes na remoção destes poluentes (BILA e DEZOTTI, 2007).

Lobato (2008), consultor para elaboração de documento apresentado ao Fórum de Águas da América, listou as questões mais importantes, relacionadas à água na América do Sul, tanto os atuais como os potenciais. Entre os principais problemas estão: o crescimento da urbanização, com consequente aumento da demanda de água; o aumento da deterioração da qualidade de água; o aumento da quantidade de efluentes superficiais, além do incremento de resíduos sólidos. Estas foram, portanto, as questões apontadas como fatores importantes na superposição de áreas de pobreza, na degradação ambiental e na ausência de infra-estrutura sanitária.

Contudo, a implantação de programas para superação destes processos tem de quebrar barreiras, tais como, a falta de financiamento e investimento, a insuficiência de recursos humanos capacitados e a falta de acesso à tecnologia adequada (LOBATO, 2008).

3.2 Hormônios estrógenos

Hormônios são substâncias que derivam de diversas classes de moléculas biológicas, podendo ser uma proteína, um colesterol, um aminoácido ou um ácido graxo. São mensageiros químicos que, através da corrente sanguínea, veiculam informação entre diferentes tipos de tecidos e células, os quais identificam os hormônios através de receptores específicos, localizados no núcleo das células, que são especializados no reconhecimento

molecular. A partir desta interação hormônio-receptor é que ocorrem as respostas biológicas específicas (GREENSPAN e GARDNER, 2004; REIS FILHO, ARAÚJO e VIEIRA, 2006; NOGUEIRA, 2003).

No caso dos esteróides (ou esteróides sexuais), estes são produzidos a partir do colesterol (Figura 2) e podem ser classificados em três grupos principais: hormônios sexuais femininos (ou estrógenos); hormônios sexuais masculinos (ou andrógenos) e hormônios da gravidez (ou progestógenos) (GREENSPAN e GARDNER, 2004; REIS FILHO, ARAÚJO e VIEIRA, 2006; NOGUEIRA, 2003).

O estrógeno sintético 17 α -etinilestradiol (EE2), amplamente usado na medicina em terapias de reposição e métodos contraceptivos, e os naturais estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e estriol (E3), são considerados os responsáveis pela maioria dos efeitos desreguladores, desencadeados pela disposição inadequada de efluentes, pois estes hormônios possuem a melhor conformação reconhecida pelos receptores. A Figura 2 mostra a estrutura química das substâncias estudadas, e a Tabela 1 apresenta algumas de suas características.

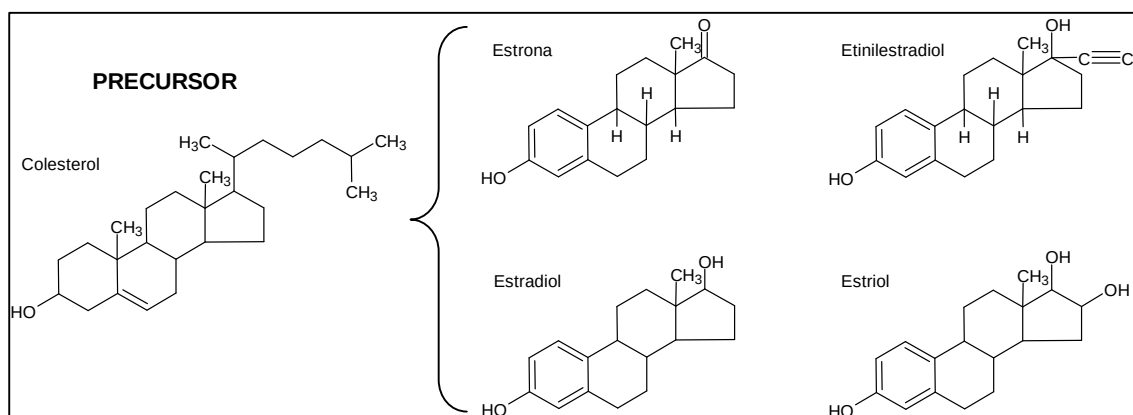


Figura 2. Estrutura molecular dos hormônios estrógenos analisados e do colesterol.

Tabela 1. Principais características dos estrógenos.

Substância	Fórmula molecular ^a	Massa molar (g mol ⁻¹) ^b	γ_{sat} (mg L ⁻¹ , a 25 °C) ^a	log K _{ow}	Pressão de vapor (mm Hg) ^a	K _{oc} ^a
estriol	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	288,4	13,25	2,45 ^a – 2,81 ^b	6,7 x 10 ⁻¹⁵	1944
17 β-estradiol	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272,4	12,96	3,94 ^b - 4,01 ^a	2,3 x 10 ⁻¹⁰	3300
17 α-etinil-estradiol	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296,4	4,83	3,67 ^a – 4,15 ^b	4,5 x 10 ⁻¹¹	4770
estrona	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270,4	12,42	3,13 ^a – 3,43 ^b	2,3 x 10 ⁻¹⁰	4882

γ_{sat} : solubilidade em água; K_{ow}: coeficiente de partição octanol-água;

K_{oc}: constante de sorção em carbono orgânico.

Fonte: ^a Reis Filho, Araújo e Vieira (2006) e ^b Ying; Kookana e Ru (2002).

3.2.1 Características físicas e químicas

Observando-se a Tabela 1, percebe-se que o estrógeno sintético EE2 tem solubilidade em água cerca de três vezes menor que os estrógenos naturais. Ao contrário, os esteróides naturais apresentam valores de partição octanol-água ($\log K_{ow}$) menores que o sintético EE2. Ademais, todas as substâncias apresentam baixos valores de pressão de vapor. De modo geral, nota-se que as substâncias estudadas são hidrofóbicas e de baixa volatilidade, indicando tendência à sorção em solo e sedimentos, o que pode significar baixa concentração de estrógenos na fase aquosa, conforme afirma Ying e colaboradores (2002).

Entretanto, conforme citação de Reis Filho e co-autores (2006), estudos realizados por Bowman e colaboradores (2003) concluíram que, embora as partículas influenciem no comportamento ambiental dos estrógenos, a sorção é relativamente limitada, permanecendo primariamente em associação com a fase aquosa. Holthaus et al. (2002) apud Lopes (2007) corroboram com esta assertiva, ao afirmar que sedimentos suspensos são responsáveis pela remoção de quantidade menor que 1% dos estrogênios presentes na coluna d'água. A adsorção ocorre preferencialmente nas primeiras 24 horas de contato, sendo maior para os hormônios com maior coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) e para as partículas de menor tamanho.

Contrariamente, Lai et al (2000) afirmam que os estrógenos podem rapidamente adsorverem-se na superfície dos sólidos em suspensão, indicando a competição com outras substâncias mais hidrofóbicas por sítios de ligação. A respectiva saturação destes sítios e a quantidade de carbono orgânico total (COT) presente na água, além da salinidade desta, são fatores responsáveis pela proporção de estrógenos que permanecem na fase aquosa.

Igual modo, Schäfer et al (2003) apud Lopes (2007) afirmam que o potencial de adsorção de tais substâncias em argilas é inicialmente insignificante, sendo melhorado quando a argila encontra-se associada à matéria orgânica, atingindo valores máximos próximos a 20%.

Segundo D'Agostinho e Flues (2006), K_{oc} é o coeficiente de partição do contaminante na fração orgânica do solo, ou seja, competição entre solo-água corrigido pela matéria orgânica do solo. Portanto, pode-se esperar preferência dos estrógenos por sedimentos ricos em carbono orgânico e que, dentre as substâncias em estudo, estrona e estriol apresentam maior e a menor afinidade a carbono orgânico, respectivamente.

Observando que a matriz de estudo é água potável, entende-se que neste caso as substâncias estrogênicas estudadas encontram-se, se não na sua totalidade, na maior parte

solubilizadas em água, pois esta ao ser potabilizada passa por etapas de remoção de material orgânico (coagulação, floculação, decantação e filtração). Além disto, deve apresentar baixíssima quantidade de partículas em suspensão, qualidade imprescindível à água potável e exigida legalmente no Art. 12 da Portaria MS nº 518/2004 (BRASIL, 2005), quando limita o parâmetro turbidez ao valor máximo de 1 UT (unidade de turbidez) em 95% das análises e nunca superior a 5 UT.

3.3 Sistema endócrino e sua desregulação

O sistema endócrino é um mecanismo complexo que usa hormônios liberados por glândulas endócrinas para coordenar e regular a comunicação entre as células, sendo responsável por funções biológicas, como reprodução, desenvolvimento embrionário, crescimento, metabolismo e homeostase (GREENSPAN e GADNER, 2004; REIS FILHO, ARAÚJO e VIEIRA, 2006, LINTELMANN et al, 2003).

Glândulas endócrinas são órgãos que, internamente ao organismo, secretam certo tipo de hormônio com ação específica sobre dado tipo de célula ou tecido. Estes órgãos são assim chamados por não possuírem dutos, usando a corrente sanguínea para o transporte dos hormônios (GUIMARÃES, 2005; GREENSPAN e GARDNER, 2004).

Em função da forma como são transmitidos e recebidos pelas células-alvo, são genericamente diferenciados dois tipos de hormônios presentes nos animais: os de origem protéica, que dependem de receptores para exercerem alguma ação sobre as células, e os hormônios esteróides, que além de não dependerem de receptores, suas dimensões e lipofilicidade favorecerem ações intracelulares (NOGUEIRA, 2003).

O sistema endócrino também se relaciona de maneira complexa com os sistemas imunológico e nervoso. O hipotálamo, por exemplo, centro nervoso localizado abaixo do cérebro, controla as quantidades de hormônios secretadas pelas demais glândulas, estas por sua vez estão sujeitas a complexos mecanismos que regulam: a ação dos receptores; a síntese, a liberação, o transporte e o metabolismo dos hormônios; bem como o acesso destes ao interior das células-alvo (GUIMARÃES, 2005; GREENSPAN e GARDNER, 2004).

A desregulação deste sistema ocorre quando interferentes endócrinos imitam, bloqueiam ou provocam colapso dos hormônios essencialmente esteróides, ou seja, que derivam do colesterol. Por sua vez, os hormônios protéicos estão mais resguardados deste fenômeno, pois a atuação destes é bem mais complexa. Ela pode estar associada a qualquer uma das etapas de regulação hormonal, acarretando reposta fraca ou forte e por fim resultando em um sinal

irregular ao organismo (NOGUEIRA, 2003; GHISELLI e JARDIM, 2007; LINTELMANN et al, 2003).

Quando o desregulador imita a ação do hormônio aguardado pelo receptor, o sinal ao organismo é ampliado, sendo o fenômeno denominado de efeito agonista. No caso contrário, em que o receptor é bloqueado, impedindo a interação hormônio-receptor e resultando em redução ou anulação do estímulo ao organismo, têm-se o efeito antagonista (NOGUEIRA, 2003; LINTELMANN et al, 2003).

Ainda segundo Nogueira (2003), natureza, concentração, tipo de interação, tempo de exposição, fatores genéticos, idade e sexo, entre outros, são os principais fatores influenciadores da desregulação endócrina.

3.4 Estrógenos e a poluição ambiental

Diversos autores têm proposto diferentes definições para desregulador endócrino. Os termos hoje empregados no Brasil resultam da tradução para o português, feita por diferentes pesquisadores. Desta forma, podem ser encontradas as seguintes denominações: perturbadores endócrinos, disruptivos ou disruptores endócrinos, desreguladores endócrinos, interferentes endócrinos, estrogênios ambientais, dentre outras (BILA e DEZOTTI, 2007; REIS FILHO, ARAÚJO e VIEIRA, 2006; GHISELLI e JARDIM, 2007).

Em comum, todos entendem tratar-se de substâncias capazes de interferir no funcionamento natural do sistema endócrino de espécies animais, incluindo os seres humanos. Esta é a razão pela qual tais substâncias são mundialmente denominadas “endocrine disruptors” (EDs) ou ainda “endocrine disrupting compounds or chemicals” (EDCs). Estas substâncias podem ser de origem antrópica, também denominadas xenoestrogênios, ou de origem natural, os fitoestrogênios (GHISELLI e JARDIM, 2007).

Portanto, constituem classe de substâncias que são definidas por seus efeitos biológicos e não pela natureza química. Nela insere-se uma variedade de poluentes, incluindo pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, ftalatos, dioxinas, furanos, alquilfenóis e esteróides sintéticos e naturais que são consideradas substâncias de ação endócrino-desreguladora (ALDA e BARCELÓ, 2000; AERNI et al, 2004).

As principais fontes para aporte dos hormônios femininos, considerados de maior potencial desregulador, nos corpos hídricos, são os esgotos sanitários e industriais lançados sem ou mesmo após tratamento, como também as áreas de agricultura que utilizam lodo ativado, oriundo de estação de tratamento de esgoto (ETE), como condicionador de solo

(REIS FILHO, ARAÚJO e VIEIRA, 2006).

Paralelamente, em função da pecuária no Brasil ser significativa, convém considerá-la também como fonte de hormônios para o ambiente. O aumento da população mundial acompanhado pelo aumento da necessidade de produção de alimentos promove crescimento na produção animal, que faz com que a sua contribuição para a contaminação ambiental por estrogênios seja relevante (LOPES, 2007).

Diante da problemática de contaminação ambiental por estrógenos, notadamente dos compartimentos aquáticos que servem de fonte de captação de água para o abastecimento público, há consideráveis possibilidades de contaminação também da água potável. A Figura 3 representa, esquematicamente, a rota de exposição de hormônios estrógenos, evidenciando o ciclo a que o ambiente e os organismos estão expostos.

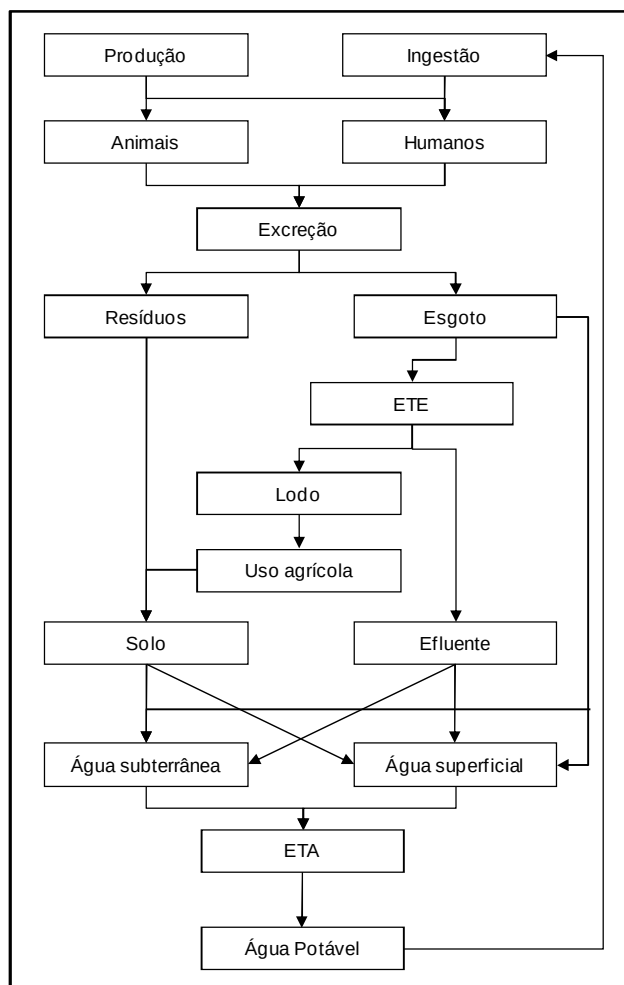


Figura 3. Ciclo e rota de exposição de hormônios estrógenos.
Fonte: Adaptado de Reis Filho, Araújo e Vieira (2006) e Lopes (2007).

É importante ressaltar que a persistência da atividade dos estrogênios ocorre em decorrência de serem continuamente introduzidos no ambiente. Estudos relatam que até 40% das doses ministradas de estrógenos sintéticos podem ser disponibilizadas para o ambiente (REIS FILHO, ARAÚJO e VIEIRA, 2006).

Grande parte dos estrógenos é metabolizada pelo fígado, o que auxilia na manutenção do equilíbrio hormonal por meio da decomposição do estrógeno e de outros hormônios esteróides, a fim de permitir sua excreção na forma inativa, conjugada como glucuronídeos e sulfatos. Curiosamente, a ação de enzimas produzidas por bactérias comumente encontradas em áreas de despejo de efluentes, ETEs por exemplo, prontamente os biotransformam em compostos biologicamente ativos e passíveis de desencadear efeitos deletérios (REIS FILHO, ARAÚJO e VIEIRA, 2006; GUIMARÃES, 2005; PANTER et al, 1999).

Os hormônios então são excretados através da urina e fezes, seguindo para a rede coletora de efluentes, até atingir o ambiente, notadamente algum corpo hídrico. Portanto, o lançamento de efluentes, com ou sem tratamento, é a principal via de contaminação do ambiente aquático, seja pelo déficit de infra-estrutura em saneamento, seja pela ineficiência (tecnológica e/ou operacional) das estações de tratamento (REIS FILHO, ARAÚJO e VIEIRA, 2006).

Algumas rotas de degradação para estas substâncias têm sido propostas, sendo alguns intermediários e subprodutos identificados, enquanto outros foram propostos mecanisticamente. Ohko et al (2002) apud Bila (2005) identificaram a molécula de 10 ϵ -17 β -dihidroxi-1,4-estradieno-3-ona (DEO) como sendo o subproduto da degradação do 17 β -estradiol por meio da fotocatalise. Huber et al (2004) apud Bila (2005), fazendo uso da ozonização, identificaram o ácido adípico; o ácido 1-hidroxi-ciclopentanocarboxílico; o ceto aldeído; o ácido 2-hidroxiheptanodióico e o ácido hidroxíciclohexanocarboxílico, como sendo subprodutos da degradação do 17 α -etinilestradiol.

Contudo, mesmo com o potencial risco à saúde apresentado por estas substâncias, atualmente não há legislação que as regule como poluentes ambientais. Entretanto, a agência norte-americana de regulamentação Food and Drug Administration (FDA), recomendou, já no ano de 2003, a não utilização de hormônios estrógenos em terapia de reposição hormonal como forma de prevenção de doenças cardíacas (ROZENFELD, 2007), tendo em vista que estudos mostraram não haver prevenção destas, além de aumentar o risco de derrame cerebral.

3.5 Análise de estrógenos em água

Na Tabela 2, encontram-se as concentrações de hormônios estrógenos informadas por alguns autores para esgoto “in natura” (afluente de ETEs), esgoto tratado (efluente de ETEs), água superficial e água potável.

Tabela 2. Concentrações de estrogênios no afluente e no efluente de ETEs, e em água superficial e potável de vários países.

Origem	Estrógenos (ng L ⁻¹)				Fonte
	17 β -estradiol	estrone	estriol	17 α -etinilestradiol	
<i>Afluente de ETE</i>					
Canadá	15	41	250	-	Lee e Peart (1998)
Itália	12	52	80	3,0	Baronti et al (2000)
Brasil (Rio de Janeiro)	21	40	-	-	Ternes et al (1999)
Alemanha	15	27	-	-	Ternes et al (1999)
Brasil (Campinas)	6.700	4.800	-	5.800	Ghiselli (2006)
<i>Efluente de ETE</i>					
Canadá	< 5	14	30	-	Lee e Peart (1998)
Itália	1,0	9,3	-	0,45	Baronti et al (2000)
Brasil (Rio de Janeiro)	< 1	7	-	-	Ternes et al (1999)
Holanda	0,9	4,5	-	< LD ^a	Belfroid et al (1999)
Alemanha	< 1	9	-	1	Ternes et al (1999)
Inglaterra	10	76	-	4,3	Desbrow et al (1998)
Brasil (Campinas)	5.600	4.100	-	5.000	Ghiselli (2006)
<i>Água superficial</i>					
Alemanha	3,6	4,1	-	5,1	Kuch e Ballschmiter (2001)
Holanda	-	0,3	-	-	Belfroid et al (1999)
Inglaterra	-	-	-	2 a 15	Aherne e Briggs (1989)
Brasil (Campinas) ^b	6.000	5.000	-	3.500	Ghiselli (2006)
Brasil (Campinas) ^b	< LD ^c	-	-	< LD ^c	Sodré et al (2007)
Espanha	< 2,5	22	< 2,5	< 2,5	Rodriguez-Mozaz et al (2004)
EUA	< 0,1	< 0,3	-	-	Boyd et al (2003)
Israel	-	-	8,8	6,1	Barel-Cohren (2006)
<i>Água potável</i>					
Alemanha	2,1	0,6	-	0,50	Kuch e Ballschmiter (2001)
Inglaterra	-	-	-	< 1 a 4	Aherne e Briggs (1989)
Brasil (Campinas)	2.600	< 1.059	-	1.900	Ghiselli (2006)
Espanha	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	Rodriguez-Mozaz et al (2004)
EUA	< 0,1	< 0,3	-	-	Boyd et al (2003)
Brasil (Jaboticabal) ^d	6,8	< LD ^e	-	-	Lopes (2007)

^a LD: 0,3 a 1,8 ng L⁻¹; ^b Captação do rio Atibaia; ^c LD: 5 ng L⁻¹; ^d Análise de água filtrada, antes da cloração;

^e LD: 0,3 μ g L⁻¹

Fonte: Adaptado de Lopes (2007).

Observando nesta mesma tabela os resultados encontrados por Ghiselli (2006), relativos a 17 β -estradiol, estrone e etinilestradiol, percebe-se que os valores são bem maiores que os apresentados pelos demais autores. Ainda acompanhando os mesmos resultados ao longo da tabela, é possível perceber que na cidade de Campinas, desde o afluente de ETE até a água potável, houve decréscimo dos poluentes quantificados. Imaginando o ciclo da água no sistema de saneamento de uma cidade, onde a água potável descartada em uma residência,

segue até a ETE (afluente); após o tratamento (efluente) é lançada em um corpo hídrico, como rio (água superficial) por exemplo; a partir do qual a água é captada e, após tratamento em ETA, é distribuída para o consumo humano (água potável), fechando, assim, o ciclo, pode-se inferir que, mesmo após a passagem do esgoto e da água pelos processos de tratamento de esgoto (ETE) e de água (ETA), respectivamente, a concentração encontrada em água potável ainda foi significativa.

De modo geral, observa-se que quase todos os resultados estão na faixa de algumas unidades ou poucas dezenas de ng L^{-1} , com exceção dos encontrados por Lee e Peart (1998), que encontraram 250 ng L^{-1} de estriol em afluente de ETE no Canadá, e por Ghiselli (2006), cujos achados foram surpreendentemente superiores, chegando à faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$.

