

Juliana Coutinho de Araújo

Estudo da eficiência do tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara-SP na remoção de hormônios sexuais

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências (Química Analítica)

Orientadora: Profa. Dra. Eny Maria Vieira

São Carlos
2006

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original,
sob exclusiva responsabilidade de autor.

São Carlos, 20 abril de 2006.

Juliana Coutinho de Araújo

A Deus...

*Aos meus pais, Alberto e Elisabete,
Aos meus irmãos, Carolina e Adalberto
Ao meu marido Roberto,*

*Por todo amor, confiança e incentivo em
todos os momentos...*

Agradecimentos

À Profa. Dra. Eny Maria Vieira pela orientação, amizade e confiança.

Ao meu marido Roberto pelo amor, aporte científico, incessante ajuda e constante incentivo.

À minha família (pai Alberto, mãe Bete, irmã Carol, cunhado Eric, irmão Dal, cunhada Lu, meus sobrinhos Laura e Carlinhos), pela confiança, amor e serenidade.

Aos meus sogros Lígia e Paulo, cunhados Márcia e Edu pelo carinho, apoio e amizade.

Ao amigo Ricardo Reis pela amizade, contribuição científica e pelas longas madrugadas e finais de semana de trabalho no laboratório.

À amiga Sandra pela amizade, conversas e dicas.

Aos amigos do grupo de Química Analítica Aplicada a Medicamentos e Ecossistemas Aquáticos e Terrestres pelo apoio e atenção sempre demonstrados.

Aos colegas Carlos e Roni pelo auxílio prestado durante a execução deste trabalho.

À técnica Renata pela amizade e ajuda prestada durante os estágios em docência.

Aos funcionários do CAQI, principalmente Paulo e Mauro pela constante ajuda e atenção.

Ao Paulo e funcionários do DAAE-Araraquara pelo apoio prestado durante o período de coleta das amostras.

Àos amigos Kita, Camila, Milena, Gabi, Ivana e Lafon pela grande amizade e momentos de diversão.

Ao Instituto de Química de São Carlos pelo apoio institucional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

A todos que colaboraram, de forma direta e indireta, para a realização deste trabalho.

Resumo

Nos últimos anos, a pesquisa ambiental tem se defrontado com a questão dos chamados disruptores endócrinos (EDCs). A estes compostos, tais como: produtos farmacêuticos, hormônios naturais e sintéticos, pesticidas, substâncias tensoativas, polímeros de baixa massa molar e diversos outros contaminantes orgânicos presentes em efluentes municipais e industriais, atribui-se à capacidade de alterar o funcionamento do sistema endócrino. Estrogênios e progestogênios, naturais ou sintéticos, são excretados pela urina de mamíferos, e uma pequena porção nas fezes, e via efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) entram em vias aquáticas, podendo causar alterações em organismos aquáticos, tais como feminização ou hermafroditismo. Neste contexto, no presente trabalho foi descrito uma metodologia analítica para a extração em fase sólida, empregando cartucho C_{18} , dos hormônios naturais, estrona (E_1) e 17β -estradiol (E_2), e dos hormônios sintéticos, levonorgestrel e 17α -etinilestradiol (EE_2) (presentes em anticoncepcionais orais), a partir de uma matriz de esgoto sintético. Foram utilizados dois sistemas cromatográficos neste estudo, ambos de mesmo modelo (SLC-10A, Shimadzu), um sistema DAD modelo SPD-M10AVP (Shimadzu) e um espectrofluorímetro modelo RF-551 versão 2.4 (Shimadzu). A separação foi feita em coluna C_{18} (250 X 4,6 mm, 5 μ m) com um fluxo de 1 mL min⁻¹. A condição ideal para separação foi o modo isocrático: 48/52 ACN:H₂O. Para se efetuar o estudo de recuperação, uma matriz simulando esgotos sanitários foi utilizada com o intuito de se ter uma amostra controle (testemunha) livre dos analitos de interesse, devido à dificuldade em se obter uma amostra de esgoto “real” livre destes hormônios. As amostras de esgoto sintético foram fortificadas em três níveis de concentração. Valores de recuperação entre 83-123% com coeficientes de variação menores do que 13,5% foram obtidos para todos os hormônios analisados pelos dois sistemas de detecção (DAD e Fluorescente). Esses dados demonstram a eficiência do método quanto à exatidão e precisão para os níveis de fortificação estudados. O método proposto foi utilizado para avaliar a presença dos hormônios em afluentes (esgoto bruto) e efluentes da ETE-Araraquara. Foi identificado e quantificado o hormônio natural E_2 (31ng L⁻¹) em amostras obtidas antes do tratamento de esgoto. Não foram detectadas concentrações dos analitos em amostras obtidas após o tratamento.

