



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE INTERFERENTES ENDÓCRINOS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS

SILVA, M. N.¹, VIDAL, C. B.¹, NASCIMENTO, R. F.¹, BECKER, H.¹

¹ Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Analítica e Físico-Química

E-mail para contato: nataniela06@hotmail.com

RESUMO – Os estrógenos naturais e sintéticos estão incluídos na classe de substâncias que, mesmo em baixas concentrações, são capazes de causar interferência no sistema endócrino, afetando a saúde, crescimento e reprodução de organismos aquáticos e humanos, sendo classificados como interferentes endócrinos (IE). Tendo em vista a crescente preocupação ambiental dedicada a esses compostos, este trabalho tem por objetivo desenvolver e validar um método analítico para determinação dos hormônios estrógenos naturais: Estrona, 17 β -estradiol e Estriol e o hormônio sintético 17 α -etinilestradiol, como também do composto cafeína, que pode ser usado como um indicativo de contaminação antrópica, nas águas do açude Santo Anastácio, reservatório parcialmente localizado na Universidade Federal do Ceará. Foi utilizada a extração em fase sólida (SPE) seguida de análise no HPLC. Os parâmetros de validação utilizados foram: exatidão, precisão, linearidade, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ). Os LD e LQ do método, variaram, de 0,12 a 0,91 ng mL⁻¹ e 0,41 a 3,31 ng mL⁻¹, respectivamente. Para avaliação da distribuição dos estrógenos e do estimulante cafeína no reservatório foram selecionados três pontos amostrais para as coletas de água, como resultados, foram obtidas as concentrações do estimulante cafeína variando de 0,54 – 0,93 μ g L⁻¹, e não foram detectadas concentrações de IE estudados, o que se deve provavelmente aos altos valores de K_{ow} (Coeficiente de partição octanol/água) desses micropoluentes.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional e o avanço da ciência inseriram no mercado uma variedade de compostos ou substâncias químicas com os mais variados usos, medicamentos de várias classes, produtos de higiene pessoal, defensivos agrícolas, entre outros, os quais tem se tornado uma

PROMOÇÃO



REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

preocupação, mediante as condições de saneamento em que a maioria dos países se encontra. Quando dispostos no meio ambiente, mesmo em baixas concentrações, na faixa de μg e ng , possuem potencial para causar danos ambientais tanto para o ser humano e seus descendentes, como para a fauna aquática. Debates políticos e os interesses científicos têm crescido nas últimas duas décadas, sobre os potenciais efeitos adversos causados pela exposição a um grupo de produtos químicos que são capazes de alterar o funcionamento normal do sistema endócrino da fauna silvestre e, potencialmente, dos seres humanos (WHO, 2002). Esse assunto emergiu devido ao aumento na detecção de anomalias no homem, como problemas de infertilidade e aumento na taxa de câncer nos órgãos reprodutores (VIDAL, 2015).

Os principais IE podem ser classificados com substâncias naturais ou sintéticas, dentre as quais podem ser citados: pesticidas como atrazina; subprodutos da degradação de alquilfenóis polietoxilados como 4-nonilfenol (NP); hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA); aditivos plastificantes como dietilhexilftalato (DEHP); compostos industriais como bisfenol A (BPA); metais pesados como cádmio, mercúrio e chumbo; hormônios sintéticos como dietilestilbestrol (DES) e 17α -etinilestradiol (EE2); fitoestrogênios como genisteína e metaresinol e os hormônios naturais estrona (E1), 17β -estradiol (E2) e estriol (E3). Maior destaque é dado aos hormônios naturais E1, E2 e E3, e o hormônio sintético EE2, principal substância ativa do contraceptivo oral, por apresentarem elevada atividade estrogênica.

Devido a sua incompleta remoção nos processos convencionais de tratamento, e ao lançamento indevido de esgotos *in natura*, esses compostos chegam a rede de abastecimento pública. Com o aumento populacional e das taxas de urbanização verificadas nas cidades, espera-se um aumento dos volumes de esgoto gerados e da quantidade de estrogênios lançados continuamente em corpos receptores, muitos dos quais possuem baixa capacidade de diluição (WATKINSON *et al.*, 2007).