É importante citar que os resultados de eficiência de remoção dos estrógenos inferidos na Tabela 2, não são comparáveis, pois as técnicas de tratamento de esgotos sanitários e de água aplicados a cada estudo certamente foram diferentes. Além destes, outros fatores podem acarretar resultados diferentes, tais como o período e o ponto de amostragem para execução das análises. O que pode ser notado, observando-se os resultados encontrados por Ghiselli (2006) e Sodré et al (2007), percebe-se a discrepância entre os valores, embora tenham pesquisado na mesma região.

No Brasil, todas as publicações encontradas, relativas a hormônios estrógenos em água e no meio ambiente, remetem a estudos realizados nos Estados de São Paulo (Região Metropolitana de Campinas, Araraquara e Jaboticabal) e Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Niterói, Resende, Três Rios e Campos).

O trabalho de Ghiselli (2006) teve como área de estudo a Região Metropolitana de Campinas (RMC), mais precisamente a sub-bacia do Rio Atibaia, com diferentes pontos de coleta de amostra, dentre os quais o ponto de captação de água para abastecimento público de 95% da população campineira. A RMC, em 2005, contava com pouco mais de 2,5 milhões de habitantes. É uma região de destaque nacional por ser o mais importante espaço econômico do interior do Estado de São Paulo, apresentando grande atividade econômica, principalmente nos setores agrícola e industrial (SÃO PAULO, 2007). Portanto, pode-se esperar que os corpos hídricos das proximidades sofram grande impacto, como é comum em regiões metropolitanas.

Comparativamente, dentre os pontos de captação de água superficial para o abastecimento de água da cidade de São Luís, o Rio Itapecuru é o principal deles, abastecendo cerca de 60% dos ludovicenses, o qual conta, em sua bacia, com cerca de 3 milhões de habitantes, porém, com atividade industrial muito pequena em relação a RMC. Contudo, as

atividades agropecuaristas e o grande número populacional da área são potenciais fontes das substâncias pesquisadas no presente trabalho.

3.5.1 Extração em fase sólida (EFS)

O princípio da EFS envolve a partição dos compostos de interesse entre um líquido (eluente) e uma fase sólida (sorvente ou adsorvente), permitindo a pré-concentração e purificação de analitos da solução por sorção (Figura 4). A primeira aplicação experimental da EFS ocorreu há cerca de 50 anos atrás, contudo o crescimento do desenvolvimento desta técnica como alternativa à extração líquido-líquido no pré-tratamento de amostras teve início apenas em meados da década de 1970. Ultimamente tem sido largamente usada na pré-concentração de micropoluentes orgânicos em água, embora esta técnica também tenha apresentado potencial para estudos de especiação (CAMEL, 2003).

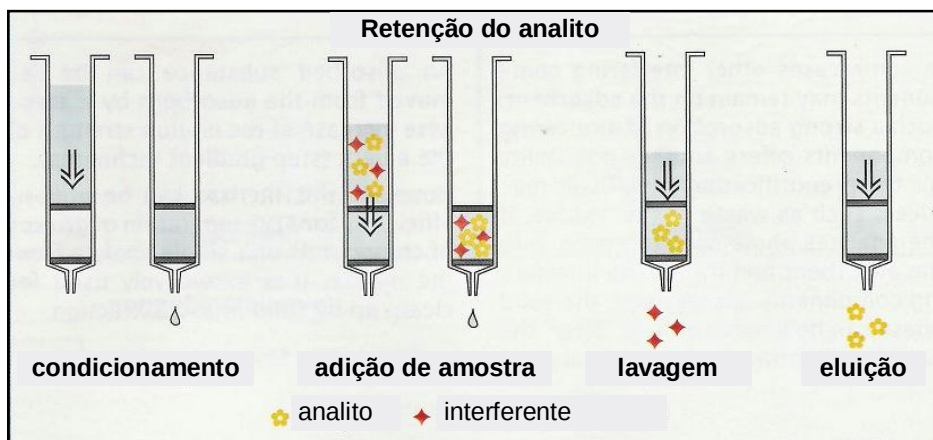


Figura 4. Principais etapas empregadas em EFS visando à retenção do analito.
Fonte: Adaptado de Solid Phase Extraction... (2008).

A EFS consiste em 3 ou 4 etapas sucessivas (Figura 4). Primeiro, a fase sólida deve ser condicionada, usando-se um solvente apropriado, seguido pelo mesmo solvente dos analitos. Por exemplo, deve-se usar água desionizada como solvente, no caso em que as substâncias de interesse encontram-se em amostra aquosa. Esta etapa é de suma importância, pois permite o embeбimento do sorvente e a solvatação dos grupos funcionais, além de remover do material do cartucho, possíveis impurezas inicialmente presentes. Ademais, remove o ar presente no empacotamento da fase sólida, preenchendo espaços vazios. Tipicamente, para sorventes de fase reversa (C_{18} , por exemplo), metanol é frequentemente usado, seguido de água ou solução aquosa de um tampão. Deve-se ter o cuidado de não deixar a fase sólida secar, pois nesta

situação os analitos poderão não ser suficientemente retidos, o que diminui o percentual de recuperação (CAMEL, 2003; LANÇAS, 2004).

A segunda etapa é a percolação ou adição da amostra através da fase sólida, em volume que pode variar de 1 mL a 1 L, de modo quantitativo. O fluxo da amostra deve ser baixo o suficiente para permitir boa retenção das substâncias de interesse, porém suficientemente alto de modo a evitar excessiva duração do procedimento (CAMEL, 2003; LANÇAS, 2004).

A terceira etapa (opcional) é a lavagem da fase sólida com um solvente apropriado, que apresenta baixa força de eluição, para eliminar componentes da matriz retidos, sem remover os analitos de interesse. A secagem do cartucho também é necessária, especialmente para matrizes aquosas, a fim de eliminar traços de água, pois estes, em alguns casos, podem dificultar a subsequente concentração das substâncias de interesse e/ou a análise (CAMEL, 2003; LANÇAS, 2004). Estes casos podem ser quando o procedimento contempla uma etapa de eliminação do solvente de eluição, mediante o uso de um gás inerte; ou quando a análise ocorrerá mediante uso de CG, técnica em que a umidade é um interferente de relevante importância.

Araújo (2006) relata que uma secagem insuficiente pode manter os analitos hidratados, dificultando a interação do solvente de eluição com os analitos, e, conseqüentemente, diminuindo o valor de recuperação do analito.

Ao contrário da etapa anterior, a última consiste na eluição das substâncias de interesse por um solvente apropriado, sem, no entanto, remover componentes da matriz retidos. O volume de solvente utilizado deve ser ajustado de modo que a recuperação quantitativa seja alcançada com baixa diluição. Recomenda-se que o volume do solvente seja fracionado em duas alíquotas, sendo que antes da eluição deve-se encharcar o sorvente com o solvente. Nesta etapa, o fluxo também deve ser ajustado.

3.5.2 Métodos de análises

A complexidade das matrizes ambientais e as baixas concentrações dos micropoluentes constituem desafios para a análise química destas substâncias. Portanto, é de substancial importância o tratamento das amostras, de modo a concentrar e a isolar as substâncias-alvo de matrizes que normalmente são complexas (ALDA et al, 2003).

A análise de hormônios estrógenos em águas é de difícil realização, e geralmente utiliza, para o preparo das amostras, EFS, além de filtração, evaporação e, em alguns casos, derivatização. Para a determinação destas substâncias têm-se empregado cromatografia a gás

(CG) e CLAE, geralmente acoplados a espectrômetro de massas (EM), ou apenas com detectores de ultravioleta (UV), fluorescência (FL) e eletroquímicos (Tabela 3) (REIS FILHO, ARAÚJO e VIEIRA, 2006; BILA, 2005).

Nogueira (2003) indicou métodos biológicos para a determinação de estrogênios em amostras complexas, notadamente imunoensaios, tal como “Enzyme Linked Receptor Assay” (ELRA), “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) e “Radio Immuno Assay” (RIA), além do uso de biossensores. Embora estes métodos sejam rápidos, sensíveis e específicos, e muitas vezes pouco onerosos, são também suscetíveis a equívocos na identificação das substâncias, devido aos efeitos de matriz, que podem levar a falsos-positivos.

Os métodos descritos na literatura, na maioria das vezes, são baseados na extração e preparo das amostras que podem incluir a purificação da amostra, concentração e/ou derivatização e finalmente a quantificação das substâncias.

Tabela 3. Alguns métodos analíticos empregados na determinação de estrogênios em águas naturais ou tratadas.

Referência	Volume da amostra (L)	Analito ¹	Técnica	Cartucho	Condição-namento	Eluente	Lavagem	Deriva-tização
Belfroid et al (1999)	1	E2, E1, EE2 e E2-G	CG/EM/EM	SDB-XC (disco), C ₁₈ , NH ₂	ACT, MeOH	MeOH	-	Reagente Sil A
Ternes et al (1999)	1	E1, E2, EE2 e outros	CG/EM/EM	C ₁₈	Hex, ACT, MeOH H ₂ O pH 3	ACT	-	MSTFA ² , TMSI ³ , DTE ⁴
Kuch; Ballschmiter (2001)	2 ou 5	E1, E2, EE2 e outros	HRGC/ NCI/EM	Lichrolut EN	ACE, MeOH, H ₂ O pH 4	ACE, MeOH	-	KOH, PFBCI ⁵
Alda; Barceló (2001)	0,2	E2, E3, E1 e outros	CLAE/DAD	RP-18, HLB Oasis, HySphere, PLRP-S	ACN, MeOH, H ₂ O	ACN	-	-
Boyd et al (2003)	1	E1, E2 e outros	CG/EM	SDB-XC (disco)	MeOH, DCM, MeOH, H ₂ O	MeOH, DCM, MeOH	-	BSTFA ⁶
Rodríguez-Mozaz et al (2004)	0,5	E1, E2, EE2, E3 e outros	CL/ESI/EM	Lichrolut RP-18	MeOH, H ₂ O	MeOH	-	-
Ghiselli (2006)	1	E1, EE2, E2	CG/EM	Envi-18, Envi-Carb, HLB Oasis	EtOAc, DCM, MeOH, H ₂ O, H ₂ O pH 3	EtOAc, DCM, MeOH, ACT	-	-
Sodré et al (2007)	1	E1, E2, EE2 e outros	CLAE/ DAD/FL	HLB Oasis (PEDB ⁷)	MeOH, H ₂ O, H ₂ O pH 3	MeOH	-	-

¹ E2, 17 β -estradiol; E1, Estrona; EE2, Etinilestradiol; E2-G, 17 β -estradiol conjugado; E3, estriol.

² N metil N (trimetilsilil) trifluoroacetamida; ³ Trimetilsilil imidazol; ⁴ Ditioeritrol;

⁵ Cloreto de pentafluorobenzoila; ⁶ Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida; ⁷ Poliestireno-divinilbenzeno.

Na determinação de estrogênios, em amostras aquosas, os métodos analíticos publicados são freqüentemente baseados na extração por fase sólida (EFS), derivatização e detecção por CG/EM, CG/EM/EM ou CLAE/EM. A EFS é uma técnica de extração simples, rápida e que requer poucas quantidades de solventes. Freqüentemente são usados cartuchos ou discos de extração, comercialmente disponíveis, com uma variedade de adsorventes tais como, C₁₈, resina de copolímero poliestireno (ENV), sílica, alumina B, CN. A EFS não é só uma técnica de extração, mas também de concentração dos componentes.

Para facilitar a determinação dos estrogênios por CG, técnicas de derivatização são usadas. Para isso, diferentes agentes são empregados, predominantemente derivados sililizados, tais como, MTBFA (N-metil-N-tert-butildimetilsilil-trifluoroacetamida), MSTFA/TMSI/DTE (N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida / trimetilsililimidazola / ditioeritol), BSTFA (Bis-trimetilsililtrifluoroacetamida), PFB-TMS (pentafluorobenzil-trimetilsilil), MTBSTFA (N-metil-N-(tert-butildimetil trifluoroacetamida), PFPA (ácido pentafluoropropiônico), PFBFR-TMS (pentafluorobenzil bromado-trimetilsilil). Na determinação de estrogênios por cromatografia a líquido não há a necessidade de derivatização dos componentes presentes nas amostras.

3.6 Local de estudo

A cidade de São Luís é a capital do Estado do Maranhão, e está localizada na Ilha do Maranhão, que faz parte do Golfão Maranhense (Figura 4), onde se encontram diferentes ecossistemas, tais como manguezais, praias, dunas fixas e móveis, rios, entre outros. Esta região é tipicamente estuarina, onde deságuam afluentes de bacias de grandes rios. A leste da ilha encontra-se a Baía de São José, onde deságuam os rios Itapecuru e Munim. A oeste, a baía de São Marcos, onde deságuam os rios Mearim e Pindaré. Dadas as altas concentrações demográficas na região destas baías, ambas têm influência de atividades antropogênicas, não só da cidade de São Luís, como também das atividades portuárias, industriais e daquelas situadas ao longo das bacias hidrográficas destes rios (MMT PLANEJAMENTO E CONSULTORIA, 2007).

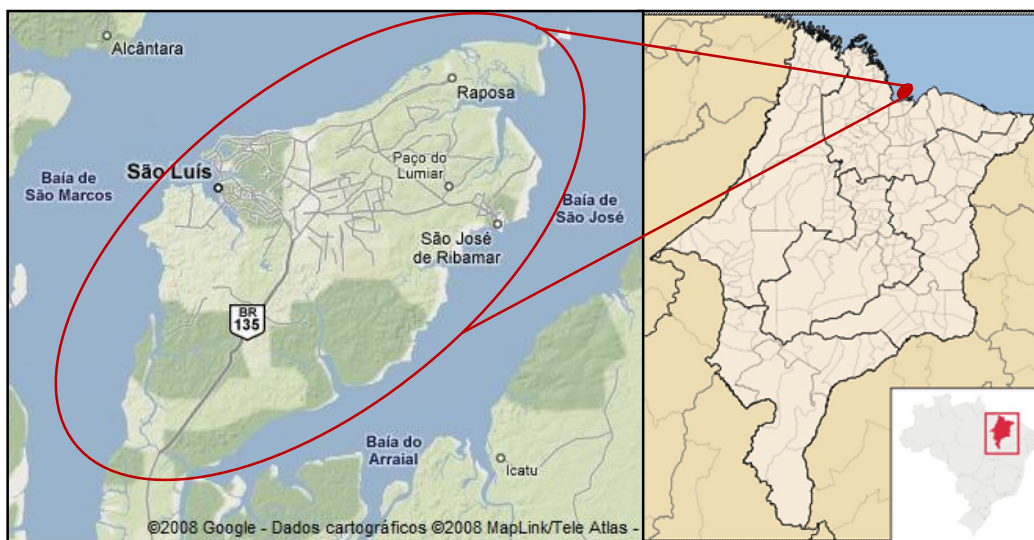


Figura 5. Situação geográfica do município de São Luís, na Ilha do Maranhão, Estado do Maranhão.

Fonte: Google Maps (2008) e Abreu (2006).

Como já discorrido nos tópicos anteriores, o ambiente e, principalmente, os sistemas aquáticos superficiais recebem continuamente lançamento de efluentes contendo, entre vários outros contaminantes, hormônios estrógenos. Portanto, aqui se pretende apresentar o cenário em que se encontram os mananciais¹, dos quais atualmente é captada a água de abastecimento público, distribuída na cidade de São Luís, Maranhão.

3.6.1 Fontes de captação de água

A cidade de São Luís é abastecida pelos seguintes sistemas: i) Sistema Produtor do Itapecuru, comumente denominado Italuís, localizado no Km 56 da BR-135, de onde capta água do Rio Itapecuru; ii) Sistema Sacavém, abastecido pelo Reservatório do Batatã, Rio do Prata e Riacho Mãe Isabel; iii) Sistema Olho D'Água, servido do Rio Jaguarema; iv) Sistema Cururuca, com captação no Rio Antônio Esteves, e v) Sistema Paciência, que conta com dois conjuntos de poços denominados Paciência I e II, além de outros poços isolados (INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL, 2007; SILVA et al, 2005a). Com exceção do Sistema Italuís, que comporta sua captação e ETA no município de Bacabeira, todos os demais situam-se na Ilha do Maranhão, distribuídos entre os municípios de São Luís e São José de Ribamar.

¹ Manancial: é relativo a fontes de água, superficiais ou subterrâneas, utilizadas para abastecimento humano e manutenção de atividades econômicas. Termo bastante usado por profissionais que trabalham no setor de saneamento.

No abastecimento de água da cidade de São Luís, em 2005, o sistema de poços profundos contribuíam com vazão de 2.580.032 m³/mês; o Sistema Sacavém, com vazão de 777.000 m³/mês, e o Sistema Italuís, com vazão de 4.742.444 m³/mês, este último correspondendo a cerca de 60% do total de água disponibilizada ao consumo humano (SILVA et al, 2005a).

Dentre os sistemas com captação de água superficial, o Italuís e o Sacavém são os responsáveis pelo abastecimento de água para a maior parte da população da cidade, portanto têm maior representatividade perante os demais.

3.6.1.1 Rio Itapecuru

A cidade de São Luís, desde 1983, tem grande parte do seu abastecimento de água dependente do Rio Itapecuru, pois naquele ano, com a inauguração do Sistema Italuís, iniciou-se a captação de água deste manancial superficial. Distantes aproximadamente 60 Km da capital do Maranhão, localizadas no município de Bacabeira, a captação e a estação de tratamento de água deste Sistema garantem o fornecimento de água potável à população de São Luís (SILVA et al, 2005b). Em 2005, este sistema já correspondia a cerca de 60% do total de água disponibilizada ao consumo humano (SILVA et al, 2005a).

De origem indígena, a palavra “itapecuru” significa “caminho da pedra grande”. O Rio Itapecuru nasce no complexo formado pelas serras de Crueiras, Itapecuru e Alpercatas, a cerca de 500 metros de altitude, na região dos limites dos municípios de Mirador, Grajaú e São Raimundo das Mangabeiras, e dentro do Parque Estadual do Mirador. Após percorrer cerca de 1.450 Km, deságua na Baía de São José, a leste da Ilha de São Luís (ALCÂNTARA, 2004; SILVA et al, 2005b).

Principal constituinte da sua bacia hidrográfica, o Rio Itapecuru, ao longo de seu percurso, recebe a contribuição de vários outros rios, que transmitem a ele suas características e materiais dispersos em seu leito. A bacia do Rio Itapecuru abrange uma área de 52.972,1 Km², correspondendo a cerca de 16% das terras do Maranhão (ALCÂNTARA, 2004). Em virtude principalmente de suas variações de altitude e vazão, o Rio é dividido em Alto, Médio e Baixo (Figura 5). O Alto Itapecuru é a região com menor densidade habitacional, entretanto apresenta as maiores áreas desmatadas, em grande parte devido à cultura da soja. Similarmente, o Médio Itapecuru também conta com grandes áreas descobertas como resultado principalmente da atividade agropastoril. Já o Baixo Itapecuru recebe grande

quantidade de esgotos sanitários, devido ao maior adensamento populacional (SILVA et al, 2005b).

Nesta área, estão localizadas 52 cidades, com população total estimada em 3 milhões de habitantes (ASSEMBLÉIA..., 2007b), das quais 11 estão localizadas às margens do Rio Itapecuru. Tal urbanização lateral tem sido a principal fonte de poluição hídrica, pois tanto o esgoto “in natura” como o lixo gerado por estas comunidades são lançados diretamente na calha do rio, sem tratamento algum (SILVA et al, 2005b).

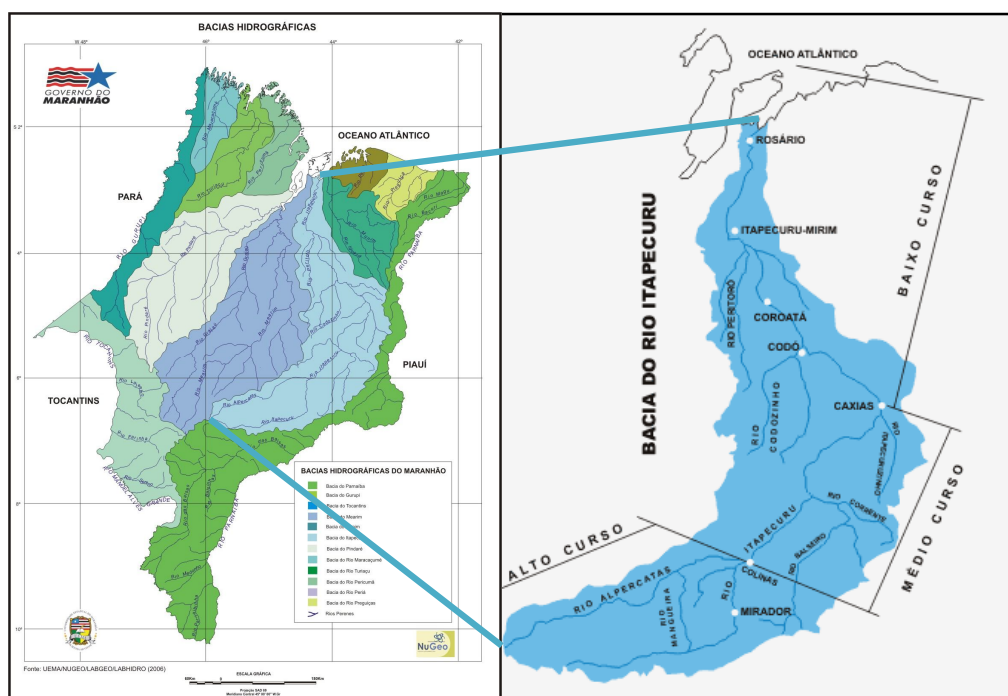


Figura 6. Bacia Hidrográfica do Itapecuru. No detalhe as divisões entre os cursos Alto, Médio e Baixo.

Fontes: Programa de Planejamento... (2006) e Assembléia... (2007a).

Silva et al (2005b) desenvolveram um estudo de campo com aplicação de 201 questionários a diferentes segmentos da população de seis cidades marginais do baixo curso do Rio Itapecuru. Em seus achados, constata-se que a precariedade ambiental do Rio Itapecuru é notória, pois a maioria dos entrevistados reconhece que o lixo e os esgotos lançados nas suas margens é o principal problema, o que de fato contrasta com o principal uso de suas águas que é para a dessedentação humana.

3.6.1.2 Reservatório do Batatã

Considerado de grande importância ao abastecimento de água da cidade de São Luís, o

Reservatório do Batatã foi, até 1983, antes do início da operação do Sistema Italuís, a principal fonte superficial de água para a população ludovicense. Manancial fornecedor de água para tratamento na ETA do Sacavém, em 2003 era responsável por 20% do abastecimento de água do município de São Luís (GOMES, 2006).

O Batatã encontra-se inserido no Parque Estadual do Bacanga (PEB), uma das únicas unidades de conservação da mata pré-amazônica, e que está localizada na área urbana de São Luís. Desta forma, os impactos que o Parque vem recebendo, ao longo dos anos, repercutem no Batatã, principalmente pela redução da capacidade de recarga de aquíferos ali existentes (GOMES, 2006).