Palavras-chaves: hormônios, extração em fase sólida (C_{18}), HPLC-UV, HPLC-Fluorescência.

Abstract

In recent years environmental research has been faced with the issue of the endocrine disrupting chemicals (EDCs). Such compounds, such as: pharmaceutical products, natural and synthetic hormones, pesticides, tensive active substances, low mass molar polymers and many other organic contaminants that appear in municipal and industrial effluents, have the capacity of altering the manner in which the endocrine system works. Natural or synthetic estrogens and progestogens are excreted through the urine of mammals, and a small portion through faeces, and via effluents from sewage treatment plants (STP) flow into aquatic ducts, with the possibility of causing alterations in the aquatic organisms, such as feminization or hermaphroditism. Within this context, the present work describes an analytic methodology for solid phase extraction (SPE) using C₁₈ cartridge of the natural hormones, estrone (E₁) and 17β-estradiol (E₂), and the synthetic hormones levonorgestrel and 17α-ethinylestradiol (EE₂) (found in oral contraceptives) from a synthetic waste matrix. Two chromatographic systems were used in this study, both from the same model (SLC-10A, Shimadzu), a DAD system model SPD-M10AVP (Shimadzu) and a spectrofluorimeter model RF-551 type 2.4 (Shimadzu). Separation was performed in column C₁₈ (250 X 4,6 mm, 5 μm) with a flux of 1 mL min⁻¹. The ideal separation condition was the isocratic mode: 48/52 ACN:H₂O. To carry out the recuperation study, a matrix simulating sewers was used with the objective of having a control sample (witness) free of the samples under scrutiny of the difficulty in obtaining a “real” sewage sample free of these hormones. The samples of synthetic sewage were boosted in three levels of concentration. Recuperation values between 83-123% with variation coefficients lower than 13,5% were obtained for all studied hormones by both systems of detections (DAD and Fluorescent). These data demonstrate the efficiency of the method concerning the accuracy and precision for the fortification levels that were studied. The proposed method was used to assess the presence of hormones in influents (raw sewage) and effluents of Araraquara-STP. The natural hormone E₂ (31ng L⁻¹) was identified and quantified in samples obtained prior to sewage treatment. No concentrations of analytes in the samples were obtained after the treatment.