A maioria dos IE possui características lipofílicas e, frequentemente, apresentam baixa biodegradabilidade no ambiente, apresentando um grande potencial para bioacumulação e persistência no ambiente (CARBALLA *et al.*, 2007).

Um dos principais desafios no monitoramento dos IEs em matrizes ambientais é a dificuldade em encontrar métodos analíticos confiáveis, principalmente devido às baixas concentrações em que se encontram no meio ambiente. Atualmente, entre os métodos de análise mais utilizados, a cromatografia gasosa, e líquida de alta eficiência, em conjunto com a espectrometria de massa, têm sido as técnicas mais utilizadas na separação, identificação e quantificação dos IEs. No entanto, trata-se de equipamentos que apresentam custo elevado e requerem mão de obra qualificada, dificultando assim, o acesso a estes equipamentos, por muitas instituições de pesquisa. Desta forma, a disponibilização de métodos analíticos confiáveis, utilizando equipamentos de menor custo e maior facilidade na operação se torna essencial.

Portanto, diante dessa contextualização e tendo em vista a crescente preocupação ambiental dedicada aos interferentes endócrinos, este trabalho tem por objetivo verificar a ocorrência do estimulante CAF e dos hormônios estrógenos naturais E1, E2, E3 e o EE2 em águas superficiais, utilizando a técnica de extração em fase sólida (SPE) seguida de análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (HPLC-DAD).

PROMOÇÃO



REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



2. METODOLOGIA

O desenvolvimento experimental consistiu na determinação dos hormônios naturais estrona (E1), 17β -estradiol (E2), estriol (E3), do hormônio sintético 17α -etinilestradiol (EE2) e do estimulante cafeína (CAF), em amostras ambientais coletadas do açude Santo Anastácio (ASA) empregando a extração através do método SPE, seguida pela determinação analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodo (HPLC/DAD).

Foram escolhidos três pontos distintos do açude (Figura 1), de forma a detectar as influências mais representativas da fonte poluidora desse corpo d'água, que consiste principalmente do despejo do esgoto sanitário das comunidades ribeirinhas.



Figura 1 – Mapa indicando os pontos de coleta do reservatório (Santo Anastácio). ASA1 - próximo às habitações da comunidade; ASA2 - ponto central do reservatório e ASA3 - próximo à sua barragem.

2.1 Método para extração e análise dos compostos em água superficial

A metodologia de extração e pré-concentração utilizada para determinação dos analitos foi adaptada de Vidal (2015), sendo realizada as seguintes etapas: acidificação da amostra → filtração à vácuo → extração em fase sólida → Eluição → análise do eluato em HPLC-DAD.



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

2.2 Validação do método analítico

Segundo Lanças (2004), a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

A validação do método analítico do presente trabalho foi realizada seguindo os critérios de documentos usualmente utilizados (ANVISA, 2003; INMETRO, 2006; LANÇAS, 2004) e literatura científica (RIBANI et al., 2004).

Para comprovar a linearidade do método analítico foram construídas curvas de calibração com sete níveis de concentrações dos analitos estudados, sendo a faixa de trabalho entre 0,05 e 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

As curvas analíticas obtidas por padronização externa e com superposição da matriz foram analisadas em triplicatas e a linearidade foi avaliada pelo método de regressão linear, sendo calculado o coeficiente de correlação linear (R), devendo este apresentar um valor igual ou superior a 0,99, recomendando pela ANVISA 2003.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método foram calculados a partir do método baseado em parâmetros da curva analítica, uma vez que esse método é considerado de maior confiabilidade, pois leva em consideração o intervalo de confiança da regressão linear (RIBANI *et al.*, 2004). As equações utilizadas para o cálculo do LD e LQ são apresentadas nas equações 1 e 2.

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (1)$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (2)$$

Onde: s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e S é a inclinação (“*slope*”) ou coeficiente angular da curva analítica (ANVISA, 2003).

A precisão foi determinada com base nas áreas dos picos e tempo de retenção dos compostos de uma mesma amostra. A amostra (água de açude) foi dopada com 0,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos analitos de interesse seguida de extração por SPE. Foram realizadas dez injeções repetitivas e sequenciais do extrato, sendo calculado o coeficiente de variação (CV), de acordo com a Equação 3.