O PEB (Figura 6) foi criado pelo governo do Estado do Maranhão, no ano de 1980, e ocupa área total de mais de 26 Km² do centro-oeste da Ilha do Maranhão, abrangendo parte da zona central do município de São Luís. Desta forma, encontra-se ladeado por zonas de forte pressão demográfica e do Distrito Industrial (PINHEIRO JÚNIOR et al, 2007).

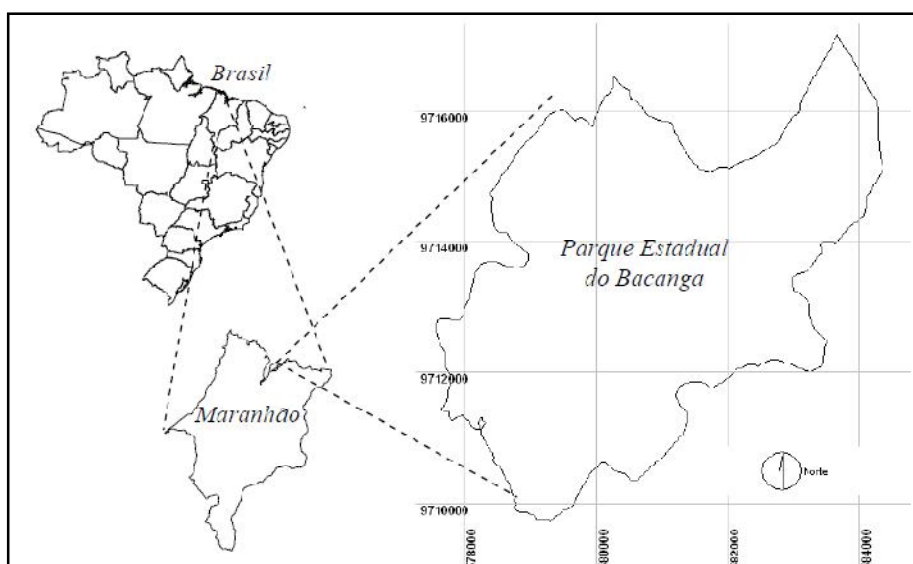


Figura 7. Dimensão do Parque Estadual do Bacanga, São Luís, Maranhão.
Fonte: Pinheiro Júnior et al (2007).

A importância do PEB reside no fato de servir para a manutenção de grande área verde e de mananciais na Ilha do Maranhão, contribuindo assim com a qualidade ambiental da cidade, principalmente por meio da conservação dos recursos hídricos locais, dentre os quais o Reservatório do Batatã e seus contribuintes (PINHEIRO JÚNIOR et al, 2007).

A funcionalidade do Parque, como Unidade de Conservação (UC), tem sido comprometida em função de diversas intervenções sofridas no decorrer dos anos. Sua área de

entorno, por exemplo, que é considerada área rural, de modo a permitir apenas atividades que não comprometam a integridade ambiental da UC, obteve, no período de 1991 a 2001, um incremento de mais de 42 mil habitantes (PINHEIRO JÚNIOR et al, 2007).

Além deste fator, a presença de núcleos populacionais no interior do PEB tem contribuído para a ocorrência de indicadores de agressão ambiental. Teixeira e Teixeira (2008) listaram, como principais fatores ambientais, nesta área: a secagem de córregos e brejos, formadores dos rios que ali se encontram, em razão da urbanização; a implantação de canais de esgotos lançados diretamente no rio sem nenhum tratamento; os lançamentos de esgotos sanitários “in natura” nas margens dos cursos d’água, com conseqüente elevado índice de coliformes fecais nas águas, e a poluição dos mananciais subterrâneos.

3.6.2 Estação de tratamento de água (ETA)

No Brasil, dentre as diversas técnicas de tratamento de água para abastecimento público existentes, destaca-se a conhecida como tratamento convencional ou, usando denominação mais recente, tratamento de ciclo completo e a filtração direta. As técnicas de tratamento de água distinguem-se em função dos processos e operações unitárias por elas empregadas. As etapas envolvidas, resumidamente, são a clarificação, a desinfecção, a fluoretação e a estabilização química (HELLER e PÁDUA, 2006).

A clarificação, responsável pela remoção de sólidos presentes na água, ocorre nos floculadores, decantadores e filtros. A desinfecção destina-se à inativação de microorganismos patogênicos e a fluoretação constitui-se na adição de flúor à água para prevenção da cárie dentária infantil. Por fim, a estabilização química é usada para o controle da corrosão e da incrustação em tubulações e concretos expostos à água. Portanto, tem caráter de proteção das instalações (HELLER e PÁDUA, 2006).

3.6.2.1 ETA do Sistema Italuís

A ETA do Sistema Italuís tem capacidade para 2.100 L s^{-1} , com possibilidade de ampliação para 3.100 L s^{-1} . O sistema de tratamento é do tipo ciclo completo, dotado das seguintes etapas: floculação, decantação, inter-cloração, filtração, pós-cloração, correção de pH e fluoretação. Após tratamento, a água é armazenada em reservatório apoiado (semi-enterrado) com capacidade de 4.500 m^3 . Deste reservatório, a água é recalçada para o sistema de distribuição que fica a cerca de 56 Km de distância.

3.6.2.2 ETA do Sistema Sacavém

A ETA Sacavém também é do tipo ciclo completo, possuindo as mesmas etapas da ETA Italuís, e tem capacidade para tratar cerca de 240 L s^{-1} . Após tratamento, a água é encaminhada a um reservatório com capacidade para armazenar 1.000 m^3 . Deste reservatório, a água é recalçada para o sistema de distribuição.

3.7 Validação de métodos e o Sistema Nacional de Vigilância Ambiental em Saúde

O processo utilizado para confirmar que um método é confiável para a aplicação a que se propõe é denominado validação; portanto, é necessário para o reconhecimento das limitações e confiabilidade dos resultados obtidos (HUBER, 1999; LOPES, 2007).

Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (RIBANI et al, 2004).

Diferentes normas para validação de métodos, editadas por vários órgãos nacionais ou internacionais, estabelecem critérios para a validação de métodos analíticos. As diretrizes brasileiras mais relevantes são a Resolução RE nº 899, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (AGÊNCIA NACIONAL..., 2003a) e o DOQ-CGCRE-008, do Instituto Nacional de Metrologia (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA..., 2003).

O procedimento para validação do método analítico proposto neste estudo seguiu as orientações do “Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos” publicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), mediante a Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (AGÊNCIA NACIONAL..., 2003a). Entre outras coisas, esta Resolução afirma que a ANVISA é uma agência reguladora, cuja finalidade, entre outras, é “promover a proteção da saúde da população por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados” (AGÊNCIA NACIONAL..., 2003b).

No organograma apresentado na Figura 8, torna-se evidente a relação da ANVISA com a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Em junho de 2003, com base na publicação do Decreto nº 3.450, de 9 de maio de 2000, esta mesma Secretaria absorveu as atribuições do antigo Centro Nacional de Epidemiologia (Cenepi), que era vinculado à Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), passando a assumir também a gestão do Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica e Ambiental em Saúde (MINISTÉRIO..., 2008b).



Figura 8. Organograma da estrutura do Ministério da Saúde.
Fonte: BRASIL, 2008a.

A Instrução Normativa n. 1, de 7 de março de 2005, instruiu o Subsistema Nacional de Vigilância em Saúde Ambiental como responsável pela:

coordenação, avaliação, planejamento, acompanhamento, inspeção e supervisão das ações de vigilância relacionadas às doenças e agravos à saúde no que se refere a:

- a. água para consumo humano;
- b. contaminações do ar e do solo;
- c. desastres naturais;
- d. contaminantes ambientais e substâncias químicas;
- e. acidentes com produtos perigosos;
- f. efeitos dos fatores físicos; e
- g. condições saudáveis no ambiente de trabalho (MINISTÉRIO..., 2008b).

De acordo com o Decreto 5.974, de 29 de novembro de 2006, artigo 31º, inciso I, à Secretaria de Vigilância em Saúde, entre várias outras competências, destinou-se também a

coordenação da gestão do Sistema Nacional de Vigilância Ambiental em Saúde (BRASIL, 2006).

Portanto, diante destas considerações, entende-se que as metodologias publicadas pela ANVISA também podem ser aplicadas ao objetivo do método em questão. Dentro da RE nº 899, de 29 de maio de 2003, optou-se por seguir as recomendações dos Métodos de Validação Bioanalíticos, pois, similarmente à condição da relação matriz-analito de interesse, percebe-se que, no método cromatográfico em estudo, também ocorre esta relação, ou seja, matriz com existência de vários possíveis interferentes e analitos de interesse em níveis de traços. Considera-se, ainda, que hormônios estrógenos também estão presentes como princípio ativo em formulações medicamentosas, notadamente anticoncepcionais (NOGUEIRA, 2003).

Portanto, a RE 899/2003 - ANVISA determina que a validação garanta, experimentalmente, que “o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”. Sendo assim, ela estabelece critérios para que os parâmetros de controle (especificidade; linearidade; precisão; exatidão; limites de quantificação superior e inferior; limite de detecção; recuperação; estabilidade e reprodutibilidade), sejam considerados adequados à análise. Contudo, antes da avaliação destes parâmetros, deve-se considerar o estudo da especificidade e da curva analítica concomitante à linearidade.

As especificações descritas a seguir são conhecidas como os principais parâmetros de validação de métodos, sendo também conhecidos como parâmetros de desempenho analítico ou figuras de mérito analítico.

Precisão é a expressão da concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA..., 2003). É normalmente avaliada pelo desvio padrão absoluto (σ), que utiliza geralmente mais de 20 medições. Em validação corriqueira, geralmente usa-se quantidade menor, sendo portanto calculada a estimativa do desvio padrão (S) (RIBANI et al, 2004).

$$S^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \rightarrow \text{Variância amostral}$$

$$S = \sqrt{S^2} \rightarrow \text{Desvio-padrão (estimativa do desvio-padrão absoluto)}$$

$$\text{RSD ou CV} = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100 \rightarrow \text{Desvio-padrão relativo ou Coeficiente de variação}$$

Sendo $\bar{x}$, a média aritmética das determinações; x_i , o valor individual de uma medição e n é o número de medições.

Para análises de traços, são aceitos desvio padrão relativos (RSD) menores ou igual a 20%, dependendo da complexidade da amostra. Uma forma simples de melhorar a precisão é aumentar o número de replicatas. É considerada em 3 níveis: repetitividade, precisão intermediária, reprodutividade (RIBANI et al, 2004).

Repetitividade é a concordância entre os resultados de análises realizadas sob todas as condições iguais em curto intervalo de tempo. Pode ser expressa em RSD. ANVISA denomina repetibilidade. Deve-se ter o cuidado de confundir com precisão instrumental medida por injeções repetitivas (RIBANI et al, 2004).

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório, devido a diferentes eventos (dias, analistas, equipamentos ou combinação destes), e é expressa através do RSD (RIBANI et al, 2004).

Reprodutividade avalia o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuando variações de condição (mudança de operador, local, equipamentos) (RIBANI et al, 2004).

Exatidão expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro ou aceito como referência (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA..., 2003 e RIBANI et al, 2004).

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão empregam Materias de Referência, ou fazem uso de Comparação de Métodos, Ensaio de Recuperação ou Adição de padrão (RIBANI et al, 2004). Para os ensaios de recuperação, intervalos aceitáveis para resíduos encontram-se geralmente entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$, sendo o processo mais usado em função das maiores dificuldades inerentes aos demais processos (RIBANI et al, 2004).

A capacidade de avaliar, sem equívocos, os analitos, na presença de componentes que podem interferir na determinação, é denominada seletividade (RIBANI et al, 2004; LANÇAS, 2004). Ela avalia o grau de interferência de espécies diferentes do analito. Se a seletividade não for assegurada, linearidade, exatidão e precisão estarão comprometidos (RIBANI et al, 2004).

Existem duas formas de se avaliar a seletividade: comparando-se a matriz isenta do analito e a matriz adicionada do padrão do analito; e através da avaliação com detectores modernos (DAD, EM), que comparam o espectro obtido com o de um padrão e usa isso como

indicação da presença de composto puro. Também o coeficiente angular da equação da reta, obtido da curva analítica, indica a seletividade do método. Quanto maior o valor deste coeficiente, maior a seletividade (RIBANI et al, 2004).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas de desenvolvimento e otimização do método de detecção dos quatro hormônios estrógenos deste estudo foram realizadas no Instituto de Química de São Carlos (IQSC) da Universidade de São Paulo (USP). As etapas de validação e aplicação do método foram desenvolvidas no Núcleo de Análises de Resíduos de Pesticidas (NARP) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

4.1 Material utilizado

Todo material empregado no manuseio dos padrões, reagentes, solventes e soluções foram previamente lavados com solução de Extran[®] alcalino a 5% (detergente), e depois enxaguados, sequencialmente, com água potável, água destilada e acetona. No caso de material volumétrico, proveta por exemplo, a secagem foi feita ao ar; para os demais materiais, procedeu-se à secagem em estufa a cerca de 40 °C.

4.1.1 Solventes e soluções

Conforme mostrado na Tabela 4, todos os padrões empregados apresentaram pureza mínima de 97%, e foram adquiridos no estado sólido, em forma de pó ou pequenos cristais brancos. Os solventes metanol (MeOH), acetonitrila (ACN) e acetona (ACT) empregados foram de grau cromatográfico, e a água desionizada foi obtida pelos sistemas Milli- e Direct-Q, da Millipore.

Tabela 4. Padrões utilizados no desenvolvimento do estudo.

Reagente	Fabricante	Pureza	Número CAS
17 α -etinilestradiol	Aldrich	98%	57-63-6
17 β -estradiol	Sigma	98% (padrão referência)	50-28-2
Estriol	Aldrich	98%	50-27-1
Estrona	Fluka	mín. 97%	53-16-7

A partir dos padrões sólidos, foram preparadas soluções-estoque para cada substância, na concentração de 50 mg L⁻¹ e, a partir destas, as soluções de trabalho, tanto individuais quanto mistas, ou seja, contendo todos os quatro padrões, em diferentes concentrações.

O ácido acético glacial utilizado para acidificar a água da fase móvel do sistema cromatográfico foi de grau P.A., com pureza 99,9% (Merck).

Para a secagem do eluato oriundo da EFS foi usado o gás nitrogênio, com 99,999% de pureza, da White Martins.

4.1.2 Demais materiais

O trabalho foi desenvolvido parte na USP, em São Carlos, SP, e parte na UFMA, em São Luís, MA, portanto, foram usadas duas colunas cromatográficas de características similares, diferindo apenas o fabricante. Também foram utilizados dois cromatógrafos a líquido de fabricantes distintos. A parceria estabelecida entre USP e UFMA, favorecida pelo Programa de Cooperação Acadêmica (PROCAD-CAPES 2008), possibilitou o uso destes.

Aos materiais citados nos sub-tópicos a seguir, acrescenta-se todo o material de uso rotineiro em laboratório, como béquer, kitassato, bastão de vidro, erlenmeyer, proveta e outros mais.

4.1.2.1 *Extração em fase sólida*

Foram obtidos, da Agilent, cartuchos do tipo seringa, das séries AccuBond^{II} ODS-C₁₈ e SampliQ OPT (polimérico), com quantidades de adsorvente de 500 mg e 150 mg, respectivamente, para ODS-C₁₈ e OPT polimérico. As capacidades de volume foram de 6 mL para ambos os adsorventes.

4.1.2.2 *Separação cromatográfica*

No IQSC/USP, utilizou-se coluna Zorbax C-18, da Agilent, com 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno, preenchida com C₁₈ quimicamente ligado a sílica, com partículas de 5 µm. Na UFMA, empregou-se coluna Chromsep Microsorb 100 C18, da Varian, com as mesmas especificações descritas acima.

4.1.3 Equipamentos

A seguir, são listados os equipamento utilizados na USP e na UFMA durante o desenvolvimento desta pesquisa.

4.1.3.1 *Universidade de São Paulo*

a) Cromatógrafo a líquido série 1200, da Agilent, equipado com:

- ✓ Desgaseificador;
 - ✓ Bomba quaternária de alta pressão, tipo pistão;
 - ✓ Injetor automático;
 - ✓ Termostato para controle de temperatura da fase móvel na coluna;
 - ✓ Detector espectrofotométrico por arranjo de diodos, e;
 - ✓ Microcomputador, com programa ChemStation, ver. B.03.01, para controle do equipamento e obtenção dos dados.
- b) Bomba de vácuo, modelo 166, fabricada por Fabbe-Primar Indústria LTDA.
- c) Potenciômetro (pH-metro) digital, equipado com eletrodo de vidro e de temperatura, modelo 8010, da Qualxtron.
- d) Conjunto para múltipla EFS (Manifold) fabricado pela Macherey-Nagel, com 12 canais.

4.1.3.2 Universidade Federal do Maranhão

- a) Cromatógrafo a líquido da Varian equipado com:
- Duas bombas de alta pressão, modelo ProStar 210;
 - Injetor manual, por meio de microseringa, (loop de 20 μ L);
 - Detector espectrofotométrico por arranjo de diodos, modelo ProStar 335, e;
 - Microcomputador, com programa Galaxie, versão 1.9.3.2, para controle do equipamento e obtenção dos dados.
- b) Bomba de vácuo, modelo 36/97, fabricada por FANEM.
- c) Conjunto para múltipla EFS fabricado pela Varian, com 10 canais.

4.2 Preparo e armazenamento de soluções

As soluções de trabalho utilizadas durante toda a pesquisa, ou seja, do desenvolvimento do método à sua aplicação, passando pela validação, foram preparadas a partir de diluições da solução estoque no mesmo solvente inicial.

A solução estoque foi preparada individualmente para cada analito, diluindo-se certa massa da substância em volume de MeOH suficiente para atingir-se a concentração de 50 mg L⁻¹ (na USP) e 100 mg L⁻¹ (na UFMA).

Todas as soluções preparadas foram acondicionadas em frasco âmbar e armazenadas em refrigerador a 4 °C. Seguindo recomendações de Ribani et al (2004), as soluções estoque

foram renovadas a cada 3 meses e as de trabalho, a cada 3 semanas. A inobservância destes prazos pode acarretar inexatidão do método, pois a área resultante do pico cromatográfico pode ser inferior àquela relativa à concentração calculada em virtude da degradação natural dos padrões em solução.

4.3 Coleta, transporte e preparo de amostras

As etapas de coleta, transporte e preparo das amostras são importantes para a diminuição de erros. Amostras de água potável foram coletadas em frascos plásticos de polietileno de alta densidade (PEAD), previamente limpos e secos, contendo agente redutor em quantidade suficiente para neutralizar o cloro residual (descloração) presente na amostra.

As amostras foram transportadas em caixa térmica contendo gelo, e mantidas em temperatura inferior a 10 °C até o momento do seu preparo, o qual ocorreu até 30 h, após a coleta. Para definição deste prazo, tomou-se por base o método definido por Standard Methods... (1998), que define procedimentos específicos para a coleta de amostras de água potável.

4.3.1 Descloração

Como mencionado no tópico 3.5.2, no tratamento de água para fins de consumo público, a água passa por uma etapa denominada desinfecção. O produto mais usado como agente desinfetante é o cloro ou seus derivados (hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, cal clorada), além de outros produtos que também apresentam potencial oxidativo. Como caráter preventivo e seguindo a determinação da Portaria n. 518/2004 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2005), ao sair da ETA, a água distribuída deve, obrigatoriamente, conter residual de cloro de modo a prevenir a contaminação, durante a distribuição da água potável, até a chegada à residência do consumidor (HELLER e PÁDUA, 2006).

Estudos indicam que hormônios estrógenos podem ser degradados por processos de oxidação, seja por desinfecção com cloro e seus derivados, por ozonização ou por meio de processos oxidativos avançados (POAs). Os dois últimos tem se mostrado as tecnologias mais adequadas para aumentar a eficiência de inativação destas substâncias (BILA et al, 2007; TERNES et al, 2003; ROLLOF, 2007).

Neste trabalho, para prevenir a diminuição da concentração dos esteróides pesquisados, desde o momento da coleta até a realização da análise, incluiu-se, no preparo desta, a etapa de

descloração, ou seja, a neutralização do cloro residual presente na água potável.

Os agentes redutores comumente usados para descloração são os precursores do sulfito, notadamente tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) e metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), que em água sofrem hidrólise liberando íons sulfito (SO_3^-) e atuam como agente redutor (STANDARD METHODS..., 1998 e ALBUQUERQUE, 2005). Neste estudo, usou-se metabissulfito de sódio e com base na orientação de Standard Methods... (1998), adicionou-se aos frascos, ainda antes da coleta, o equivalente a 0,1 mL de solução a 3% deste reagente, para cada 100 mL de amostra.

4.3.2 Extração dos analitos

Inicialmente, foram testados os procedimentos de EFS utilizados por Araújo (2006) e Lopes (2007), aqui chamados de P-1 e P-3, respectivamente, procedimentos já empregados praticamente para os mesmos analitos, no modo off-line. Em ambos os trabalhos foram utilizados cartuchos preenchidos com C_{18} para a extração.

Araújo (2006) realizou condicionamento, adição de amostra e eluição, nos fluxos de 3; 2 e 1 mL min^{-1} , respectivamente. Após secagem do extrato sob fluxo suave de gás nitrogênio, este foi reconstituído em 0,5 mL de metanol. No trabalho de Lopes (2007) a amostra foi percolada sob fluxo de 6 mL min^{-1} . O extrato também foi seco sob suave fluxo de gás nitrogênio. Entretanto, foi reconstituído em 0,6 mL de acetonitrila. A Tabela 5 apresenta mais detalhes sobre ambos os procedimentos.

Partindo-se destes dois procedimentos, e conhecendo-se as características dos analitos e seus comportamentos durante a separação cromatográfica, também foram testados outros dois procedimentos de extração, um derivado do procedimento aplicado por Araújo (2006) e outro, do método desenvolvido por Lopes (2007), designados de P-2 e P-4, respectivamente. Para ambos, empregou-se no condicionamento, fluxo de 3 mL min^{-1} , na adição da amostra e na lavagem do cartucho, 2 mL min^{-1} , e na eluição, fluxo de 1 mL min^{-1} . Também levou-se à secagem, sob suave fluxo de gás nitrogênio, os extratos de ambos os procedimentos, de modo que em P-2, reconstituiu-se o resíduo em metanol, e P-4, em acetonitrila. Portanto, foram avaliados quatro procedimentos de EFS. O volume de amostra extraída foi de 200 mL, sendo que este resultou em volume de 0,5 mL ao final da extração, resultando, desta forma, um fator de concentração igual a 400. Os volumes dos diferentes solventes utilizados em cada etapa da extração, bem como outras informações relativas à EFS, encontram-se detalhadas na Tabela 5.