Key words: hormones, solid phase extraction (C₁₈), HPLC-UV, HPLC-Fluorescence.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 A disrupção do sistema endócrino	13
1.2 Disruptores endócrinos e seus efeitos nos seres vivos	15
1.3 Características das substâncias estudadas	17
1.4 Dinâmica dos hormônios sexuais.....	20
1.5 Métodos de extração e técnicas analíticas empregadas para a determinação de hormônios esteróides	22
1.6 Caracterização dos parâmetros experimentais.....	25
1.6.1 Seletividade	26
1.6.2 Linearidade	27
1.6.3 Limite de detecção (LD).....	28
1.6.4 Limite de quantificação (LQ)	29
1.6.5 Precisão.....	29
1.6.6 Exatidão.....	30
1.7 Caracterização do local de estudo.....	32
1.7.1 A Estação de tratamento de efluentes de Araraquara.....	34
2. OBJETIVO GERAL.....	36
2.1 Objetivos específicos.....	36
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	37
3.1 Materiais utilizados	37
3.2 Instrumentação.....	37
3.2.1 Condições cromatográficas.....	38
3.3 Amostras	38
3.3.1 Esgoto sintético.....	38
3.3.2 Obtenção e armazenamento das amostras de esgoto doméstico	38
3.4 Preparação das soluções padrão individuais e misturas padrão	39
3.5 Preparação das amostras de esgoto sintético	39
3.6 Fortificação das amostras	40
3.7 Procedimento de extração por SPE.....	41
3.7.1 Extração da amostra testemunha.....	41
3.7.2 Extração das amostras fortificadas.....	42
3.7.3 Extração das amostras de esgoto da ETE-Araraquara	42
3.8 Avaliação do método proposto	43
3.8.1 Determinação da linearidade de resposta dos detectores (DAD e Fluorescência)	43
3.8.2 Determinação dos limites de detecção e quantificação dos equipamentos (HPLC-DAD e HPLC-Fluorescência).....	43

3.8.3 Estudo de recuperação	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	45
4.1 Seleção dos comprimentos de onda utilizados em HPLC-DAD	45
4.2 Seleção dos comprimentos de onda utilizados em HPLC-Fluorescência	46
4.3 Desenvolvimento da análise qualitativa dos hormônios por cromatografia líquida de alta eficiência	47
4.3.1 Otimização das condições experimentais da separação cromatográfica	47
4.3.2 Desenvolvimento da metodologia de extração dos hormônios da matriz de esgoto sintético pela técnica de extração em fase sólida (SPE)	48
4.4 Avaliação do método SPE/HPLC-DAD para a matriz de esgoto sintético	53
4.4.2 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)	54
4.4.3 Linearidade	56
4.4.4 Precisão e Exatidão	57
4.5 Avaliação do método SPE/HPLC-Fluorescência para a matriz de esgoto sintético	59
4.5.1 Seletividade	59
4.5.2 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)	60
4.5.3 Linearidade	62
4.5.4 Precisão e Exatidão	63
4.6 Aplicação do método proposto para a determinação de resíduos de hormônios em amostras de afluentes e efluentes da estação de tratamento de esgoto	65
5. CONCLUSÕES	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
APÊNDICES	80
A.I) Curvas analíticas dos hormônios 17 β -estradiol, estrona, 17 α -etinilestradiol e levonorgestrel analisados por HPLC-DAD	80
A.II) Curvas analíticas dos hormônios 17 β -estradiol, estrona, 17 α -etinilestradiol e levonorgestrel analisados por HPLC-Fluorescência	81
B.I) Espectros de absorção na região do ultravioleta/visível dos hormônios 17 β -estradiol, estrona, 17 α -etinilestradiol e levonorgestrel analisados por HPLC-DAD	82
B.II) Espectros de emissão dos hormônios 17 β -estradiol, estrona, 7 α -etinilestradiol e levonorgestrel analisados por HPLC-Fluorescência	83