PROMOÇÃO



REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

$$RDS(\%) \text{ ou } CV(\%) = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração Média}} \times 100 \quad (3)$$

A exatidão do método foi calculada como percentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra. A recuperação foi calculada segundo a Equação 4.

$$R(\%) = \left(\frac{c_1 - c_2}{c_3} \right) \times 100 \quad (4)$$

Onde: C_1 = concentração do analito na amostra fortificada; C_2 = concentração do analito na amostra não fortificada; C_3 = concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O estudo constituiu de três coletas em três pontos, ASA 1, ASA 2 e ASA 3. Foi detectado apenas o composto cafeína no ponto ASA 1, nas três companhias amostrais foram encontrados os valores de $0,54 \mu\text{g L}^{-1}$; $0,93 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,79 \mu\text{g L}^{-1}$.

A cafeína é considerada uns dos principais indicadores no aporte de espécies antrópicas em sistemas aquáticos naturais (CHEN, 2002). A presença deste composto está relacionada diretamente com o despejo de esgoto doméstico não tratado nessas matrizes, o que indica o elevado nível de degradação em que se encontram o corpo hídrico. A concentração de cafeína encontrada no primeiro ponto (ASA1) confirma o que era esperado, uma vez que a comunidade lança seu esgoto sanitário diretamente no corpo hídrico, sem nenhum tratamento, já nos segundo e terceiro pontos (ASA2 e ASA3) não foram detectados a presença de cafeína, o que pode ser devido a uma provável biodegradação natural desse composto ao longo do corpo hídrico.

Já para os IE, não foram detectados níveis significativos dos mesmos nas amostras analisadas, provavelmente devido aos seus altos valores de coeficiente de partição (K_{ow}).

O coeficiente de partição é a distribuição de uma substância química entre duas fases, seja ela abiótica como água, sedimentos suspensos ou de fundo, ou biótica como plantas e animais, que estão em equilíbrio ou estado estacionário (GHISELLI et al. 2007). O K_{ow} é expresso pela razão da concentração da substância química nas duas fases avaliadas. Este parâmetro aumenta com o aumento da hidrofobicidade de uma substância, isto é, quanto maior o valor de K_{ow} , maior será a hidrofobicidade e maior será a afinidade da substância pela matéria orgânica (GHISELLI et al. 2007).

Os valores do coeficiente de correlação (r) obtidos pelas curvas analíticas, com intervalo linear de $0,05 - 8,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, construídas no solvente metanol e na matriz revelaram-se adequados para os todos os analitos estudados (Tabela 1), sendo obtida uma correlação linear satisfatória.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO



Tabela 1: Resultados obtidos para as curvas analíticas.

Composto	Solvente		Matriz	
	Equação ($y = ax + b$)	r	Equação ($y = ax + b$)	r
Estrona (E1)	$y = 72442x - 23420$	0,997	$y = 15732x - 1218,2$	0,998
17 β estradiol (E2)	$y = 62271x - 16635$	0,998	$y = 11087x + 960,24$	0,996
Estriol (E3)	$y = 157389x - 42076$	0,997	$y = 35298x - 1863,7$	0,999
17 α etinilestradiol (EE2)	$y = 70075x - 19528$	0,998	$y = 12597x + 1068,2$	0,999
Cafeína (CAF)	$y = 353799x - 79486$	0,999	$y = 252568x - 7069,8$	0,997

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica (coeficientes angular e linear), conforme equações 1 e 2. Os valores calculados são apresentados na Tabela 2. Os valores de LQ e LD obtidos neste trabalho são considerados satisfatórios quando comparados com outros estudos da literatura.

Tabela 2: Parâmetros obtidos pela curva analítica.