Tabela 5. Procedimentos de EFS pesquisados para uso no método

Etapa	Extração em Fase Sólida (EFS)			
	P-1	P-2	P-3	P-4
Condicionamento	5 mL MeOH ^a ; 7 mL ACN ^b ; 5 mL H ₂ O	9 mL MeOH; 9 mL H ₂ O	6 mL Hex ^c ; 2 mL ACT ^d ; 6 mL MeOH; 10 mL H ₂ O pH 3	2 mL ACT; 6 mL MeOH; 10 mL H ₂ O pH3
Adição de amostra	200 mL	200 mL	200 mL	200 mL
Lavagem	5 mL água	10 mL MeOH:H ₂ O (1:9)	10 mL MeOH:H ₂ O (1:9)	10 mL MeOH:H ₂ O (1:9)
Eluição	6 mL ACN	2 x 2 mL ACT	4 mL ACT	4 mL ACT
Secagem do extrato	nitrogênio	nitrogênio	nitrogênio	nitrogênio
Reconstituição	0,5 mL MeOH	0,5 mL MeOH	0,5 mL ACN	0,5 mL ACN

^a Metanol; ^b Acetonitrila; ^c Hexano; ^d Acetona.

Alda e Barceló (2001), ao estudar dez poluentes, dentre eles os quatro estrógenos aqui investigados, compararam a recuperação obtida, utilizando cartuchos de C₁₈ BAKER (J.T. Baker) e cartuchos poliméricos (Oasis HLB, Waters). Tendo em vista que os resultados, ao aplicar os cartuchos poliméricos, foram satisfatórios e melhores para estriol e estrona, também realizou-se a extração empregando cartucho polimérico similar (OPT, da Agilent), para comparação das performances de cada material adsorvente.

Para a execução dos experimentos, procurou-se usar água com características similares à água potável e seguramente isenta dos analitos de interesse. Com base na primeira condição, prontamente exclui-se água natural superficial (rios, lagos, lagoas), e, tendo em vista a segunda, torna-se questionável usar água potável de qualquer ponto da rede de distribuição, ou mesmo da ETA, como também de água subterrânea (mineral ou não), por serem passíveis de contaminação por estrógenos. Portanto, poder-se-ia encontrar resultados supervalorizados de recuperação, levando a erros na avaliação dos procedimentos aplicados, objetivo destes experimentos.

Os procedimentos foram executados, fortificando-se água desionizada com solução-padrão mista de estrógenos, obtendo-se soluções com concentração inicial de 2,5 µg L⁻¹ de cada substância, o que corresponde à concentração final de 1000 µg L⁻¹ no extrato; portanto, ao final do procedimento, tinha-se um fator de concentração igual a 400, conforme se pode observar na Tabela 5. O parâmetro de comparação entre os procedimentos e os adsorventes dos cartuchos foi o percentual de recuperação, cujo valor foi obtido relacionando-se as áreas dos resultados analíticos de soluções aquosas extraídas (V_r) com soluções-padrão de amostras não-extraídas (V_p), de mesma concentração, através da equação a seguir (AGÊNCIA NACIONAL..., 2003a; LANÇAS, 2003):

$$\text{Rec}(\%) = \left(\frac{V_r}{V_p} \right) \times 100$$

Onde: Rec = recuperação; V_r = área dos resultados analíticos de amostras extraídas; V_p = área dos resultados analíticos de amostras não-extraídas.

Para verificar se há diferença estatisticamente significativa entre os valores de recuperação obtidos para os diferentes procedimentos e adsorventes de EFS pesquisados, recorreu-se à comparação das médias de recuperação mediante o teste “t” de Student (BARROS NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2007), usando-se as equações:

$$t = \frac{\mu_2 - \mu_1}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}} \quad GL = n_1 + n_2 - 2$$

Onde: μ_1 e μ_2 = médias da recuperação; S_1^2 e S_2^2 = variância ou desvio padrão relativo das recuperações obtidas; n_1 e n_2 = número de repetições para cada combinação; GL = grau de liberdade.

Neste caso, a regra de decisão implica que, se $-t_{\text{tab}} < t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}}$, a hipótese nula (H_0) é aceita, caso contrário esta é rejeitada. Nestes termos, H_0 é que as médias sejam iguais ($\mu_1 = \mu_2$). A incógnita t_{tab} é verificada na tabela apresentada no Anexo 1, cruzando-se a linha do GL, calculado conforme equação acima, e a coluna do grau de significância ($\alpha = 95\%$), que neste caso deve ser dividido por 2 ($v = 0,025$).

4.4 Otimização das condições cromatográficas

Com soluções individuais das substâncias, em concentração de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, foram obtidos os espectros de absorvância, empregando-se o próprio equipamento de CLAE-DAD. Nesta etapa, foram utilizadas as condições analíticas relatadas por Araújo (2006).

Procedeu-se, então, aos testes para definição das condições cromatográficas, verificando-se a eluição dos analitos, frente a diferentes fases móveis (H_2O , ACN, MeOH), variando-se seus constituintes e proporção, pH e fluxo. Como ponto de partida, procedeu-se às análises conforme descrito em diferentes artigos, teses e dissertações pesquisados, as quais foram modificadas ou desconsideradas no estudo, mediante os resultados previamente gerados

(ARAÚJO, 2006; ALDA e BARCELÓ, 2000; ALDA e BARCELÓ, 2001; ALDA et al, 2003; RODRIGUEZ-MOZAZ et al, 2004; GHISELLI, 2006; LOPES, 2007).

O trabalho foi iniciado analisando-se soluções-padrão individuais na concentração de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$. Durante os testes, foram verificadas fases móveis binárias empregando-se ACN, MeOH e H_2O em diferentes proporções; fluxos de 0,8 a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; e variação de pH da fase móvel aquosa. A temperatura de 27°C e o volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ não foram alterados, pelo simples fato de que o cromatógrafo (Varian), disponível na UFMA, não é equipado com termostato e tampouco com injetor automático (autosampler).

Para cada análise, além da observação visual do cromatograma, foram avaliados os seguintes parâmetros cromatográficos: fator de retenção (k), fator de separação (α), número de pratos teóricos (N) e resolução (R), que fornecem informações importantes quanto à interação dos analitos com a fase estacionária, à capacidade de discriminação de analitos da fase estacionária, à eficiência de separação dos analitos e à qualidade da separação (CUNICO, GOODING e WEHR, 1998; CASS e DEGANI, 2001).

Procurou-se desenvolver um método simples, rápido, relativamente de pequeno custo e de baixa toxicidade. Portanto, além de se buscar baixos e confiáveis níveis de quantificação, considerou-se o tempo gasto na análise cromatográfica e no preparo da amostra, o preço de cada material envolvido e também a toxicidade dos reagentes utilizados. De modo geral ACN (LC_{50} inalação, rato: $27,3 \text{ ppm/4h}$ e LD oral, rato: $2730 - 3800 \text{ mg/Kg}$) é um solvente mais nocivo à saúde do que MeOH (LC_{50} inalação, rato: 64000 ppm/4h e LD oral, rato: 5628 mg/Kg).

4.5 Linearidade, curva analítica, LD e LQ

Definidas as condições cromatográficas, foram realizadas análises com misturas de padrões, em concentrações progressivamente menores, iniciando-se com $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, para as análises realizadas no IQSC/USP, e com $6000 \mu\text{g L}^{-1}$ para as análises realizadas no NARP/UFMA. Tal diferença de valores pode ser atribuída à coluna cromatográfica (fabricantes distintos) ou à baixa resolução do detector do equipamento usado no NARP, pois antes de dar prosseguimento aos testes tentou-se, sem sucesso, ajustar o software do cromatógrafo, e se investigou algum problema relativo ao hardware (depósitos e bolhas, por exemplo), além de se experimentar diferentes lotes de solventes (MeOH e ACN) e equipamentos desionizadores de água. Inclusive, pesquisando-se a ocorrência de erro na

preparação das soluções-padrão, realizou-se teste qualitativo com uma mesma solução mista de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ usada nos experimentos realizados no IQSC/USP.

A menor concentração, que apresentou repetibilidade de sinal, foi usada como o ponto mais baixo da faixa para verificação da linearidade do equipamento. Considerando-se que baixas concentrações de hormônios são suficientes para causar desregulação endócrina, há interesse em se desenvolver, criteriosamente, um método com os menores valores de limites de detecção e de quantificação (LD e LQ) possíveis. Em concordância com Ribani et al (2004), uma vez que o método proposto neste estudo será usado para análise em nível de traços, não há necessidade de se testar e validar o método sobre toda a faixa linear dinâmica do equipamento. Portanto, partindo-se do menor ponto com sinal reprodutível, foram estabelecidas as faixas de 100 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ e de 1000 a 6000 $\mu\text{g L}^{-1}$, no IQSC/USP e no NARP/UFMA, respectivamente, para verificação da linearidade e montagem das curvas de calibração do equipamento.

A linearidade foi avaliada em função do coeficiente de correlação linear (r^2). Utilizou-se o aplicativo Microsoft Office Excel® para a construção das curvas e cálculo da equação da reta e r^2 . Os coeficientes angular e linear foram obtidos a partir da equação da reta. As concentrações analisadas foram 100, 280, 460, 640, 820 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, no IQSC/USP, e 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 e 6000 $\mu\text{g L}^{-1}$, no NARP/UFMA. Cada ponto foi injetado em triplicata, tendo sido calculados as médias e os desvios-padrão relativos.

Posteriormente, estimou-se os valores de LD e LQ do equipamento, usando-se os parâmetros da curva analítica, através das seguintes equações:

$$\text{LD} = 3,3 \cdot \frac{s}{S} \qquad \text{LQ} = 10 \cdot \frac{s}{S}$$

Onde: s = estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação da reta; S = coeficiente angular da mesma equação.

4.6 Seletividade da separação cromatográfica

Tendo em vista a validação do método, segundo o Guia da ANVISA RE 899/2003 (AGÊNCIA NACIONAL..., 2003a), após definição das etapas da EFS e da linearidade, curva analítica, limite de detecção e limite de quantificação do equipamento (LD_e e LQ_e), procedeu-se à avaliação da seletividade, a fim de verificar a ocorrência ou não de interferentes da matriz

nos tempos de retenção (t_R) dos estrógenos. Para tanto, foram extraídas quatro amostras-testemunhas, analisadas via CLAE-DAD, e as respostas obtidas foram comparadas àquelas da solução de trabalho, sendo também comparados os espectros de absorção dos possíveis interferentes àqueles obtidos das substâncias-padrões dissolvidas em MeOH. As amostras-testemunhas consistiram, para os testes na USP, de água potável coletada do sistema de abastecimento público de água da cidade de São Carlos, SP, e para os testes na UFMA, de água potável coletada do sistema de abastecimento público de água da cidade de São Luís, MA.

4.7 Volume de ruptura

Este parâmetro é de substancial importância para se avaliar a quantidade máxima das substâncias analisadas que o material adsorvente pode reter antes de saturar-se, ou seja, determina-se a capacidade máxima de adsorção. Portanto, serve para se avaliar o volume máximo de amostra que pode ser percolado para a concentração e separação dos analitos de interesse (SANTOS, 2001).

O limite para a identificação do volume máximo que pode ser concentrado (volume de ruptura) baseia-se no percentual de recuperação. Portanto, qualquer volume pré-concentrado deve retornar recuperações com valores dentro da faixa de 70 a 120 %. Fora desta faixa, o volume da amostra é excessivo e deve ser desconsiderado, ou deve-se optar por outro material adsorvente (SANTOS, 2001).

Por fim, após seleção do adsorvente (C_{18} ou polimérico), do procedimento de extração e da faixa linear do método, prosseguiu-se ao teste de volume de ruptura. Foram preparadas soluções aquosas (amostra testemunha) fortificadas com os analitos, mantendo-se sempre a mesma massa das substâncias (3,0 μg), alterando-se o volume de água potável e, conseqüentemente, a concentração (Tabela 6).

Tabela 6. Volume, concentrações e massa das soluções empregadas para determinação do volume de ruptura.

Volume (mL)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Massa (μg)
200	15,0	3,0
400	7,50	
600	5,00	
800	3,75	
1000	3,00	

As amostras fortificadas foram submetidas ao procedimento de EFS selecionado e os extratos foram analisados segundo as condições cromatográficas otimizadas. As recuperações foram calculadas como descrito no tópico 4.3.2.

4.8 Validação do método desenvolvido

Toda esta etapa da pesquisa foi realizada no NARP/UFMA. As concentrações de fortificação das amostras usadas para a validação do método foram determinadas a partir da relação entre as concentrações das soluções-padrão utilizadas para determinação do LD e LQ do equipamento (tópico 4.5) e o fator de concentração resultante dos testes de volume de ruptura (tópico 4.7). Portanto, considerando-se um fator de concentração igual a 800, a amostra fortificada à concentração de $0,625 \mu\text{g L}^{-1}$, corresponde a uma solução-padrão de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ($0,625 \cdot 800 = 500$).

4.8.1 Limite inferior de quantificação (LIQ), limite de detecção (LD) e seletividade do método

Seguindo o preconizado pela ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL..., 2003a), o limite inferior de quantificação (LIQ) pode ser estabelecido por meio de: i) análise da matriz contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis, e; ii) razão 5:1 para relação sinal-ruído da linha de base.

Neste trabalho optou-se pela primeira opção, pois para técnicas de análises cromatográficas, a medição do ruído não é trivial, sendo às vezes subjetiva, acrescentando-se que o tipo e o tempo de uso da coluna cromatográfica interferem na sua medição (RIBANI et al, 2004).

Foram analisadas amostras-testemunhas fortificadas nas concentrações de 0,625; 1,250; 2,500 e $3,750 \mu\text{g L}^{-1}$ (valores anteriores à pré-concentração por EFS), injetadas em quintuplicata, comparando-se os resultados obtidos com os fornecidos pela análise da amostra branco, os quais foram submetidos a tratamento estatístico para verificação da precisão e da exatidão.

O LIQ deve ser, no mínimo, 5 vezes maior que qualquer interferência da amostra branco no tempo de retenção do analito. O pico do analito na concentração do LIQ deve ser identificável e reproduzível, com precisão de 20% e exatidão de 80 a 120% (AGÊNCIA NACIONAL..., 2003a).

Dentre estes níveis investigados, aquele que se apresentou como o menor nível detectável em comparação com o branco da matriz e que não satisfaz as condições para ser considerado LIQ, foi considerado o LD do método.

Concomitantemente, avaliou-se a ocorrência significativa de interferentes da matriz no tempo de retenção do analito. Para confirmação, foram analisadas mais 5 amostras da matriz fortificadas em concentração próxima ao LIQ e injetadas em triplicata, comparando-se os resultados obtidos com os fornecidos pela análise da amostra branco.

Havendo interferência significativa e constante nos tempos de retenção dos analitos, o método deve ser alterado. De qualquer modo, existindo picos interferentes nos tempos de retenção do analitos, estes devem ser inferiores a 20% da resposta do LIQ e também inferiores a 20% da resposta da concentração utilizada para o teste.

4.8.2 Curva analítica e linearidade

A curva analítica foi construída para cada analito, utilizando-se a mesma matriz proposta para o estudo, incluindo-se a análise de amostra em branco e de 6 amostras fortificadas com o padrão do analito, contemplando a faixa desde o LIQ até 120% da concentração mais alta a analisar.

Os resultados foram analisados pelo cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, obtendo-se a equação da reta e o coeficiente de linearidade. Para aceitação da curva analítica, deve-se atender aos seguintes critérios: i) desvio (RSD) $\leq 20\%$ em relação à concentração nominal para LIQ; ii) desvio (RSD) $\leq 15\%$ em relação à concentração nominal para as outras concentrações das curvas de calibração; iii) no mínimo 4 das 6 concentrações da curva de calibração devem atender aos critérios acima, incluindo o LIQ e a maior concentração da curva de calibração, e; iv) coeficiente de correlação linear (r^2) $\geq 0,98$.

Para a validação da quantificação da substância de interesse e correção de um possível efeito da matriz, recorreu-se ao método denominado adição padrão. Este é geralmente empregado quando pode ocorrer algum efeito da matriz e também quando não se tem disponível matriz seguramente isenta do analito pesquisado. Portanto, este método além de corrigir o efeito da matriz, também compensa mudanças da resposta do equipamento, fornecendo melhor exatidão e precisão ao método como um todo (RIBANI et al, 2004).

4.8.3 Precisão

Verificar a precisão do método significa verificar a repetitividade das análises. Para isto foram utilizadas 3 concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação do procedimento, com 5 repetições para cada nível.

Estatisticamente, verificou-se a precisão calculando-se o desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV). Considerou-se, como base, os critérios da ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL..., 2003a): i) valores $\leq 15\%$; ii) para o LIQ admite-se valores $\leq 20\%$; iii) o cálculo segue a equação:

$$RSD = \frac{DP}{CMD} \cdot 100$$

Onde: DP = Desvio padrão; e CMD = concentração média determinada (experimental).

4.8.4 Exatidão

Foi verificada usando-se amostras da matriz fortificadas em 3 concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação do procedimento, com no mínimo 5 repetições para cada nível.

Para o método ser considerado exato, as respostas devem apresentar valores na faixa de 75 a 115%, com exceção da concentração referente ao LIQ, para o qual se admite valores 80 a 120%, sendo calculados segundo a expressão abaixo:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \cdot 100$$

4.8.5 Ensaio de recuperação

Mede a eficiência no procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. São desejáveis porcentagens de recuperação próximos a 100%. Admite-se valores menores, porém têm que ser exatos e precisos com $RSD \leq 15\%$ (AGÊNCIA NACIONAL..., 2003a e RIBANI et al, 2004).

Foi realizado comparando-se os resultados analíticos de amostras fortificadas extraídas, em 3 níveis de concentração (baixa, média e alta) dentro da faixa de linearidade do método,

com resultados obtidos de soluções-padrão não extraídas (representam 100% de recuperação), analisadas em quintuplicata.

Calculou-se em função da relação área do padrão extraído e não-extraído, segundo equação para cálculo de recuperação mostrada no tópico 4.3.2. Para confirmar a exatidão do método, os resultados encontrados nos ensaios de recuperação foram submetidos ao teste “t” de Student em nível de 95% de significância, calculado segundo a seguinte equação:

$$t = \frac{(\text{Rec} - 100)}{\frac{S_{\text{Rec}}}{\sqrt{n}}}$$

Onde: Rec = média das recuperações obtidas para n repetições; 100 = valor percentual ideal de recuperação; n = número de repetições; e S_{Rec} = desvio padrão das recuperações.

4.8.6 Controle de qualidade

Para efeito de controle de qualidade do método, quando da sua aplicação para análise de amostra desconhecida, foram realizados os testes a seguir: i) Para o limite inferior de quantificação (LIQ), injetou-se solução padrão na mesma concentração de LIQ do método; ii) Para baixa concentração, injetou-se solução padrão em concentração menor ou igual a três vezes o LIQ; iii) Para média concentração, injetou-se solução padrão preparada em concentração igual à média entre baixa e alta concentração, e; iv) Para alta concentração, injetou-se solução padrão em concentração equivalente à faixa de 75 a 90% da maior concentração da curva de calibração.

4.9 Aplicação do método

Finalmente, após a validação do método desenvolvido, realizou-se a aplicação do mesmo, analisando-se amostras de água potável distribuída na cidade de São Luís. Ressalta-se que a intenção não foi oferecer um diagnóstico da água distribuída para o consumo humano pela Companhia de Águas e Esgotos do Maranhão (CAEMA), mas apresentar uma aplicabilidade do método desenvolvido. Assim, foram selecionados apenas alguns pontos de coleta.

Buscou-se, contudo, selecionar pontos representativos do Sistema de Distribuição de Água (SAA), de modo a se ter uma idéia da dinâmica das concentrações de hormônios

estrógenos ao longo da distribuição, caso aqueles fossem encontrados. Os pontos escolhidos foram: na saída das ETAs (Italuís e Sacavém); no primeiro reservatório de água tratada; imediatamente antes da distribuição aos demais reservatórios ou aos consumidores, e em um único ponto da rede de distribuição propriamente dita.

É importante entender que a água antes de tornar-se potável é captada do manancial e conduzida ao tratamento na ETA, onde passa por vários processos. Após tal tratamento, ela segue para os reservatórios de água e a partir destes, por meio de redes de distribuição, é levada até às residências dos consumidores. Portanto, compreende-se que um sistema de distribuição de água é composto basicamente por ETA, reservatórios e rede de distribuição, o que justifica os pontos escolhidos para aplicação do método analítico, uma vez que representam cada um destes pontos básicos.

4.10 Destinação dos resíduos gerados durante a pesquisa

O estudo desenvolveu extração de hormônio de água, sendo utilizados diferentes solventes. Os resíduos gerados durante a execução deste estudo, foram guardados em frascos de vidro e identificados quanto aos solventes e demais substâncias recolhidas.

No Campus 1 da USP-São Carlos, todos os resíduos químicos, provenientes dos laboratórios com atividades químicas, são tratados e recuperados desde fevereiro de 1998 pelo Laboratório de Resíduos Químicos (LRQ), responsável pelo tratamento (ALBERGUINI, SILVA e REZENDE, 2003). Portanto, todos os resíduos gerados durante as atividades no Laboratório foram enviados ao LRQ.

No Campus do Bacanga, UFMA-São Luís, os resíduos também foram acondicionados em frascos de vidro e identificados. Entretanto, em virtude da inexistência de um setor para tratamento, estes foram recolhidos pela Prefeitura do Campus, a qual se responsabiliza pelo encaminhamento a terceiros para disposição final dos resíduos.

Embora diversas ações isoladas tenham ocorrido e o entendimento por alguns pesquisadores de que esta questão precisa ser encarada coletivamente por toda a comunidade científica e pelos órgãos de fomento, dada sua relevância, os acadêmicos da UFMA ainda não dispõem da alternativa de tratar e recuperar seus resíduos na própria universidade.

Deve-se estar consciente de que os benefícios oriundos da atividade científica e profissional podem gerar, paralelamente, resíduos químicos de diversos graus de periculosidade, que podem necessitar de tratamento químico adequado, antes de serem enviados à disposição final (GERBASE et al, 2005).

Nos últimos anos ações isoladas vêm sendo desenvolvidas por várias Instituições de Ensino Superior (notadamente públicas), visando aumentar a visibilidade dos problemas referentes ao gerenciamento de resíduos químicos (GERBASE et al, 2005).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção do comprimento de onda (λ) dos analitos

A Figura 9 apresenta os espectros de absorção dos analitos de interesse. Observa-se que todos os quatro estrógenos possuem perfil de absorbância semelhantes, identificando-se os comprimentos de onda (λ) próximos a 200 nm e a 280 nm como regiões de máxima absorbância.