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Modelo simplificado da dinâmica hormonal no organismo (Adaptado Crain et al ¹¹).	14
Figura 2: Estrutura dos hormônios sexuais.	20
Figura 3: Representação esquemática da principal via de entrada de disruptores endócrinos hormonais em sistemas aquáticos. Adaptado da referência 38.	22
Figura 4: Cartucho de SPE (referência 41).	25
Figura 5: Principais etapas empregadas em SPE (referência 41).	25
Figura 6: Esquema da ETE-Araraquara.	35
Figura 7: Esquema de extração dos analitos.	42
Figura 8: Espectro UV-Vis do hormônio natural 17 β -estradiol.	45
Figura 9: Espectro de Emissão do hormônio natural 17 β -estradiol.	46
Figura 10: Cromatogramas dos hormônios estudados obtidos pelo HPLC-DAD, onde: L (levonorgestrel), E2 (17 β -estradiol); E1 (estrona) e EE2 (17 α -etinilestradiol). Concentrações: 0,3mg L ⁻¹ de cada analito.	48
Figura 11: Porcentagens de recuperação dos hormônios em esgoto sintético, no nível de fortificação 3 (HPLC-DAD), utilizando diferentes cartuchos para extração.	49
Figura 12: Porcentagens de recuperação dos hormônios em esgoto sintético, no nível de fortificação 3, com diferentes condições de condicionamento do cartucho.	50
Figura 13: Porcentagens de recuperação dos hormônios em esgoto sintético, no nível de fortificação 3, com diferentes períodos (tempos) de secagem do cartucho.	50
Figura 14: Porcentagens de recuperação dos hormônios em esgoto sintético, no nível de fortificação 3 (HPLC-DAD). (A) eluição com 5mL dos solventes MeOH e ACN; (B) eluição com 6 mL dos solventes MeOH e ACN.	51
Figura 15: Porcentagens de recuperação dos hormônios em esgoto sintético, no nível de fortificação 3, reconstituídos com 500 μ L de MeOH e 500 μ L de ACN.	52
Figura 16: Cromatograma obtido por HPLC-DAD do extrato branco de esgoto sintético, após aplicação do método de extração proposto.	53
Figura 17: Cromatograma obtido por HPLC-DAD do esgoto sintético fortificado (nível 2), após aplicação do método de extração proposto.	54
Figura 18: Curva de calibração do 17 α -etinilestradiol no intervalo de concentração de 0,300 – 1,25mg L ⁻¹	57

Figura 19: Cromatograma obtido por HPLC-Fluorescência do extrato branco de esgoto sintético, após aplicação do método de extração proposto. Comprimentos de onda selecionados: λ excitação=280nm, λ emissão=306nm.....	59
Figura 20: Cromatograma obtido por HPLC-Fluorescência do esgoto sintético fortificado (nível 2), após aplicação do método de extração proposto.	60
Figura 21: Curva de calibração do 17 α -etinilestradiol no intervalo de concentração de 30 – 70 μ g L ⁻¹	63
Figura 22: Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD de amostra de efluentes domésticos coletada após o tratamento.	66
Figura 23: Cromatogramas obtidos por HPLC-Fluorescência de amostra de efluentes domésticos coletada antes do tratamento (esgoto bruto).....	67
Figura 24: Cromatogramas obtidos por HPLC-Fluorescência de amostra de efluentes domésticos coletada após o tratamento de efluentes.....	68
Figura 25: Curva analítica (HPLC-DAD) dos hormônios: (a) estrona, (b) 17 β -estradiol, (c) 17 α -etinilestradiol e (d) levonorgestrel.	80
Figura 26: Curva analítica (HPLC-Fluorescência) dos hormônios: (a) estrona, (b) 17 β -estradiol e (c) 17 α -etinilestradiol (HPLC-Fluorescência).	81
Figura 27: Espectro no UV/Vis dos hormônios: (a) estrona, (b) 17 β -estradiol, (c) 17 α -etinilestradiol e (d) 17 α -etinilestradiol.....	82
Figura 28: Espectro de emissão dos hormônios : (a) estrona, (b) 17 β -estradiol e (c) 17 α -etinilestradiol.	83