Composto	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Estrona (E1)	0,39	1,29
17 β estradiol (E2)	0,89	2,97
Estriol (E3)	0,99	3,31
17 α etinilestradiol (EE2)	0,26	0,86
Cafeína (CAF)	0,12	0,41

Pessoa (2012) determinou a presença de hormônios nos efluentes e afluentes de estações de tratamento de esgotos em Fortaleza/CE utilizando extração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, encontrando valores de LQ entre 0,117 – 4,72 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os hormônios E1 E2, EE2; no presente trabalho os LQ para os mesmos compostos variaram de 0,86 – 2,97 $\mu\text{g L}^{-1}$.

A exatidão do método analítico foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, os quais foram realizados utilizando amostras ambientais dopadas em três níveis de concentração (120 $\mu\text{g L}^{-1}$, 12,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1,6 $\mu\text{g L}^{-1}$), sendo um nível alto, um intermediário e um baixo. Posteriormente a dopagem, foi executado o método de extração seguida da análise por HPLC-DAD. Na Tabela 3 estão apresentados os resultados dos percentuais de recuperação dos analitos em três níveis de concentração.

Tabela 3: Resultados de recuperação média (n = 5) e coeficiente de variação (CV%)

Composto	120 µg L ⁻¹	12,8 µg L ⁻¹	1,6 µg L ⁻¹
Estrona (E1)	79,96 ± 2,43	130,90 ± 8,48	57,92 ± 2,55
17β Estradiol (E2)	85,85 ± 3,52	107,23 ± 18,00	20,15 ± 4,00
Estriol (E3)	73,40 ± 4,56	87,87 ± 4,40	47,30 ± 2,30
17α etinilestradiol (EE2)	108,65 ± 3,15	83,68 ± 13,30	70,81 ± 10,02
Cafeína (CAF)	89,70 ± 1,14	85,77 ± 2,81	82,09 ± 7,59

A partir dos dados apresentados na Tabela 3, observou-se que as melhores percentagens de recuperações dos analitos foram obtidas no nível mais alto de concentração. Para o nível mais baixo de concentração, podemos observar os menores percentuais de recuperação, com precisão de até ± 20%, que segundo Ribani (2004), podem ser aceitos.

4. CONCLUSÃO

O desenvolvimento e validação da metodologia analítica para a identificação e quantificação dos IE e do estimulante cafeína, em águas superficiais utilizando a técnica de extração em fase sólida (SPE), seguida de análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos mostrou-se eficiente e com baixos valores de LD e LQ comparáveis com outras técnicas cromatográficas ditas mais sensíveis.

O método cromatográfico utilizado foi considerado validado, uma vez que os resultados de seletividade, linearidade, precisão e recuperação mostraram-se satisfatórios quando comparado com valores estimados na literatura.

Pelas análises das amostras ambientais realizadas não foi detectado a presença de nenhum dos estrógenos estudados, entretanto a cafeína foi quantificada em um dos pontos de coleta (ASA 1), o que se deve provavelmente aos altos valores de Kow (Coeficiente de partição octanol/água) desses micropoluentes.

5. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Resolução RE n°899 de 29/05/2003.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2003.

AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*. **Peer-Verified Methods Program: Manual on Policies and Procedures**, Arlington, VA. 1998.



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

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

CARBALLA, M.; OMIL, F.; TERNES, T.; LEMA, J.M. **Fate of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge.** Water Research, v. 41, p. 2139-2150, 2007.

GUEDES, J. A. C. **Validação de método analítico empregando QuEChERS e CG-EM para determinação multirresíduo de agrotóxico em goiaba.** Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos.** DOQ-CGCRE-008. 2006.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise.** São Carlos: Rima, 2004.

PESSOA, G. P. **Avaliação de desreguladores endócrinos e do micropoluente colesterol em estações de tratamento de esgoto sanitário.** Tese (Doutorado em Engenharia Civil-Saneamento Ambiental) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

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

VIDAL, C. B. **Desreguladores endócrinos presentes em matrizes ambientais: análise por SPE-HPLC e remoção com argila pilarizada.** Tese Doutorado (Doutorado em Engenharia Civil-Saneamento Ambiental) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

WATKINSON, A. J., MURBYC, E. J., COSTANZO, S. D. **Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling.** Water Research, v. 41, p. 4164 – 4176, 2007.

WHO -World Health Organization. **Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors.** 2002.

PROMOÇÃO



REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO