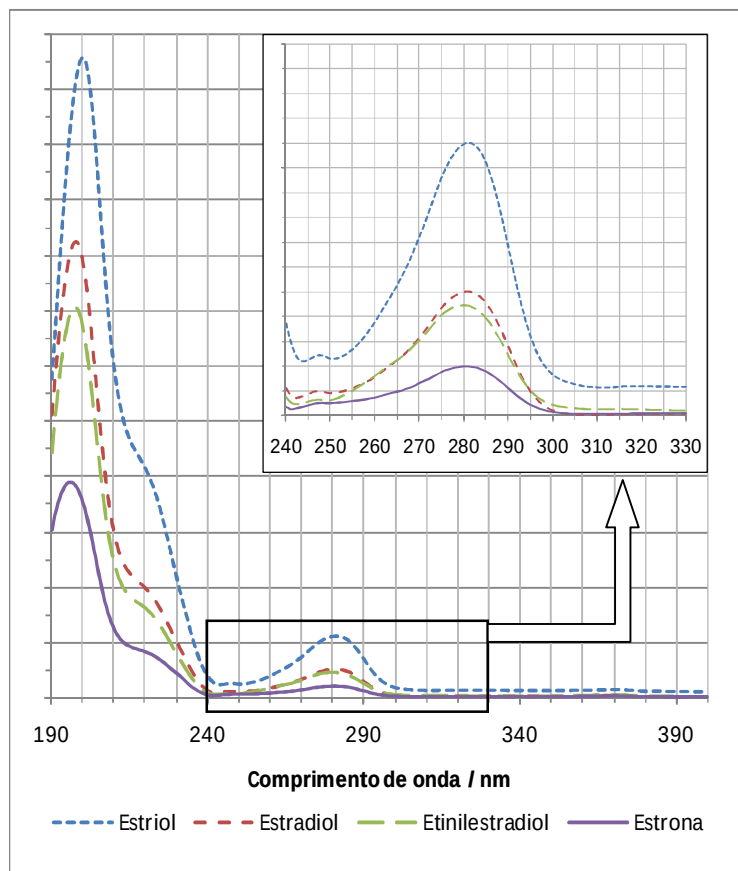


Figura 9. Espectros de absorção na região do UV dos hormônios estrógenos estudados. No detalhe, ampliação do sinal na faixa de 240 a 350 nm

Embora os comprimentos de onda na região de 200 nm tenham apresentado absorção várias vezes maior que aquela em $\lambda = 280$ nm, seguiu-se a recomendação de Cass e Degani (2001) para a utilização de λ superiores a 220 nm, mesmo sendo de um cromóforo mais fraco, pois abaixo deste valor geralmente é observada interferência da fase móvel. Araújo (2006) e Lopes (2007) usaram os comprimentos de onda nesta mesma região para desenvolvimento de

suas pesquisas, sendo eles 280 nm e 281 nm, respectivamente. Portanto, selecionou-se este último comprimento de onda como sendo o λ analítico para prosseguir ao desenvolvimento do método.

Também é possível notar que, dentre as quatro substâncias, em $\lambda = 281$ nm, estriol e estrona apresentam, respectivamente, o maior e o menor valor de absorção, enquanto estradiol e etinilestradiol pouco diferem. Tal ocorrência pode ser explicada em função da absortividade molar dos grupos C-O presentes nas estruturas moleculares destas substâncias (Figura 2).

A região espectral (280 nm) escolhida para a realização dos experimentos é característica das transições de elétrons não-ligantes (n) para o estado excitado π^* , pois apresenta energia suficiente para este processo, razão pela qual a maior parte das aplicações da espectroscopia UV-Vis a compostos orgânicos é feita na faixa de 200 a 700 nm. O comprimento de onda no qual uma molécula orgânica absorve é dependente da força de ligação de seus elétrons. Nas ligações simples C-C e C-H, os elétrons estão fortemente ligados e requerem energias correspondentes a comprimentos de onda na região do UV de vácuo, ou seja, abaixo de 180 nm (SKOOG et al, 2006). Desta forma, as diferentes intensidades de absorção dos estrógenos podem ser atribuídas aos diferentes grupos ligados ao conjunto de anéis que possuem em comum.

Portanto, estriol, com três grupos carbonila (C=O), apresenta maior absorção, estradiol e etinilestradiol, com dois grupos C=O, apresentam valores intermediários e estrona, com apenas um grupo, é o que menos absorve a 280 nm.

As absortividades molares para picos associados à transição $n \rightarrow \pi^*$ são geralmente pequenas e comumente variam de 10 a 100 L mol⁻¹ cm⁻¹, o que explica os baixos valores de absorção apresentados em 280 nm.

5.2 Desenvolvimento de método para análise de hormônios estrógenos

O cromatograma na Figura 10 apresenta a separação obtida usando a fase móvel ACN:H₂O (60:40) em modo isocrático, fluxo de 1 mL min⁻¹, modo isocrático, $\lambda = 210$ nm e corrida de 20 min. Percebe-se sobreposição dos picos referentes a alguns compostos entre si e com um pico referente ao branco. Também não foi possível identificar-se o pico para estriol.

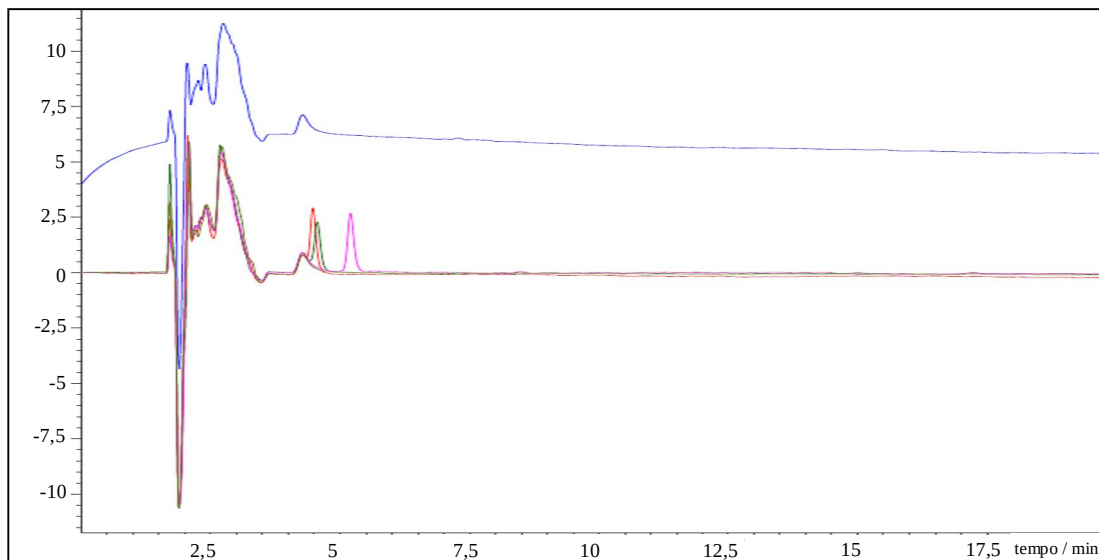


Figura 10. Picos dos analitos sobrepostos. Em azul cromatograma do branco (MeOH). Condições: FM ACN:H₂O (60:40) em modo isocrático, fluxo de 1 mL min⁻¹, modo isocrático, λ = 210 nm e corrida de 20 min

Posteriormente alterou-se a FM ACN:H₂O para a proporção 50:50 em λ = 280 nm e corrida de 12 minutos. Os picos apresentaram-se bem resolvidos, exceto para estriol, que aparece com t_R de aproximadamente 3 min, confundindo-se com os sinais fornecidos pelo solvente MeOH (Figura 11).

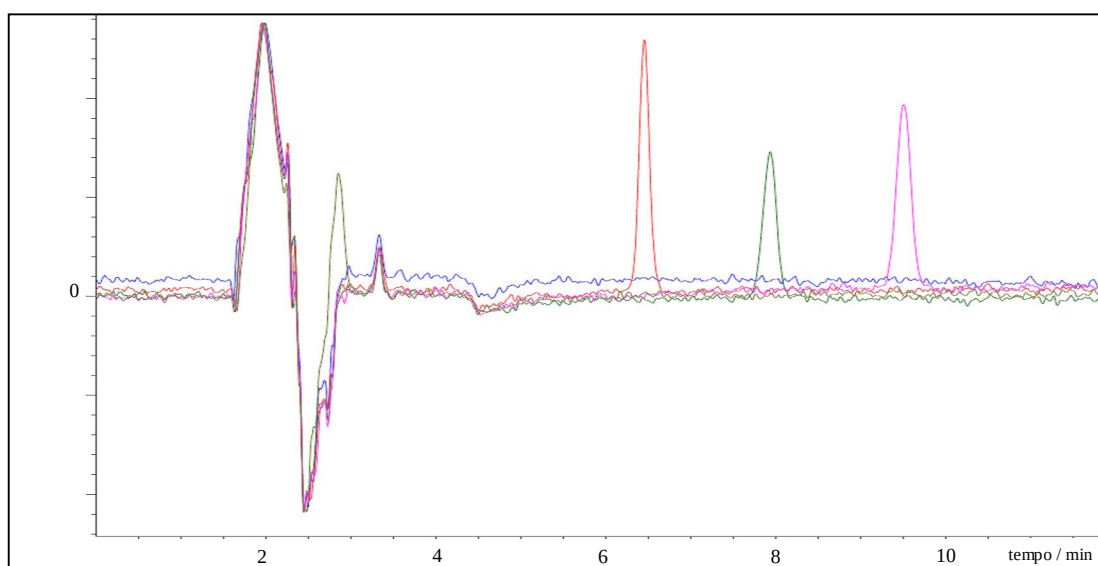


Figura 11. Superposição dos cromatogramas obtidos para MeOH (em azul), E3 (em marrom), E2 (em vermelho), EE2 (em verde) e E1 (em rosa). Condições: FM ACN:H₂O (50:50) em modo isocrático, fluxo de 1 mL min⁻¹, λ = 280 nm e corrida de 12 min

O pico para estriol foi melhor observado quando alterou-se a proporção da FM ACN:H₂O para 40:60. Porém, o tempo da corrida aumentou para 23 min, além de que a diferença entre o pico referente a estriol ($t_R \sim 3,5$ min) e o pico seguinte (estradiol, $t_R \sim 12,5$ min) foi de 9 min, tempo demasiadamente longo (Figura 12).

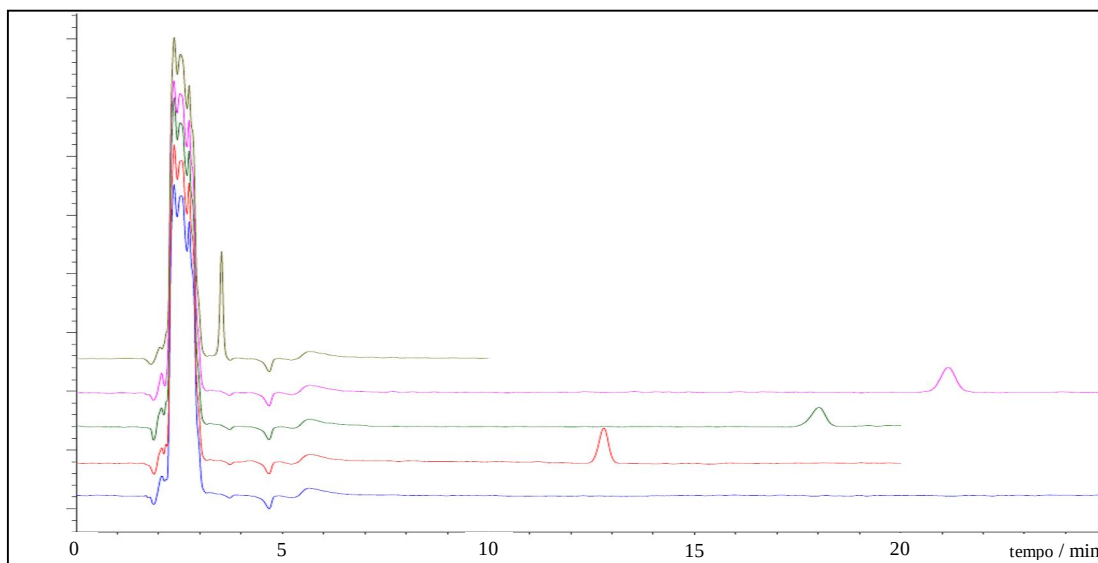


Figura 12. Superposição dos cromatogramas obtidos para MeOH (em azul), E3 (em marrom), E2 (em vermelho), EE2 (em verde) e E1 (em rosa). Condições: FM ACN:H₂O (40:60) em modo isocrático, fluxo de 1 mL min⁻¹, modo isocrático, $\lambda = 280$ nm e corrida de 23 min

Buscando-se alternativa ao uso de acetonitrila (ACN) como FM, também testou-se metanol (MeOH). Foram testadas várias proporções para o uso da FM MeOH:H₂O, porém os resultados não foram satisfatórios. Na Figura 13, é mostrado o cromatograma obtido empregando-se MeOH:H₂O (40:60) e fluxo de 1 mL min⁻¹, no modo isocrático. Percebe-se que em corrida de 25 min nenhuma das substâncias foi eluída, enquanto que nestas mesmas condições, empregando-se ACN, 22 min de corrida foram suficientes para a eluição dos 4 hormônios em estudo.

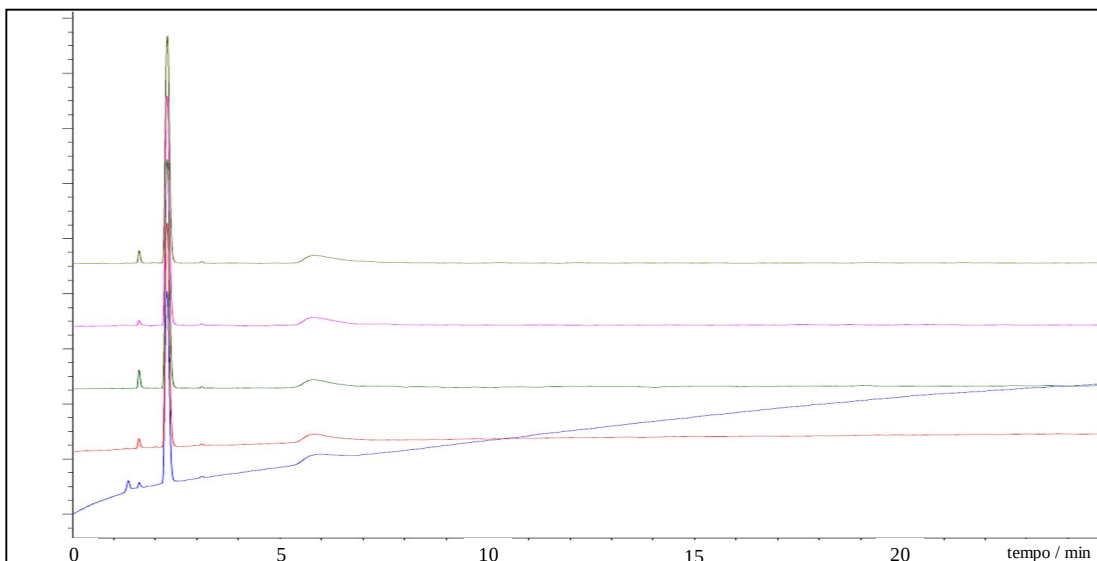


Figura 13. Superposição dos cromatogramas obtidos para MeOH (em azul), E3 (em marrom), E2 (em vermelho), EE2 (em verde) e E1 (em rosa). Condições: FM MeOH:H₂O (40:60) em modo isocrático, fluxo de 1 mL min⁻¹, modo isocrático, λ = 280 nm e corrida de 25 min

Valores de pH ($\sim$ 5,00 e $\sim$ 4,00) foram também testados, adicionando-se ácido acético glacial P.A. à água utilizada na FM. A separação ocorreu com os mesmos t_R 's; entretanto, os sinais apresentaram-se significativamente menores, o que pode representar aumento de LD e LQ do método, ao se considerar a relação sinal-ruído ou a ocorrência de interferentes em igual t_R dos analitos para definição destes valores, durante a validação do método.

Igual modo foi a variação do fluxo de eluição que apenas aumentou o t_R das substâncias e, conseqüentemente, o tempo de análise, sem, no entanto, oferecer melhores respostas.

5.3 Condições cromatográficas para análise de estrógenos

A melhor condição cromatográfica foi a que utilizou como fase móvel (FM) a mistura acetonitrila:água (ACN:H₂O), em modo gradiente, com rampa linear iniciando em 10:90, a 50:50 em 5 min, e 54:46 até 15 min (fluxo 1 mL min⁻¹, volume de injeção 20 μ L, λ = 280 nm, temp. = 27 °C). A Figura 14 apresenta um cromatograma obtido a partir da injeção de solução mista dos analitos, na concentração de 1000 μ g L⁻¹ para cada composto.

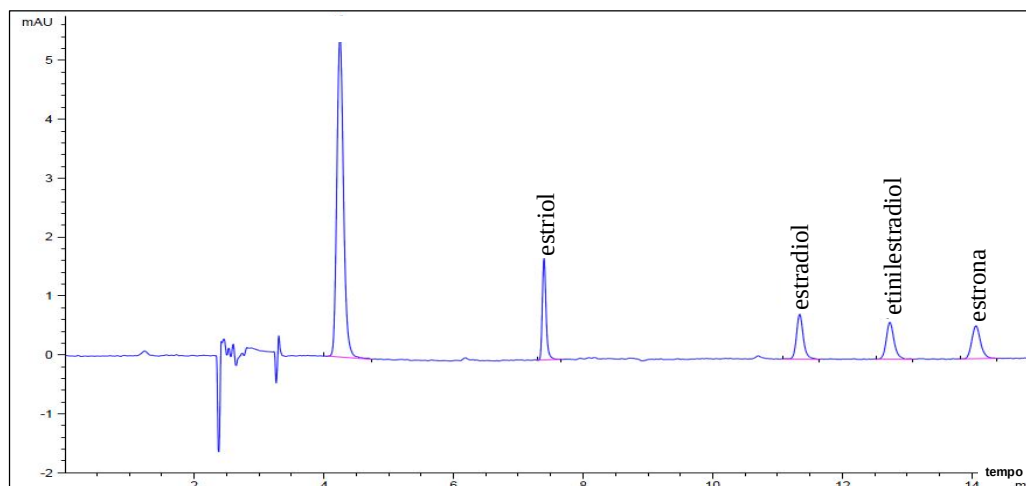


Figura 14. Cromatograma da solução-padrão mista dos hormônios estrógenos, na concentração $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada composto (FM ACN:H₂O, em gradiente, fluxo de 1 mL min^{-1} , volume de injeção de $20 \mu\text{L}$, $\lambda = 280 \text{ nm}$, temp. = 27°C)

A Tabela 7 apresenta os parâmetros cromatográficos para os picos dos estrógenos mostrados na Figura 14.

Tabela 7. Parâmetros cromatográficos para a condição: ACN:H₂O, em gradiente, fluxo de 1 mL min^{-1} , volume de injeção de $20 \mu\text{L}$, $\lambda = 280 \text{ nm}$, temp. = 27°C

Substância	$t_R^a \text{ (min)} \pm \text{DP}^b$	k^c	α^d	N^e	Rs^f
estriol	$7,40 \pm 0,00$	1,97	2,80	86853	22,15
17 β-estradiol	$11,34 \pm 0,01$	3,55	1,80	62592	27,97
17 α-etinilestradiol	$12,74 \pm 0,01$	4,11	1,16	59020	7,11
estrone	$14,06 \pm 0,01$	4,64	1,13	55863	5,93

^a tempo de retenção; ^b desvio-padrão; ^c fator de retenção; ^d fator de separação;

^e número de pratos teóricos; ^f resolução

Segundo Faria (2004), uma boa resolução (R_s) na separação cromatográfica fornece valores maiores que 2. Conforme observa-se na Tabela 7, os valores para este parâmetro mostraram-se adequados, para todos os compostos analisados.

Portanto, sabendo-se que os demais parâmetros (k , α e N) interrelacionam-se com R_s , mediante a equação apresentada a seguir, pode-se inferir que eles também apresentaram valores adequados para análise cromatográfica da mistura dos estrógenos estudados (CUNICO, GOODING e WEHR, 1998; CASS e DEGANI, 2001).

$$Rs = \left(\frac{1}{4} \right) (\alpha - 1) \sqrt{N} \frac{k}{1 + k}$$

5.4 Experimentos realizados no IQSC/USP

5.4.1 Verificação de sinais interferentes

Mediante análise da amostra-testemunha, em $\lambda = 280$ nm, após a determinação do método de EFS e das condições cromatográficas, verificou-se a ocorrência ou não de picos de interferentes, nos tempos de retenção referentes aos analitos (Figura 15).