INDICE DE TABELAS

Tabela 1: Quantidade média de 17β -estradiol, estrona, 17α -etinilestradiol e levonorgestrel diariamente excretada na urina de humanos.	18
Tabela 2: Propriedades físicas e químicas dos esteróides estudados.	19
Tabela 3: Composição da água residuária sintética.	40
Tabela 4: Concentrações dos analitos em cada nível de fortificação.	41
Tabela 5: Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os hormônios estudados.	55
Tabela 6: Intervalos de concentrações estudados, equações de regressão linear e coeficientes de correlação (r^2) dos gráficos de calibração obtidos para os hormônios estudados. (y = área cromatográfica e x = concentração).	56
Tabela 7: Resultados de percentuais de recuperação e coeficientes de variação para os hormônios, em amostras de esgoto sintético, nos três níveis de fortificação estudados.	58
Tabela 8: Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os hormônios estudados.	61
Tabela 9: Intervalos de concentrações estudados, equações de regressão linear e coeficientes de correlação (r^2) dos gráficos de calibração obtidos para os hormônios estudados. (y = área cromatográfica e x = concentração).	62
Tabela 10: Resultados de percentuais de recuperação e coeficientes de variação para os hormônios, em amostras de esgoto sintético, nos três níveis de fortificação estudados.	64
Tabela 11: Valores das áreas dos picos cromatográficos do hormônio E2 referentes a três injeções de amostras coletadas antes do tratamento de efluentes domésticos analisado pelo HPLC-Fluorescência.	68

1. Introdução

A preocupação expressa pelos movimentos em defesa do meio ambiente, durante as décadas que mediaram os anos 60 e 80, não suscitou grande reação entre os industriais, agricultores e o poder público. No rescaldo da II Guerra Mundial, o mundo ocidental passava por um período de reconstrução e de recuperação econômicas, durante o qual as prioridades de desenvolvimento eram centradas no incentivo à produção, geração de postos de trabalho, suprimento das necessidades alimentares e promoção das condições de conforto e bem-estar sociais. O desenvolvimento era prioritário, não existia a preocupação de que tal desenvolvimento fosse sustentável¹.

Neste contexto, a promoção acelerada do desenvolvimento levou à fabricação e introdução de novos compostos químicos no meio ambiente, cuja periculosidade para os seres vivos, nomeadamente para a espécie humana, não tinha sido previamente testada.

Um dos principais debates científicos internacionais da última década, diz respeito à presença no meio ambiente de um grupo específico de compostos químicos caracterizado pela capacidade de simular ou alterar a atividade hormonal dos seres humanos e de animais. A estas substâncias atribui-se a capacidade de perturbar o sistema endócrino simulando a ação de hormônios naturais, inibindo ou alterando as funções regulares normais dos sistemas imunológico, nervoso e endócrino².

Os disruptores endócrinos (EDCs) podem ser produtos naturais de origem vegetal, como os fitoestrógenos produzidos pela própria planta, de origem animal e também compostos químicos sintéticos, na sua grande maioria organoclorados, empregados nos mais variados usos industriais, comerciais e domésticos produzidos intencionalmente, como no caso de solventes clorados e inseticidas, desenvolvidos para atuar seletivamente sobre o sistema endócrino de insetos específicos. Essas substâncias de origem antropogênica são geralmente persistentes no ambiente, acumulando-se no solo e nos sedimentos, elas são transportadas facilmente para outras regiões através da lixiviação, podendo se acumular ao longo da cadeia trófica, expondo os animais superiores a maiores riscos³.

A exposição a estes agentes pode ocorrer a partir de uma variedade de fontes de forma voluntária ou não. Assim, seres humanos e animais estão expostos a alguns fitoestrógenos através de sua dieta diária, incluindo o consumo de água potável, ou pelo

contato com o ar e solo contaminados. Também estão expostos a muitos perturbadores sintéticos ao utilizar produtos de limpeza, pesticidas e aditivos de alimentos industrializados, ou ao manipulá-los com propósitos benéficos específicos ou terapêuticos, como pílulas anticoncepcionais e cosméticos⁴.

1.1 A disrupção do sistema endócrino

O sistema endócrino é composto por um mecanismo complexo que coordena e regula a comunicação entre células, constituído por combinações de glândulas e hormônios, sendo responsável pelas funções biológicas normais como reprodução, desenvolvimento embrionário, crescimento e metabolismo⁵. Hormônios são mensageiros químicos que respondem pela comunicação entre diferentes tipos de células. As células identificam os hormônios através de receptores que são estruturas protéicas especializadas em reconhecimento molecular⁶. Depois da aproximação e interação (hormônio-receptor) uma série de reações bioquímicas ocorre levando a respostas biológicas específicas⁶.

Os hormônios sexuais são produzidos a partir do colesterol e podem ser classificados em três grupos principais: (1) hormônios sexuais femininos, ou estrógenos, (2) hormônios sexuais masculinos, ou andrógenos, e (3) hormônios da gravidez, ou progestógenos⁷

Dentre os hormônios sexuais, os estrógenos vem recebendo maior atenção por serem compostos extremamente ativos biologicamente estando relacionados à etiologia de vários tipos de cânceres¹. Os estrógenos naturais 17β -estradiol (E_2), estriol (E_3), estrona (E_1) e o sintético 17α -etinilestradiol (EE_2), desenvolvido para uso clínico em terapias de reposição hormonal e métodos contraceptivos, são os hormônios que despertam maior preocupação tanto pela potência como pela quantidade contínua introduzida no ambiente. Estes hormônios possuem a melhor conformação reconhecida pelos receptores e portanto resultam em respostas máximas, sendo considerados como os responsáveis pela maioria dos efeitos disruptores desencadeados pela disposição no meio-ambiente⁸.

Ainda que a total compreensão dos mecanismos de ação dos EDCs seja incompleta e fragmentada, é reconhecido o “*modus operandis*” sob certos tipos de receptores de núcleos celulares. Os hormônios e seus receptores se encaixam como um

mecanismo tipo “chave e fechadura”. Em condições normais, um hormônio natural se liga ao seu receptor e ativa os genes no núcleo para produzir a resposta biológica apropriada⁹, ou seja, a ação dos hormônios inicia-se pela ligação dos mesmos com um receptor específico no interior de uma célula. O complexo resultante liga-se a regiões específicas do DNA do núcleo da célula, um fato que determina por sua vez a ação dos genes¹⁰.

A Figura 1 esquematiza de forma simplificada a dinâmica hormonal no organismo. É importante ressaltar que os EDCs podem manifestar seus efeitos em cada ponto deste ciclo; atuando nos sítios receptores, no conjunto de enzimas associado com a via, interferindo nos mecanismos de retroalimentação e nas interconexões com os sistemas nervoso e imunológico¹¹.

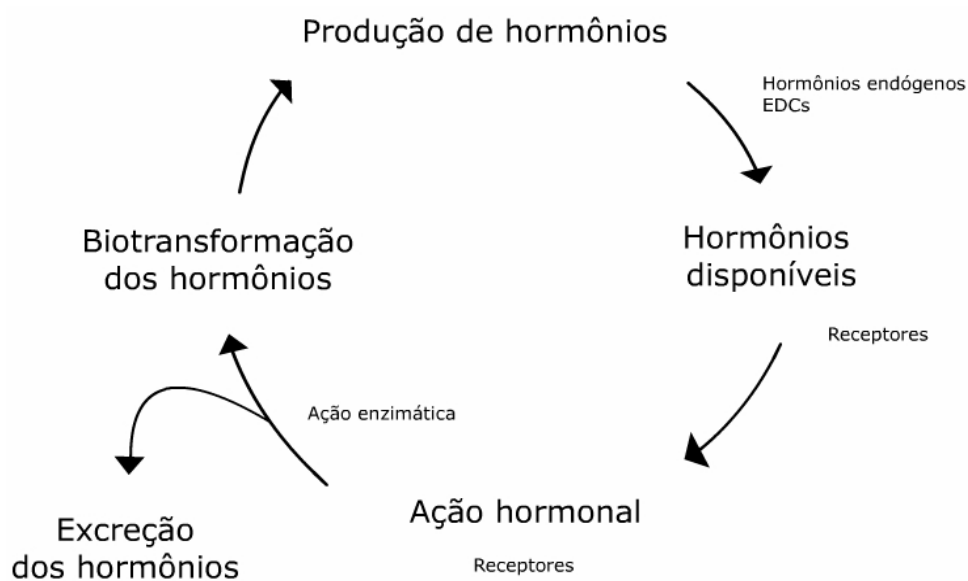


Figura 1: Modelo simplificado da dinâmica hormonal no organismo (Adaptado Crain et al¹¹).