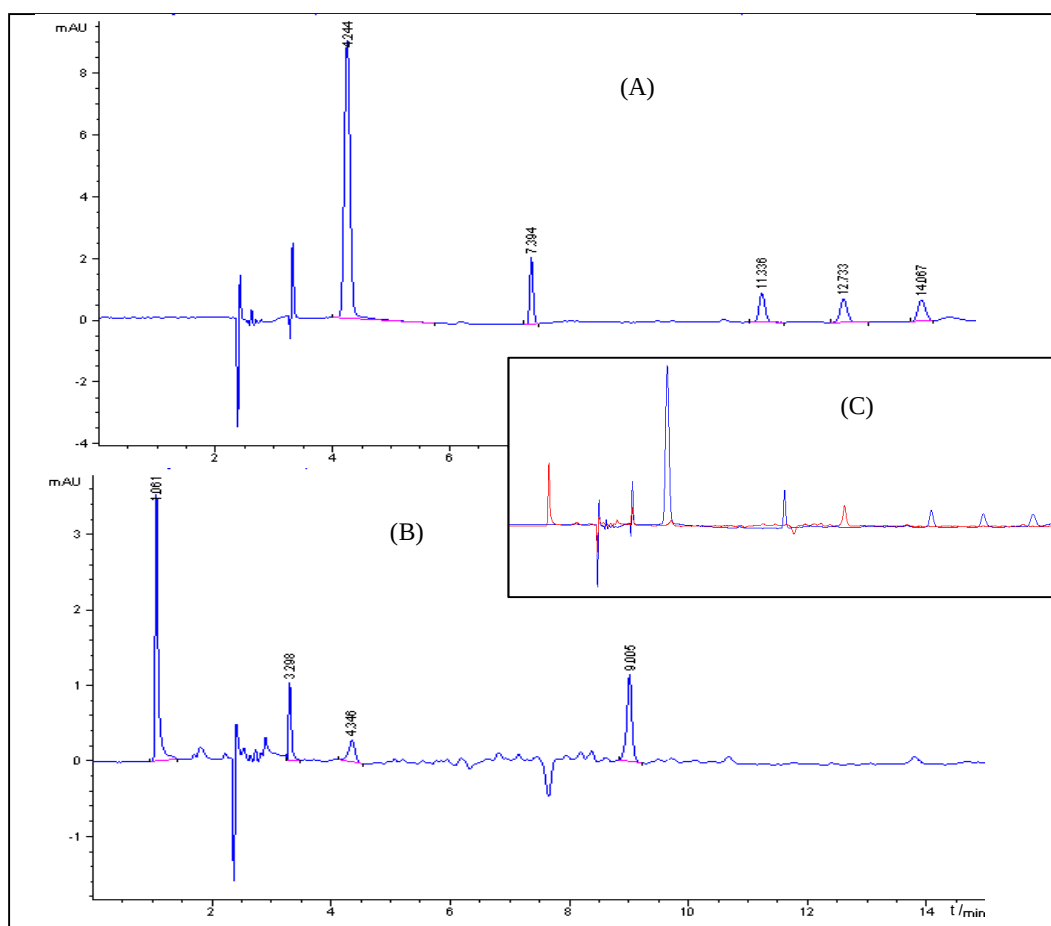


Figura 15. Comparação de cromatogramas (FM ACN:H₂O, em gradiente, fluxo de 1 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 μL, $\lambda = 280$ nm, temp. = 27 °C): A) solução-padrão 1000 μg L⁻¹; B) amostra- testemunha não-fortificada, e C) sobreposição dos cromatogramas A (azul) e B (vermelho)

Na Figura 15A, observa-se os picos referentes a estriol em 7,4 min, estradiol em 11,3 min, etinilestradiol em 12,7 min e estrona em 14,0 min. O pico que aparece em 4,3 min trata-se de algum composto desconhecido, proveniente, provavelmente, de impurezas nos solventes, pois nota-se que na Figura 15B este pico também aparece, embora com sinal muito

menor. Além deste, também constam picos nos tempos de 3,2 min, e 9,0 min, conforme se observa na Figura 15B. De qualquer modo, observa-se claramente na Figura 15C a inexistência de picos interferentes nos tempos de retenção dos analitos.

5.4.2 Linearidade, curva analítica, LD e LQ do equipamento

A Figura 16 apresenta as curvas analíticas construídas para cada estrógeno, a partir das quais foram extraídas as informações apresentadas na Tabela 7.

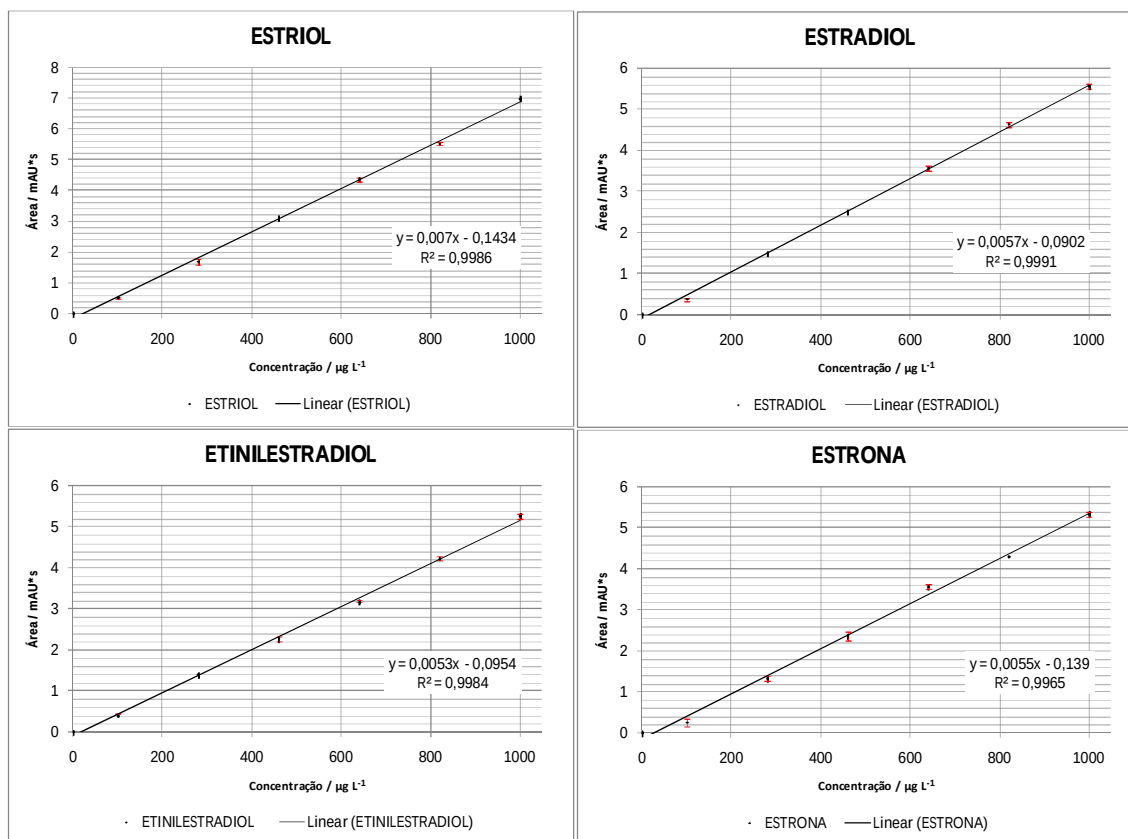


Figura 16. Curvas analíticas (do equipamento), individuais para cada estrógeno. Condições cromatográficas: FM ACN:H₂O (gradiente), fluxo de 1 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL, λ = 280 nm, temp. = 27 °C

Tabela 8. Curvas analíticas, coeficientes de regressão e limites de detecção e de quantificação do equipamento

Substância	Faixa de aplicação (µg L ⁻¹)	Curva analítica	r ²	LD _e * (µg L ⁻¹)	LQ _e * (µg L ⁻¹)
estriol	100 - 1000	$y = 0,007x - 0,1434$	0,9986	47,14	142,86
17 β-estradiol		$y = 0,0057x - 0,0902$	0,9991	33,43	101,29
17 α-etinilestradiol		$y = 0,0053x - 0,0954$	0,9984	35,93	108,93
estrona		$y = 0,0055x - 0,139$	0,9965	69,28	209,95

* LD_e = limite de detecção do equipamento e LQ_e = limite de quantificação do equipamento

O método foi linear na faixa de 100 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, resultando em r^2 maiores que 0,99, o que indica que, nesta faixa, o método de separação cromatográfica mostrou-se adequado para a determinação dos analitos de interesse.

Os limites de detecção (LD_e) e de quantificação (LQ_e) do equipamento foram estimados, utilizando-se os parâmetros das curvas analíticas (Tabela 7). Considerando que o extrato final, após EFS, apresenta concentração 400 vezes maior que na amostra original, pode-se inferir que os limites apresentados na Tabela 7, na prática, variam de 33,43 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 69,28 $\mu\text{g L}^{-1}$ para LD e de 101,29 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 209,95 $\mu\text{g L}^{-1}$ para LQ, quando aplicada a metodologia desenvolvida neste estudo.

Comparando-se os valores de LD_e e LQ_e apresentados na Tabela 7 com as concentrações de estrógenos encontradas na água potável de diferentes países, conforme apresentado na Tabela 2, percebe-se que aqueles são significativamente maiores que estes. Excetua-se a esta afirmação, as concentrações em nível de $\mu\text{g L}^{-1}$ (ppb) quantificadas por Ghiselli (2006), que são muito maiores que os limites apresentados na Tabela 7.

As condições cromatográficas estabelecidas fizeram uso de CLAE com detector DAD, cuja detecção baseia-se na absorção de luz ultravioleta ou visível (UV-Vis) pela substância frente à emissão de radiação eletromagnética por uma lâmpada de deutério (UV) e tungstênio (Vis) (CASS e DEGANI, 2001). Ao se comparar a Tabela 2 com a Tabela 3, é possível perceber que os valores relatados por Kuch e Ballscmitter (2001); Aherne e Briggs (1989); Sodré et al (2007); Rodriguez-Mozaz et al (2004) e Boyd et al (2003) foram alcançados mediante a utilização dos detectores de fluorescência (FLU) e de espectrofotômetro de massa (EM), sabidamente bem mais sensíveis e seletivos que o DAD, portanto passíveis de quantificar concentrações muito menores de substâncias (CASS e DEGANI, 2001).

5.4.3 Eficiências dos procedimentos de EFS e seleção do método analítico

Através dos resultados apresentados na Figura 17,   possível fazer uma comparação entre as recuperações obtidas mediante uso de dois materiais adsorventes para cada procedimento de extração.

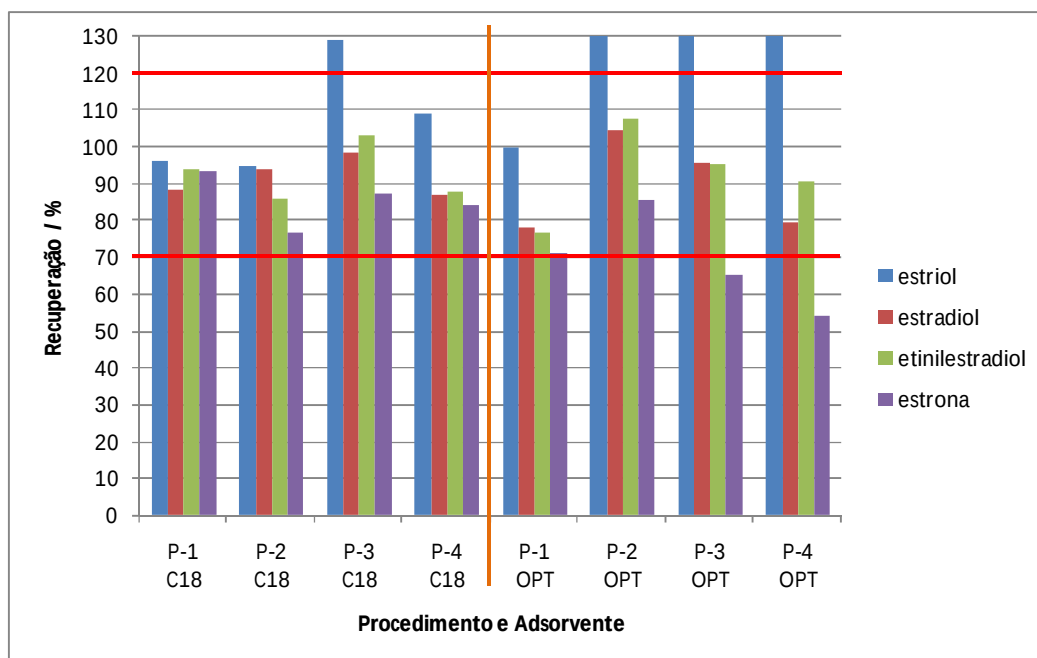


Figura 17. Comparação dos valores de recuperação entre adsorventes C_{18} e OPT (polimérico), para os quatro procedimentos de extração (P-1, P-2, P-3 e P-4). As linhas vermelhas correspondem ao valor máximo (120%) e mínimo (70%) aceitos para análises de resíduos.

Observa-se nitidamente que o adsorvente C_{18} apresentou menor dispersão entre os percentuais de recuperação das substâncias, em relação aos poliméricos, principalmente os procedimentos P-1, com valores variando de 88,41% (estradiol) a 96,47% (estriol); e P-2, fornecendo valores de 76,81% (estrona) a 95,02% (estriol).

Para a ANVISA, é desejável que os valores de recuperação, na validação dos métodos voltados para análises de traços, sejam próximos a 100%, admitindo-se valores menores, desde que não apresentem precisão e exatidão superiores a 20% (AGÊNCIA NACIONAL..., 2003). Ribani et al (2004) afirmam que intervalos de recuperação entre 70 e 120% são geralmente aceitáveis, informação corroborada por Brito et al (2003) e Amarante Junior, Brito e Ribeiro (2005). Portanto, os procedimentos P-1, P-2 e P-4, empregando o adsorvente C_{18} , e procedimento P-1 baseado em cartuchos com adsorvente polimérico (OPT), podem ser considerados adequados, enquanto os demais, por apresentarem resultados fora da faixa aceitável, inadequados.

O adsorvente OPT, frente à maioria dos procedimentos de extração testados, apresentaram baixa eficiência, além de serem de mais alto custo; portanto, foi desconsiderado o seu uso no restante deste estudo.

Importante atributo do adsorvente polimérico OPT é a possibilidade de retenção de compostos polares e não-polares, em virtude de suas características hidro e lipofílicas combinadas, o que pode ser considerado vantajoso em alguns casos. Embora a fase reversa seja o mecanismo de retenção predominante nos cartuchos preenchidos com OPT, é possível, e às vezes necessário, ajustar o pH dos solventes de condicionamento, de lavagem do adsorvente e de eluição, a fim de favorecer a extração de um composto hidrofílico ou hidrofóbico (AGILENT TECHNOLOGIES, 2009). Portanto, é possível a inferência de que a combinação de solventes usada neste estudo para a extração dos hormônios não foi satisfatória, sendo necessário estudo mais detalhado desta questão, caso não exista outra opção de adsorvente ou mesmo preocupação acerca dos solventes utilizados.

Dentre os procedimentos considerados adequados, P-1 apresentou melhor recuperação; entretanto, a sua utilização pode tornar-se de custo elevado, face à atual escassez mundial do solvente acetonitrila. Recentemente, a pequena disponibilidade deste produto para comercialização fez seu preço aumentar de seis a oito vezes (THERMO FISCHER..., 2008), restando então, como alternativa, o procedimento P-2 - C₁₈, já que este não emprega acetonitrila (Tabela 5) e por ter apresentado desempenho similar ao P-4 - C₁₈. Tal observação foi confirmada pela comparação estatística das médias de recuperação obtidas por cada procedimento. Foi empregado o teste de significância “t” de Student, que resultou em valor de $t_{calc} = -1,125$, dentro da faixa de aceitação da igualdade entre as médias avaliadas ($-t_{tab} < t_{calc} < t_{tab}$), sendo $t_{tab} = 2,353$ (Anexo 1) e considerando 95% ($\alpha = 0,05$ e $v = 0,025$) de significância e 6 ($n_1 + n_2 - 2$) graus de liberdade.

Como os procedimentos de EFS foram feitos utilizando-se volume de amostra de 200 mL, e considerando que, ao final do processo, a retomada dos resíduos dá-se mediante dissolução com 0,5 mL de solvente orgânico, calculou-se um fator de concentração igual a 400. Considerando que o extrato final, após EFS, apresenta concentração 400 vezes maior que na amostra original, pode-se inferir que o intervalo de concentração de 100 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ no equipamento, corresponde, na prática, à faixa de trabalho de 0,25 a 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, quando aplicada a metodologia desenvolvida.

5.4.4 Descloração

Na Figura 18, são apresentados dois cromatogramas referentes ao extrato proveniente de 200 mL de amostras-testemunha, fortificadas com os quatro hormônios alvos deste estudo,

perfazendo concentração de $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada um, sendo que uma foi desclorada com solução de metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) e a outra não.

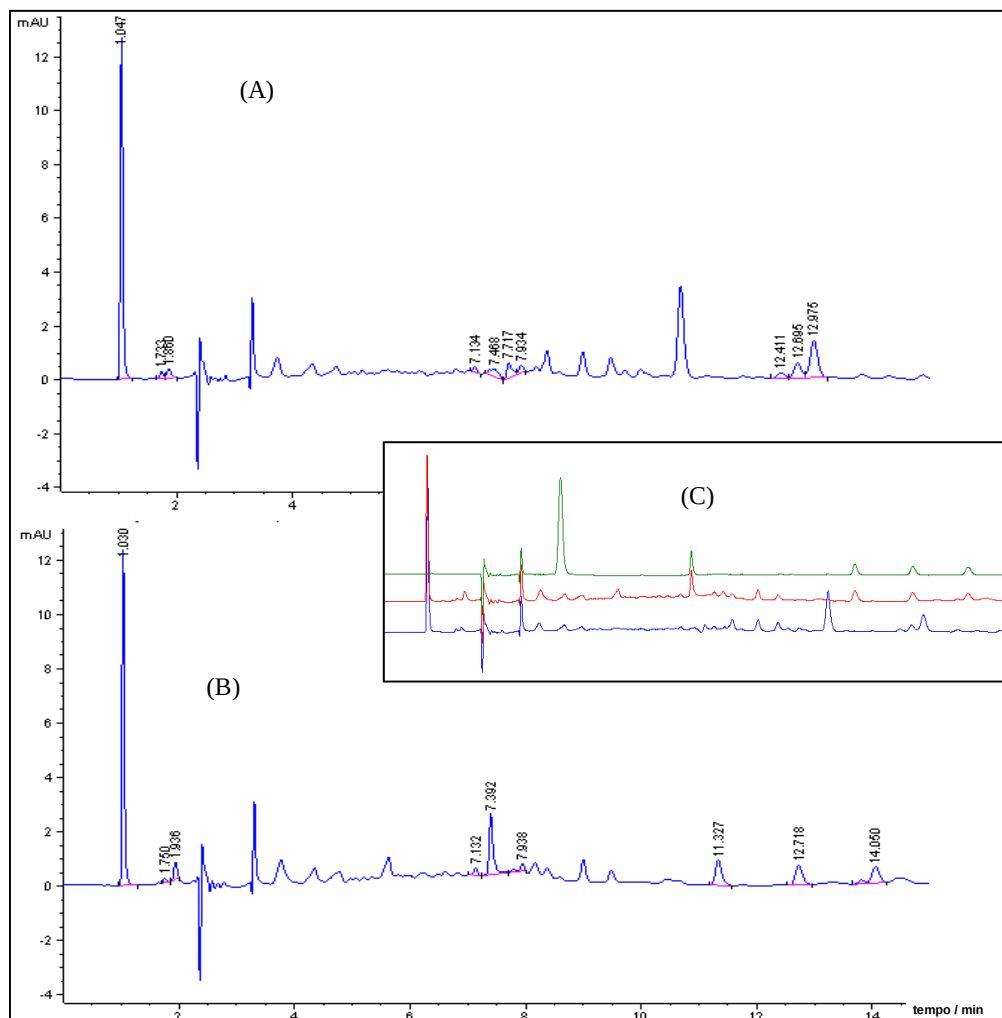


Figura 18. Comparação de cromatogramas de amostras-testemunhas, fortificadas com $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada estrógeno (FM ACN:H₂O, em gradiente, fluxo de 1 mL min^{-1} , volume de injeção de $20 \mu\text{L}$, $\lambda = 280 \text{ nm}$): A) amostra-testemunha contendo cloro residual; B) amostra-testemunha desclorada com $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$; e C) sobreposição dos cromatogramas A (azul) e B (vermelho), em comparação com um cromatograma de uma mistura dos padrões a $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ cada (verde)

Nesta mesma figura, são apresentados os cromatogramas de amostras-testemunhas, com cloro residual de aproximadamente $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, que foram fortificadas com $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada estrógeno. Na Figura 18A, consta o cromatograma da amostra que não foi desclorada. Nela percebe-se uma série de picos que não coincidem com o tempo de retenção (t_R) dos analitos investigados, exceto na região de 12,7 min, que corresponde ao t_R do 17 β -etinilestradiol. Já a

mesma amostra-testemunha, quando desclorada e submetida a estas mesmas condições, forneceu o cromatograma apresentado na Figura 18B, onde são observados picos nos mesmos t_R dos hormônios estrógenos. Na Figura 18C, ambos os cromatogramas são comparados ao fornecido por uma solução-padrão na concentração de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, a qual corresponde à concentração das substâncias investigadas nos extratos das amostras-testemunha. Recorda-se que o fator de concentração para o método testado até esta etapa é igual a 400. É possível notar claramente que a amostra-testemunha desclorada forneceu cromatograma semelhante ao da solução-padrão, indicando, portanto, a importância da descloração no preparo da amostra.

O fenômeno de desativação dos estrógenos por ação do cloro residual presente na água potável, que é oriundo da etapa de desinfecção ao término do tratamento da água, já era esperado, por se tratar de um processo oxidativo, um dos princípios que vêm sendo estudado por diversos pesquisadores para a eliminação da atividade estrogênica de diferentes substâncias (BILA, 2005 e 2007; TERNES et al, 2003; SCHÄFER, NGHIEM e WAITE, 2003; ROLOFF, 2007). Conforme relata Lopes (2007), em seu estudo, mesmo na análise imediata de água potável fortificada, foi observada uma redução na recuperação para um limite abaixo do mínimo aceitável. De acordo com Huber (2005) apud Lopes (2007), os agentes desinfetantes mais comuns, como o dióxido de cloro e o cloro gasoso, reagem primeiramente com grupos funcionais que apresentam muitos elétrons, como fenóis e aminas, sendo, portanto, efetivos na oxidação de estrogênios quando aplicados no tratamento de água. Assim, espera-se que tais reações de oxidação resultem na desarticulação do anel aromático presente nas moléculas dos estrógenos (Figura 2) e, por conseguinte, na inativação de efeito estrogênico.

Lopes (2007), ao certificar-se da desativação dos estrógenos por ação do cloro residual, optou por prosseguir a sua validação utilizando somente água filtrada da ETA, portanto não-potável, pois é obtida em etapa logo anterior à aplicação de cloro (desinfecção). Deste modo, contrariamente ao feito por Lopes (2007), e mantendo-se o foco no objetivo de avaliar a presença de hormônios estrógenos em água potável, ou seja, clorada, procurou-se uma forma de inativar a ação oxidante do cloro residual. Com base na análise microbiológica da água (STANDARD METHODS..., 1998), que faz uso da descloração no preparo da água a ser analisada, e entendendo que a característica da amostra deve ser mantida inalterada desde a coleta até o momento da análise, evitando, assim, variação na concentração das substâncias de estudo, de modo a representar fielmente a situação no momento da coleta, optou-se pelo uso de metabissulfito de sódio como substância descloradora.

5.5 Experimentos realizados na UFMA

A partir do método desenvolvido no IQSC/USP, seguiu-se à sua validação e aplicação na análise da água potável distribuída na cidade de São Luís, MA. Entretanto, ao se reproduzir o método, utilizando-se os materiais e o equipamento disponível no NARP/UFMA, percebeu-se alteração no t_R dos analitos. Após alguns testes, identificou-se a diferença de temperatura do sistema cromatográfico como a causa deste retardamento na eluição das substâncias, visto que o cromatógrafo usado no NARP/UFMA não é equipado com regulador de temperatura.

Para minimização deste efeito, durante os testes com o equipamento, a sala onde ele está instalado teve sua temperatura ambiente controlada e mantida na faixa de 27 a 29 °C. Mesmo assim, a análise resultou em incremento no t_R dos analitos equivalente a 1,24 min, em média. A corrida passou, então, de 15 min para 16,5 min, o que não resultou em problemas na identificação e quantificação dos hormônios estrógenos estudados.

5.6 Verificação de interferentes

Para decidir sobre a necessidade ou não de se alterar o método, investigou-se a ocorrência de sinais interferentes nos novos tempos de retenção dos analitos. Na Figura 19, é apresentada a sobreposição do cromatograma de uma amostra não-fortificada (branco) por um obtido a partir da injeção de solução-padrão mista na concentração de 3 mg L⁻¹.

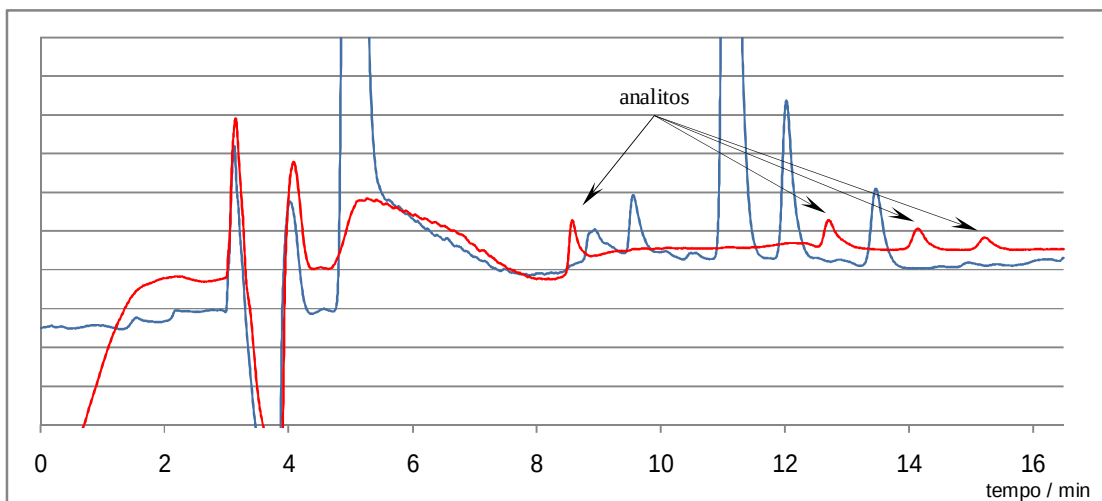


Figura 19. Sobreposição de cromatogramas, mostrando a não ocorrência de interferentes no t_R dos analitos. Em azul, amostra não-fortificada (branco) e, em vermelho, solução-padrão mista a 3 mg L⁻¹. Condição usada: ACN:H₂O, em gradiente, fluxo de 1 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL, λ = 280 nm, temp. ambiente ~ 28 °C

Observa-se que os interferentes presentes na amostra eluem em tempos diferentes das substâncias de interesse. A Tabela 9 apresenta os novos parâmetros cromatográficos para os picos dos estrógenos mostrados na Figura 19.

Tabela 9. Parâmetros cromatográficos para a condição ACN:H₂O, em modo gradiente, fluxo de 1 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL, λ = 280 nm, temp. ambiente = 27 °C

Substância	t _R ^a (min) ± DP ^b	k ^c	α ^d	N ^e	Rs ^f
estriol	8,48 ± 0,02	2,35	4,06	32054	48,79
17 β-estradiol	12,57 ± 0,03	3,98	1,68	13079	13,01
17 α-etinilestradiol	13,95 ± 0,04	4,52	1,14	24171	3,43
estrone	14,99 ± 0,04	4,94	1,09	26965	2,88

^a tempo de retenção; ^b desvio-padrão; ^c fator de retenção; ^d fator de separação; ^e número de pratos teóricos; ^f resolução

Os valores dos parâmetros cromatográficos apresentados na Tabela 9 indicam condição adequada para a separação cromatográfica das substâncias em estudo, pois a resolução (Rs) para todos eles é maior que 2 (FARIA, 2004). Como demonstrado no tópico 5.3, a Rs é calculada a partir dos demais parâmetros (k, α e N), portanto estes também podem ser considerados adequados.

Comparando-se as tabelas 7 e 9, nota-se que os números de prato teóricos (N) da última tabela são menores. O parâmetro N é o indicador da eficiência da coluna, quanto menor o seu valor, pior a eficiência de separação da coluna e também menor a amplitude do pico cromatográfico (CUNICO, GOODING e WHER, 1998; CASS e DEGANI, 2001). Tendo em vista que a Tabela 7 apresenta os valores obtidos usando-se a coluna usada na USP, enquanto a Tabela 9, os resultados obtidos com a coluna usada na UFMA, entende-se que esta última apresentou menor eficiência na separação e identificação dos picos referentes aos quatro hormônios estudados. Tal observação corrobora com a possibilidade, apontada no tópico 4.5, de que a coluna cromatográfica usada no NARP pode ter contribuído para a menor resolução dos picos.

5.7 Volume de ruptura

Com o intuito de se conseguir aumentar o fator de concentração, foram realizados testes para determinação do volume de ruptura. A Figura 20, ilustra o comportamento das recuperações obtidas para cada volume de amostra e tipo de analito tratados. A linha na cor laranja indica o menor valor (70%) considerado aceitável para as recuperações.

Percebe-se que para estradiol e etinilestradiol, no volume de 600 mL obteve-se recuperações próximas a 70%. Para 800 e 1000 mL, os valores de recuperação foram inferiores à faixa adequada. Os volumes de 200 e 400 mL apresentaram recuperações adequadas.

No caso da recuperação para 600 mL, observa-se nitidamente que, mesmo com a variação dos resultados (barras de dispersão), obteve-se recuperação inferior a 70%. Considerando-se que a recuperação das substâncias são dependentes, esta condição foi limitante para a avaliação dos resultados obtidos para os demais analitos. Portanto, verificando-se que para o volume de 200 e 400 mL, todos os estrógenos apresentaram resultado satisfatório, selecionou-se o volume de 400 mL como sendo o adequado para a pré-concentração da amostra.

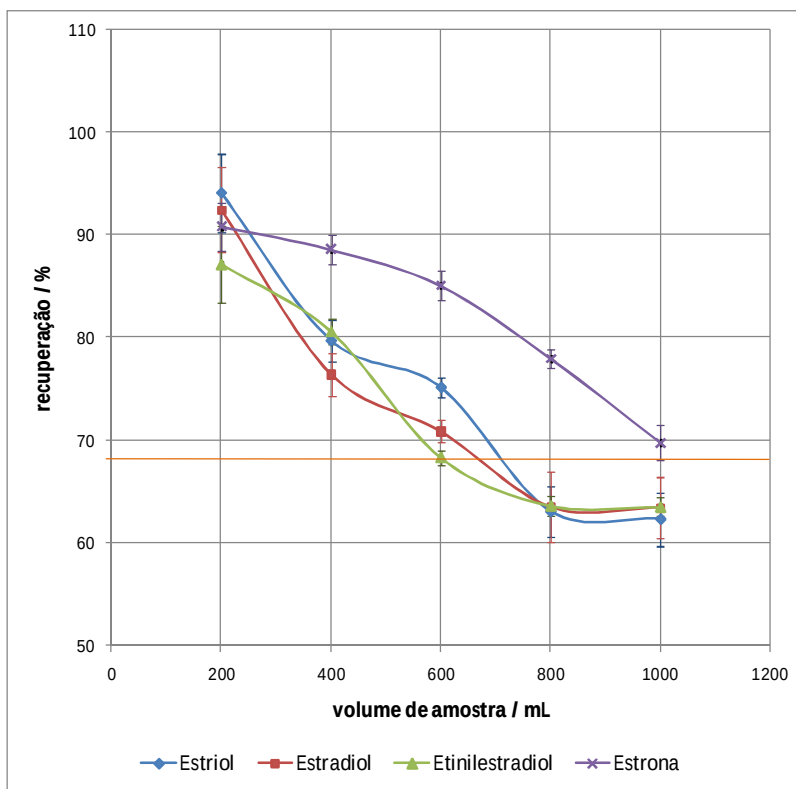


Figura 20. Avaliação do volume de ruptura, mediante aplicação do procedimento P-2, com cartucho C₁₈ e 3 µg de cada substância.

Desta forma, sabendo que o extrato, após secagem em nitrogênio, foi reconstituído em 0,5 mL de MeOH, o fator de concentração passou a ser de 800 vezes. O tempo total de preparo da amostra para a análise cromatográfica foi aproximadamente de 4 h, considerado

adequado para análise de rotina, em relação a outros métodos de análises laboratoriais conhecidos.

5.8 Validação do método

5.8.1 Curva analítica, linearidade, LD e LIQ

A Figura 21 apresenta as curvas analíticas construídas para cada estrógeno, a partir das quais foram extraídas as informações apresentadas na Tabela 10.

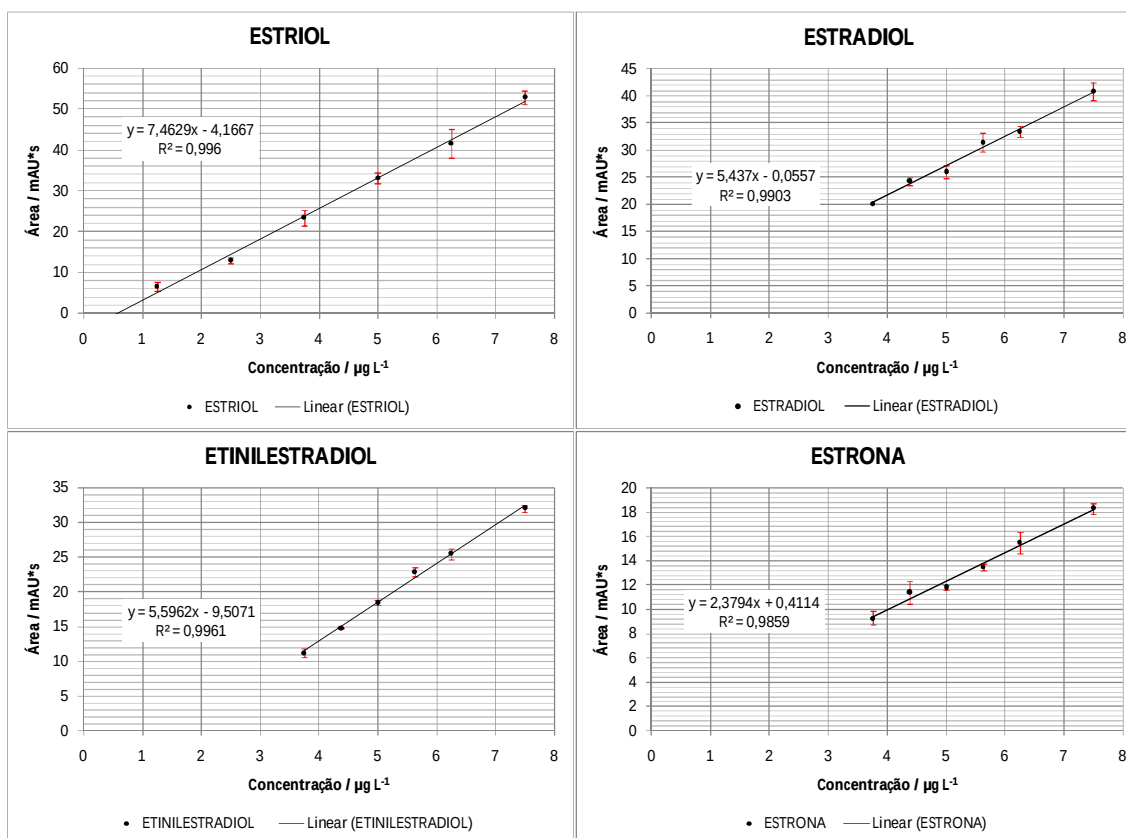


Figura 21. Curvas analíticas do método individuais para cada estrógeno. Condições cromatográficas: FM ACN:H₂O (gradiente), fluxo de 1 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL, $\lambda = 280$ nm, temp. ambiente = 27 °C

Tabela 10. Curvas analíticas, coeficientes de regressão e limites de detecção e de quantificação do método

Substância	Faixa de aplicação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Curva analítica	r^2	LD* ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LIQ* ($\mu\text{g L}^{-1}$)
estriol	1,25 – 7,50	$y = 7,4629x - 4,1667$	0,996	0,0625	1,25
17 β -estradiol	3,75 – 7,50	$y = 5,437x - 0,0557$	0,9903	1,25	3,75
17 α -etinilestradiol		$y = 5,5962x - 9,5071$	0,9961		
estrona		$y = 2,3794x + 0,4114$	0,9859		

* LD = limite de detecção e LIQ = limite inferior de quantificação.

O método foi linear na faixa de 1,25 a 7,50 $\mu\text{g L}^{-1}$, para estriol e de 3,75 a 7,50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para as demais substâncias. Os coeficientes de regressão linear (r^2) resultaram em valores maiores que 0,98, e os desvios-padrão relativos de cada ponto das curvas de calibração também foram adequados (Figura 22). Tais resultados indicam que, nesta faixa, o método de separação cromatográfica é seguramente adequado para a determinação dos analitos de interesse, já que este valor atende o especificado pela ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL..., 2003a).

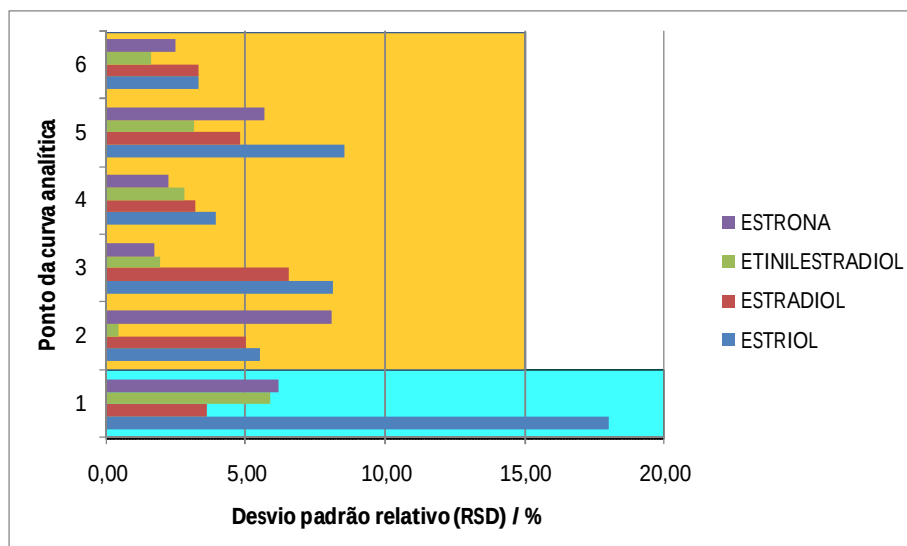


Figura 22. Flutuação dos desvios padrão relativos calculados a partir das áreas obtidas na construção das curvas analíticas. As regiões em destaque representam a faixa de valores adequados

Os limites de detecção (LD) e inferior de quantificação (LIQ) do método foram determinados através da análise da matriz contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitáveis. Considerando que o extrato final, após a EFS, apresenta concentração 800 vezes maior que na amostra original, pode-se

inferir que a faixa linear apresentada na Tabela 10 corresponde à variação de 1000 a 6000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para estriol, e de 3000 a 6000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os demais hormônios.

Comparando-se os valores de LD e LIQ da Tabela 10 com a concentração de estrógenos encontrada na água potável de diferentes países, conforme apresentado na Tabela 2, percebe-se que aqueles são significativamente menores que estes. Excetua-se a esta afirmação, a concentração, ao nível de $\mu\text{g L}^{-1}$ (ppb), quantificadas por Ghiselli (2006), que encontram-se dentro da faixa determinada para o método desenvolvido.

Observando-se as tabelas 2 e 3, é possível compreender que os baixos valores quantificados por Kuch e Ballscmiter (2001); Aherne e Briggs (1989); Sodré et al (2007); Rodriguez-Mozaz et al (2004) e Boyd et al (2003) foram alcançados mediante a utilização dos detectores de fluorescência (FLU) e de espectrofotômetro de massa (EM), sabidamente bem mais sensíveis e seletivos que o DAD, para a classe de substâncias em questão (CASS e DEGANI, 2001).

5.8.2 Precisão, exatidão e recuperação

Na Tabela 11, são mostrados os resultados de recuperação, precisão e exatidão obtidos para cada estrogênio estudado, medidos em três níveis de fortificação e com cinco repetições para cada ponto.

Tabela 11. Resultados de recuperação, precisão e exatidão obtidos para cada hormônio estrógeno em três níveis de fortificação e cinco repetições (n=5)

Substância	Nível	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação ^a (%)	t_{calc} ^b	RSD ^c (%)	Exatidão (%)
Estriol	baixo	1,25	94 (80-119)	-0,6870	19,40	109,41
	médio	3,75	85 (77-91)	-5,3908	0,07	99,22
	alto	6,25	98 (87-104)	-0,8137	0,06	99,66
Estradiol	baixo	3,75	73 (70-75)	-34,3382	2,41	100,62
	médio	5,00	84 (77-89)	-7,0292	6,34	96,73
	alto	6,25	103 (95-109)	1,2753	5,44	101,69
Etinilestradiol	baixo	3,75	81 (70-91)	-4,8067	11,22	94,96
	médio	5,00	107 (101-117)	1,8603	6,27	102,95
	alto	6,25	104 (100-105)	2,0367	3,11	100,09
Estrona	baixo	3,75	96 (87-105)	-1,4606	6,80	96,26
	médio	5,00	101 (91-107)	1,4907	6,56	91,52
	alto	6,25	104 (97-107)	1,3204	5,79	104,69

^a Corresponde à média aritmética dos valores e entre parênteses os valores mínimo e máximo, respectivamente;

^b “t” de Student calculado segundo a equação do tópico 4.8.5; ^c desvio padrão relativo (precisão)

Os níveis de fortificação cobrem toda a faixa linear dinâmica do método, conforme orientação da ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL..., 2003a), e correspondem a 1,25; 3,75 e 6,25 $\mu\text{g L}^{-1}$, para estriol, e 3,75; 5,00 e 6,25 $\mu\text{g L}^{-1}$, para estradiol, etinilestradiol e estrona.

Os valores encontrados para t_{calc} indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre as recuperações obtidas e o valor desejado de 100%, já que todos eles são menores do que o t_{tab} (2,132 – Anexo 1). Ademais, todos os valores calculados para exatidão encontram-se dentro da faixa adequada de 80 a 120%. Portanto, é possível afirmar que o método desenvolvido é exato.

Conforme estabelece a ANVISA (2003a), o nível baixo de fortificação deve corresponder ao LIQ e permite-se RSD até o máximo de 20%, para os outros níveis RSD não deve ultrapassar 15%. Deste modo, observa-se que todos os valores da tabela para RSD encontram-se dentro dos limites estabelecidos, permitindo-se afirmar que o método desenvolvido é também preciso.

Desta maneira, considerando que os resultados foram obtidos num mesmo dia, pelo mesmo analista, no mesmo local e empregando o mesmo equipamento, com injeções repetidas em curto intervalo de tempo, pode-se afirmar que o método apresenta boa repetitividade.

5.9 Método desenvolvido para análise de hormônios estrógenos

Após determinados os procedimentos de coleta, conservação e transporte, preparo das amostras e extração em fase sólida, e após determinadas as condições cromatográficas para a detecção das substâncias estrógenas E3, E2, E1 e EE2, o método otimizado, está esquematizado na Figura 23.

O método esquematizado na Figura 23 foi submetido a processo de validação, obtendo-se valores de recuperação, precisão exatidão e linearidade adequados, de modo a garantir resultados confiáveis ao ser usado na determinação dos hormônios 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol, estriol e estrona em água potável.

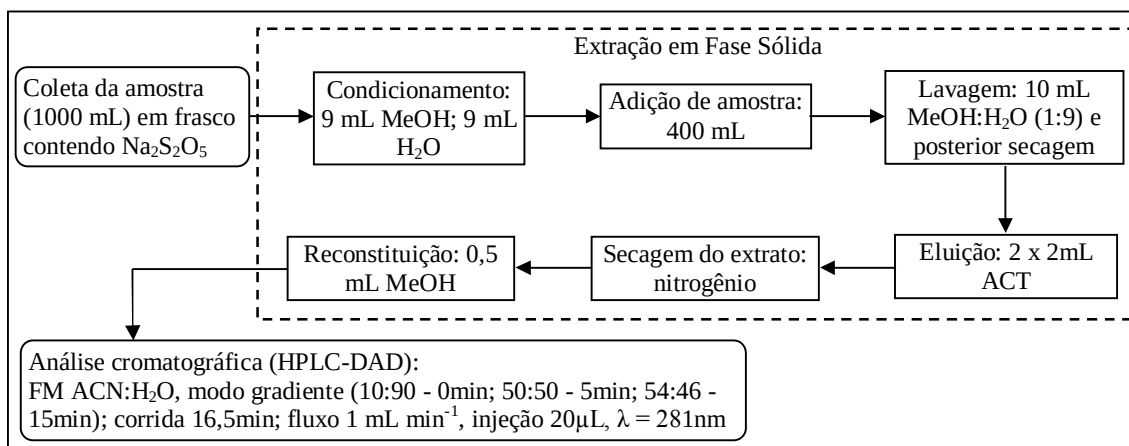


Figura 23. Fluxograma do método analítico otimizado para determinação dos hormônios estrógenos E3, E2, E1 e EE2 em água potável

5.10 Aplicação do método desenvolvido e validado na determinação de resíduos de hormônios estrógenos em água potável distribuída na cidade de São Luís

As amostras de água potável foram coletadas no dia 17 de abril de 2009, sendo duas na saída de duas ETAs distintas, uma em um reservatório de distribuição de água e outras duas na rede de distribuição de água, já no ponto disponível para uso do consumidor. A Tabela 12 resume os dados das amostras coletadas e submetidas à análise de E1, E2, EE2 e E3.

Tabela 12. Identificação das amostras coletadas para análise de E1, E2, EE2 e E3

Código	Local	Data	Hora
Am1	Saída da ETA 1	17/04/2009	10:10
Am2	Saída da ETA 2		11:36
Am3	Reservatório		11:55
Am5	Rede de distribuição 1		12:54
Am6	Rede de distribuição 2		13:15

Em conjunto com as amostras em análise, foram preparadas quatro amostras de controle do método, denominadas “controle de qualidade” (CQ), de maneira a assegurar a correta execução deste e facilitar a identificação de algum erro durante alguma etapa da análise em curso. Uma das amostras foi fortificada no nível do LIQ (CQ-LIQ), uma em concentração baixa menor ou igual a três vezes menor o LIQ (CQB), outra em concentração igual à média aritmética entre CQB e a concentração alta (CQA) e a última em concentração alta

equivalente à faixa de 75 a 90% (CQA) do último nível da curva analítica. Os valores exatos dos CQs para cada hormônio é apresentado na Tabela 13.