A alteração ou desregulação da função endócrina pode estar associada também a interferências na síntese, secreção, transporte, ligação e ação ou eliminação de hormônios naturais do organismo, conduzindo a uma nova resposta hormonal, fraca ou forte, que resulta em um sinal inexato para o corpo. Algumas substâncias podem, por exemplo, imitar a ação dos hormônios naturais levando o organismo a desencadear de

um modo exagerado ou em tempo inapropriado a um estímulo falso, sendo o fenômeno designado por efeito agonista. Outras substâncias podem bloquear os receptores específicos a um determinado hormônio endógeno, reduzindo ou anulando os estímulos em certas partes do organismo que normalmente lhe são sensíveis, sendo este fenômeno determinado por efeito antagonista. Os principais fatores que influenciam o modo de atuação dos disruptores endócrinos no organismo relacionam-se com a natureza, concentração e tipo de interação, além do tempo de exposição, fatores genéticos, especificidade dos tecidos, idade, sexo, entre outros¹².

As conseqüências mais severas destes disruptores endócrinos podem não ocorrer nos organismos através do contato direto, mas pela transferência da mãe para o feto (efeito teratogênico) causando anomalias reprodutivas, ou mudanças que podem provocar um desenvolvimento desordenado de células na prole, induzindo cânceres⁹.

1.2 Disruptores endócrinos e seus efeitos nos seres vivos

Vários grupos de substâncias químicas podem atuar como disruptores endócrinos, entre estes se podem citar produtos farmacêuticos, hormônios naturais e sintéticos, pesticidas, substâncias tensoativas, polímeros de baixa massa molar e diversos outros contaminantes orgânicos presentes em efluentes municipais domésticos e industriais⁸. Devido à preocupação pública e científica, estudos têm sido iniciados para análise de efeitos a curto e longo prazo dessas substâncias¹³.

Um exemplo da incapacidade de prever riscos a saúde humana foi o uso do hormônio estrogênico sintético dietilbestrol (DES), o qual foi largamente utilizado nos anos 70 para prevenir aborto e supressão da lactação. Pesquisadores constataram um aumento na incidência de adenocarcinomas de cérvix e vagina nas filhas de pacientes que tinham usado o DES durante o primeiro trimestre de gravidez¹². Isso pode ter ocorrido em decorrência da incapacidade que o feto tem de metabolizar o DES, levando o seu acúmulo nos tecidos fetais¹². Embora o DES e outros estrogênios não sejam mais administrados intencionalmente às gestantes, existe a preocupação de que a exposição durante a gravidez aos compostos que possuem atividade estrogênica ocasione anormalidades no desenvolvimento de fetos¹³.

Em alguns países ocidentais, o câncer de testículo é o mais comum entre tumores malignos em jovens. Ele pode se desenvolver a partir de células afetadas ainda no período fetal, sendo que alguns estudos sugerem o envolvimento de fatores ambientais como responsáveis pela ativação e proliferação das células cancerígenas¹⁴.

Segundo Bhatt¹⁵, o uso de produtos sintéticos e a exposição repetida a compostos com atividade estrogênica, sejam no trabalho, em casa, ou em qualquer ambiente contaminado por tais agentes, causam efeitos adversos na saúde reprodutiva. Segundo este autor, os EDCs estão sendo cada vez mais relacionados com a infertilidade, irregularidades menstruais, abortos espontâneos, defeitos no nascimento de bebês e câncer de mama.

De acordo com Foster *et al.*¹⁶, estudos *in vivo* e em *in vitro*, demonstram que a exposição a EDCs pode causar efeitos adversos na função ovariana humana. Os EDCs podem ligar-se com receptores estrogênicos, mudando a expressão e atividade enzimática do hormônio esteróide natural, induzindo a destruição folicular ovariana.