Tabela 13. Níveis usados no controle de qualidade durante aplicação do método

CQ*	Estriol ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Estradiol ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Etinilestradiol ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Estrona ($\mu\text{g L}^{-1}$)
CQ-LIQ	1,25		3,750	
CQB	3,75		5,000	
CQM	5,00		5,625	
CQA	7,50		7,500	

* CQ = controle de qualidade; CQ-LIQ = na concentração do limite inferior de quantificação; CQB = no nível baixo; CQM = no nível médio; CQ = no nível alto

Observando-se a Figura 24, é possível notar que não foram detectados picos de qualquer um dos hormônios nas amostras analisadas. Entretanto, mesmo a Amostra 3 tendo apresentado picos próximos dos t_R 's do estradiol ($\sim 12,6$ min) e do etinilestradiol ($\sim 14,0$ min), estes foram confirmados não serem relativos a hormônios mediante a comparação dos espectros de absorção fornecidos por estes sinais. O fato de tal amostra apresentar mais picos interferentes que as demais pode estar relacionado com o aspecto visivelmente mais turvo por ela apresentado, ocorrência que não era esperada por se tratar de água potável. Já que este acontecimento foi isolado, pode-se atribuir à tubulação próxima ou à torneira do ponto de coleta que se apresentavam sujos. Para ter avaliação mais criteriosa quanto a isto, recomenda-se que, em outro estudo, sejam avaliadas as influências das características físico-químicas da água neste método.

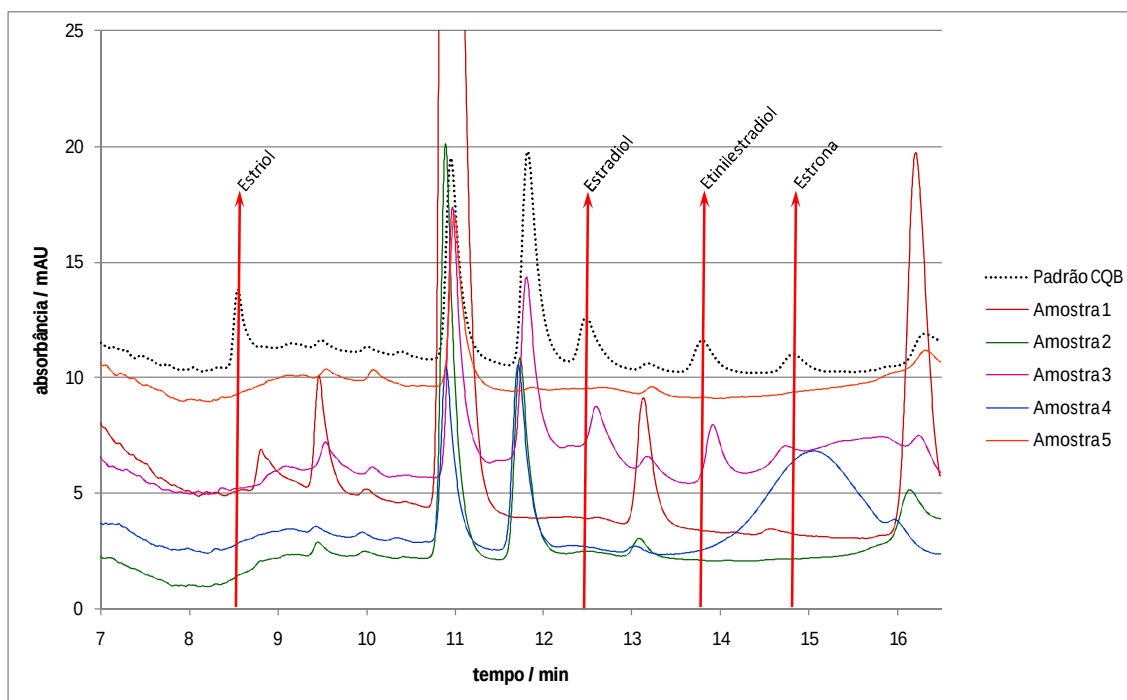


Figura 24. Sobreposição dos cromatogramas das 5 amostras analisadas e da amostra-testemunha fortificada em nível baixo (CQB)

Portanto, pode-se afirmar que os limites de detecção e inferior de quantificação do método não foram suficientemente baixos para a determinação destas substâncias em água potável, pois, conforme estudos mostrados na Tabela 2 (KUCH e BALLSCMITER, 2001; AHERNE e BRIGGS, 1989; GHISELLI, 2006; RODRIGUEZ-MOZAZ et al, 2004; BOYD et al, 2003 e LOPES, 2007), estas substâncias podem estar presentes em água potável.

6 CONCLUSÃO

O estudo possibilitou a separação cromatográfica dos hormônios estriol (E3), 17 β -estradiol (E2), estrona (E1) e 17 α -etinilestradiol (EE2) em tempo relativamente curto, apresentando os parâmetros cromatográficos fator de retenção (k), fator de separação (α), número de pratos teóricos (N) e resolução (R) com valores adequados.

O método de preparo da amostra, incluindo a descloração e o procedimento de extração em fase sólida (EFS), resultou em valores de recuperação dentro do limite aceitável, sendo considerado adequado.

O método desenvolvido foi considerado validado, após avaliação dos parâmetros: seletividade; linearidade; precisão; exatidão; limite inferior de quantificação; limite de detecção; recuperação e repetitividade, mostrando-se, portanto, seletivo, linear, exato e preciso para o procedimento de preparo da amostra e as condições cromatográficas estabelecidas.

Durante a aplicação do método validado às análises de amostras de água potável coletadas, observou-se que o mesmo não foi capaz de identificar ou quantificar hormônios estrógenos, seja porque encontravam-se em concentrações mais baixas que os limites do método, seja porque realmente não existiam hormônios presentes na água potável analisada, na época da coleta. Sabendo-se que o cloro residual presente na água potável pode degradar as substâncias estrógenas e que, antes de chegar à rede de distribuição, a água potável ao sair da ETA percorre mais de 56 Km de tubulação, pode-se também supor degradação dos hormônios durante o deslocamento em função do contato com cloro residual. Desta forma, é necessário pesquisar as águas naturais superficiais que são captadas para o tratamento, podendo-se assim investigar a remoção destas substâncias pelo processo de tratamento das ETAs.

Outrossim, os limites de detecção e de quantificação precisam ser diminuídos ao nível de ng L^{-1} , para garantir que o menor nível capaz de causar transtornos aos organismos seja identificado. Para tanto, faz-se necessária a utilização de detectores mais sensíveis, como espectrofotômetro de massas.

Ainda assim, a identificação destas substâncias em água, ou outra matriz, limita-se a indicar tendência da ocorrência de efeito desregulador endócrino pelo contato de organismos com a matriz contaminada. Para se avaliar a ocorrência e a extensão destes efeitos, seriam adequados ensaios ecotoxicológicos, embora tais técnicas não sejam seletivas, pois são inúmeras as substâncias capazes de causar interferências endócrinas.

REFERÊNCIAS

- ABREU, R. L. de. **Map of Maranhão state**. 29 abr. 2006. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Maranhao_MesoMicroMunicip.svg>. Acesso em: 06 abr. 2009.
- AERNI, H-R. et al. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 688-696, 2004.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2 jun. 2003a. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word>>. Acesso em: 25 nov. 2008.
- _____. **Institucional**: apresentação. 2003b. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/institucional/anvisa/apresentacao.htm>>. Acesso em: 18 nov. 2008.
- AGILENT TECHNOLOGIES. **Agilent SampliQ products for SPE**. abr. 2009. Disponível em: <<http://www.chem.agilent.com/Library/brochures/5989-9334EN.pdf>>. Acesso em: 17 maio 2009.
- AHERNE, G. W.; BRIGGS, R. The relevance of the presence of certain synthetic steroids in the aquatic environment. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 41, n. 10, p. 735-736, 1989.
- ALBERGUINI, L. B. A.; SILVA, L. C.; REZENDE, M. O. O. Laboratório de resíduos químicos do Campus USP-São Carlos – resultados da experiência pioneira em gestão e gerenciamento de resíduos químicos em um campus universitário. **Química Nova**. v. 26, n. 2, p. 291-295, 2003.
- ALBUQUERQUE, L. F. **Estudo da oxidação do metabissulfito de sódio contido no efluente da carcinicultura**. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.
- ALCÂNTARA, E. H. de. Caracterização da bacia hidrográfica do Rio Itapecuru, Maranhão. **Caminhos de Geografia** v. 7, n. 11, p. 97-113, fev. 2004.
- ALDA, M. J. L. et al. Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. **Journal of Chromatography A**. v. 1000, p. 503-526, 2003.
- ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 892, p. 391-406, 2000.
- ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-

phase extraction-liquid chromatography-diode array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 911, p. 203-210, 2001.

AMARANTE JUNIOR, O. P.; BRITO, N. M.; RIBELO, M. L. Desenvolvimento de método simples para a determinação de resíduos de diuron por cromatografia a líquido em amostras de laranja. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 15, jan./dez. 2005.

ARAÚJO, J. C. **Estudo da eficiência do tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara-SP na remoção de hormônios sexuais**. 2006. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DO MARANHÃO. **Projeto Itapecuru Águas Perenes**: Bacia do Rio Itapecuru. 2007a. Disponível em: <http://www.al.ma.gov.br/paginas/acoes_piap_bacia.php>. Acesso em: 20 nov. 2008.

_____. **Projeto Itapecuru Águas Perenes**: o projeto. 2007b. Disponível em: <http://www.al.ma.gov.br/paginas/acoes_piap.php>. Acesso em: 20 nov. 2008.

BAREL-COHEN, K. et al. Monitoring of natural and synthetic hormones in a polluted river. **Journal of Environmental Management**, v. 78, n. 1, p. 16-23, 2006.

BARONTI, C. et al. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. **Environmental Science and Technology**, v. 34, n. 24, p. 5059-5066, 2000.

BARROS NETO, B. de; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas, SP: Unicamp, 2007.

BELFROID, A. C. et al. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 101-108, 1999.

BILA, D. M. **Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17 β -estradiol pelo processo de ozonização**. 2005. 281 f. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Química) – Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

BILA, D. M. et al. Estrogenic activity removal of 17 β -estradiol by ozonation and identification of by-products. **Chemosphere**, v. 69, p. 736-746, 2007.

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

BOWMAN, J. C.; READMAN, J. W.; ZHOU, J. L. Sorption of the Natural Endocrine Disruptors, Oestrone and 17 β -Oestradiol in the Aquatic Environment. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 25, n. 1, p. 63-67, 2003.

BRASIL. Decreto 5.974, de 29 de novembro de 2006. Aprova a Estrutura Regimental e o Quadro Demonstrativo dos Cargos em Comissão e das Funções Gratificadas do Ministério da

Saúde, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 nov. 2006. Seção 1, p. 8.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. **Portaria MS n.º 518/2004**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 129-146, 2003.

CAMEL, V. Solid phase extraction of trace elements. **Spectrochimica Acta Part B**. v. 58, p. 1177-1233, 2003.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: EdUFSCar, 2001.

CUNICO, R. L.; GOODING, K. M.; WEHR, Tim. **Basic HPLC and CE of biomolecules**. Richmond, EUA: Bay Bioanalytical Laboratory, 1998.

D'AGOSTINHO, A.; FLUES, M. Determinação do coeficiente de distribuição (Kd) de benzo(α)pireno em solo por isotermas de sorção. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 657-661, 2006

DESBROW, C. et al. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. Chemical fractionation and in vitro biological screening. **Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 11, p. 1549-1565, 1998.

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

FARIA, L. J. da S. **Avaliação de diferentes sorventes na extração em fase sólida de pesticidas em água: desenvolvimento e validação de metodologia**. 2004. 61 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

GERBASE, A. E. et al. Gerenciamentos de resíduos químicos em instituições de ensino e pesquisa. **Química Nova**. v. 28, n. 1, p. 3, 2005.

GHISELLI, G. **Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP)**. 2006. 181 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**. v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.

GOMES, L. N. **Percepção ambiental da população da área de entorno do Parque Estadual do Bacanga, São Luís, Maranhão**. 2006. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006.

GOMES, R. L.; SCRIMSHAW, M. D.; NESTER, J. N. Determination of endocrine disrupters in sewage treatment and receiving waters. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 22, n. 10, p. 697-707, 2003.

GOOGLE MAPS. Disponível em: <<http://maps.google.com.br/maps?ndsp=18&hl=pt-BR&um=1&q=s%C3%A3o%20lu%C3%ADs&ie=UTF-8&sa=N&tab=il>>. Acesso em: 12 dez. 2008.

GREENSPAN, F. S.; GARDNER, D. G. **Basic and Clinical Endocrinology**. 7. ed. New York, EUA: McGraw-Hill, 2004.

GUIMARÃES, J. R. P. de F. **Disruptores endócrinos no meio ambiente: um problema de saúde pública e ocupacional**. mar. 2005. Disponível em: <http://www.acpo.org.br/biblioteca/01_artigos_dissertacoes_teses_manuais/artigos/joao_roberto.pdf>. Acesso em: 17 jul. 2008.

HELLER, L.; PÁDUA, V. L. de (org.). **Abastecimento de água para consumo humano**. Belo Horizonte: UFMG, 2006.

HOLTHAUS, K. I. E. et al. The potencial for estradiol and ethinylestradiol to sorb to suspended and bed sediments in some English rivers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 2526-2535, 2002.

HUBER, L. Validation of HPLC methods. **BioPharm**, v. 12, p. 64-66, mar. 1999.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos (DOQ-CGCRE-008)**. mar. 2003. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/kits/doqcgcre008r01.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2008.

INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL. **Abastecimento de água e esgotamento sanitário nas capitais brasileiras, 2004**. Campanha de Olho nos Mananciais. nov. 2007.

JOHNSON, A. C.; WILLIAMS, R. J. A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone, and ethinylestradiol at sewage treatment works. **Environmental Science & Technology**. v. 38, n. 13, p. 3649-3658, 2004.

KUCH, H. M.; BALLSCHMITER, K. Determination of endocrine disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. **Environmental Science and Technology**, v. 35, n. 15, p. 3201-3206, 2001.

LAI, K. M. et al. Binding of Waterborne Steroid Estrogens to Solid Phases in River and Estuarine Systems. **Environmental Science & Technology**, v. 34, n. 18, p. 3890-3894, 2000.

LANÇAS, Fernando M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004. 96 p.

LEE, H.-B.; PEART, T. E. Determination of 17 β Estradiol and its metabolites in Sewage effluent by solid phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 81, n. 6, p. 1209-1216, 1998.

LINTELMANN, J. et al. Endocrine Disruptors in the Environment (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n. 5, p. 631-681, 2003.

LOBATO, F. **Informe da Subregião América do Sul**. Fórum de Águas das Américas. Out. 2008. Disponível em: <http://arquivos.ana.gov.br/wfa/sa/WWF_South_American_Doc_finalversion_Portuguese.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2008.

LOPES, L. G. **Estudo sobre a ocorrência de estrógenos em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal – SP**. 2007. 121 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista: Araraquara, 2007.

MENDHAM, J. et al. **Vogel**: análise química quantitativa. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estrutura**: estrutura do Ministério da Saúde. 2008a. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/saude/area.cfm?id_area=378>. Acesso em: 25 nov. 2008.

_____. **Vigilância Ambiental**: vigilância em saúde ambiental. 2008b. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=975>. Acesso em 18 nov. 2008.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, SECRETARIA DE RECURSOS HÍDRICOS. **Plano Nacional de Recursos Hídricos**: Panorama e estado dos recursos hídricos do Brasil. v. 1. Brasília: MMA, 2006.

MMT PLANEJAMENTO E CONSULTORIA. **Programa de Recuperação Ambiental e Melhoria da Qualidade de Vida da Bacia do Bacanga**: Avaliação Ambiental Regional. jun. 2007. Disponível em: <<http://www.saoluis.ma.gov.br/documentos/Resumo%20executivo%20Junho%20v01.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2008.

MONTES, M. L. (sup.). **Zoneamento Geoambiental do Estado do Maranhão**. IBGE: Salvador, 1997. Disponível em: <<ftp://geofp.ibge.gov.br/documentos/recursosnaturais/diagnosticos/maranhao.pdf>>. Acesso em: 28 mar. 2009.

MORAES, D. S. de L.; JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**. n. 36, v. 3, p. 370-374, 2002

NOGUEIRA, J. M. F. Desreguladores endócrinos: efeitos adversos e estratégias para monitorização dos sistemas aquáticos. **Química**. n. 88, p. 65-71, 2003.

PANTER, G. H. et al. Transformation of a non-oestrogenic metabolite to an oestrogenically active substance by minimal bacterial activity. **Chemosphere**, v. 38, n. 15, p. 3579-3596, 1999.

PEREIRA, J. S. **A problemática dos recursos hídricos em algumas bacias hidrográficas brasileiras**. 1999. 26 f. Trabalho de Exame de Qualificação (Doutorado em Engenharia de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) – Instituto de Pesquisas Hidráulicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.

PINHEIRO JÚNIOR, J. de R. et al. Análise temporal da paisagem do Parque Estadual do Bacanga utilizando Imagens dos Satélites SPOT-3 e CBERS-2. In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, 13., 2007, Florianópolis. **Anais...** Santa Catarina, abr. 2007. Disponível em: <<http://marte.dpi.inpe.br/col/dpi.inpe.br/sbsr@80/2006/11.14.19.48/doc/1023-1030.pdf>>. Acesso em: 02 dez. 2008.

PROGRAMA DE MODERNIZAÇÃO DO SETOR SANEAMENTO. **Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento**: visão geral da prestação dos serviços de água e esgotos – 2004. Brasília: MCIDADES.SNSA, 2005.

PROGRAMA DE PLANEJAMENTO E GESTÃO TERRITORIAL. **Bacias Hidrográficas**. 2006. Disponível em: <<http://www.ppgt.ma.gov.br/pagina.php?IdPagina=108>>. Acesso em: 10 dez. 2008.

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

REIS FILHO, R. W.; BARREIRO, J. C.; VIEIRA, E. M.; CASS, Q. B. Fármacos, ETEs e corpos hídricos. **Revista Ambi-Água**. Taubaté, v. 2, n. 2, p. 54-61, 2007.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, D. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1045, p. 85-92, 2004.

ROLOFF, G. A. **Degradação do hormônio estradiol por eletrólise, fotólise e fotoeletrocatalise**. 2007. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

ROZENFELD, S. Terapia hormonal para a menopausa (TH): múltiplos interesses a considerar. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 12, n. 2, p. 437-442, 2007.

SANTOS, T. C. R. dos. **Pré-concentração de compostos orgânicos em amostras ambientais**. São Luís: UFMA, 2001. Não publicado.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado de Economia e Planejamento. **Região Metropolitana de Campinas**. São Paulo, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ppa.sp.gov.br/perfis/PerfilRMCampinas.pdf>>. Acesso em: 26 mar. 2009.

SCHÄFER, A. I.; NGHIEM, L. D.; WAITE, T. D. Removal of natural hormone estrone from aqueous solutions using nanofiltration and reverse osmosis. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 182-188, 2003.

SILVA, R. N. M. et al. Oferta e demanda de água na ilha de São Luís. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 23., 2005, Campo Grande. **Livro de resumos...** Mato Grosso do Sul: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005a. Disponível em: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/abes23/IV-003.pdf>>. Acesso em: 26 nov. 2008.

_____. Percepção ambiental do rio Itapecuru, nas cidades de Pirapemas, Cantanhêde, Itapecuru Mirim, Bacabeira, Santa Rita e Rosário. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 23., 2005, Campo Grande. **Livro de resumos...** Mato Grosso do Sul: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005b. Disponível em: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/abes23/VI-007.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2008.

SIMIONATO, M. **Estudo acha hormônio sexual em água na região de Campinas**. Folha online. Dez. 2006. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/folha/cotidiano/ult95u129198.shtml>>. Acessado em: 11 jan. 2008.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. São Paulo: Cengage Learning, 2008.

SODRÉ, F. F. et al. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil). **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.** v. 2, n. 2, p. 187-196, 2007.

SOLID PHASE EXTRACTION APPLICATION GUIDE. Alemanha: Macherey-Nagel, 2008. 256 p.

STANDARD METHODS for the examination of water and wastewater. 20. ed. Maryland: WEF, APHA, AWWA, 1998.

TEIXEIRA, M. do P. S. S.; TEIXEIRA, A. M. S. A preservação do Parque Estadual do Bacanga a partir de uma proposta didático-pedagógica. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA, 1., 2008, Belo Horizonte. **Anais...** Minas Gerais: Centro Federal de Educação Tecnológica, 2008. Disponível em: <http://www.senept.cefetmg.br/galerias/Arquivos_senept/anais/terca_tema4/TerxaTema4Artigo4.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2008.

TERNES, T. A. et al. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 81-90, 1999.

_____. Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater? **Water Research**, v. 37, p. 1976–1982, 2003.

THERMO FISCHER SCIENTIFIC. **Global Acetonitrile Shortage**. 2008. Disponível em: <<http://www.separatedbyexperience.com/pages/pages.php?page=acetonitrile>>. Acesso em: 21 jan. 2009.

YING, G-G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y-J. Ocorrência and fate of hormone steroids in the environment. **Environment International**. n. 28, p. 545-551, 2002.

ANEXOS

Anexo 1 – Distribuição dos valores do teste “t” de Student.

GL (n)	t_{95%} (v=0,05)	t_{95%} (v =0,025)
1	6,314	12,706
2	2,920	4,303
3	2,353	3,182
4	2,132	2,776
5	2,015	2,571
6	1,943	2,447
7	1,895	2,365
8	1,860	2,306
9	1,833	2,262
10	1,812	2,228
11	1,796	2,201
12	1,782	2,179
13	1,771	2,160
14	1,761	2,145
15	1,753	2,131
16	1,746	2,120
17	1,740	2,110
18	1,734	2,101
19	1,729	2,093
20	1,725	2,086

Fonte: Adaptado de Barros Neto; Scarminio e Bruns (2007).

Neste trabalho usou-se os testes “t” de Student com 95% de significância. No caso de comparação entre médias de recuperação de dois procedimentos independentes, foi usada a terceira coluna, com “v” igual a 0,025, para avaliação das hipóteses. Nos demais casos, foi usada a segunda coluna.

Verbinnen, Raphael Teixeira

Estabelecimento de condições analíticas para determinação de hormônios estrógenos em água potável distribuída na cidade de São Luís-MA/ Raphael Teixeira Verbinnen. – São Luís, 2009.
93 f.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Gilvanda Silva Nunes
Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Maranhão, 2009.

1. Água-poluição. 2. Hormônios estrógenos. I. Título.

CDU 628.193:612.621.31