De acordo com estudos realizados no Japão por Aou *et al.*¹⁷, demonstraram que funções cerebrais podem ser afetadas por disruptores endócrinos. O sistema nervoso central é altamente sensível a contaminantes químicos. Catecolamina e dopamina regulam muitas diferentes funções cerebrais como leitura e memória, emoção, controle homeostático e controle dos sistemas fisiológicos. Estudos sugerem que as funções cerebrais, como leitura e emoção, são influenciadas por impactos químicos via catecolaminas, citoquinas e compostos químicos ambientais, tais como os disruptores endócrinos.

No ambiente, o maior problema com a presença de estrogênios em águas superficiais, é o efeito que tais substâncias podem causar em organismos aquáticos, por exemplo, a intersexualidade de peixes, onde características sexuais femininas estão presentes em peixes machos¹⁸. Isto pode ocorrer devido ao lançamento nos rios de contaminantes estrogênicos em níveis suficientes para induzir a biossíntese de vitelogenina em peixes machos¹⁹. A vitelogenina é uma proteína específica encontrada em vertebrados ovíparos do sexo feminino, e pode ser sintetizada pelos machos quando estes são expostos a compostos estrogênicos. Vários estudos mostram que pássaros, répteis e mamíferos, em áreas poluídas, também são acometidos de alterações no sistema endócrino reprodutivo²⁰.

Dentre os disruptores, os hormônios naturais e sintéticos são efetivos em níveis abaixo de ng L^{-1} ^{21,22}, enquanto que a maioria dos outros químicos, como surfactantes e derivados de plásticos, tem efeito estrogênico biologicamente ativo em nível de $\mu\text{g L}^{-1}$. Desbrow *et al.*²³ em uma avaliação usando procedimentos *in vitro*, com leveduras, identificou os componentes esteróides estrogênicos em efluentes de estações de tratamento de esgoto, como contribuintes de maior proporção da atividade estrogênica.

Baseando-se nessas informações, alguns hormônios naturais e sintéticos foram selecionados para o estudo.

1.3 Características das substâncias estudadas

Devido a potencialidade e abundância dos hormônios naturais e sintéticos, alguns esteróides foram selecionados para o estudo, sendo estes: 17β -estradiol, estrona, 17α -etinilestradiol e levonorgestrel.

Os principais estrogênios humanos naturais são estradiol (17α -estradiol e 17β -estradiol), estrona e estriol. Os usos clínicos mais comuns dos estrogênios são: tratamento de reposição hormonal (TRH), tratamento na deficiência de estrogênios, no tratamento de determinados carcinomas e de diversas disfunções no sistema reprodutivo feminino²⁴.

De acordo com Gilman *et al.*²⁴, o estradiol é o principal e mais potente estrogênio ovariano biologicamente ativo. Ele é secretado pelo ovário, onde grande parte do estradiol é desidrogenado e biotransformado em estrona, que é o segundo estrogênio com atividade mais potente no organismo de seres humanos, que por sua vez, é metabolizado a estriol, o estrogênio mais abundante eliminado pela urina e o terceiro hormônio natural mais potente no organismo.

Os estrogênios naturais e sintéticos passam por uma biotransformação antes de serem excretados pelo organismo nas fezes e urina. Primeiramente, os estrogênios são biotransformados no sistema hepático e parcialmente nos músculos, rins e gônadas, sendo oxidados, hidroxilados, desoxidados e metilados antes da conjugação com ácido glicurônico ou sulfato, transformando-se em compostos estrogênicos menos ativos. Além dos conjugados, muitos outros metabólitos polares, como a 16-hidroxi-estrona, podem estar presentes nas fezes e na urina²⁵.

O hormônio sintético 17α -etinilestradiol tem como via principal de biotransformação a 2-hidroxilação e a formação subsequente de éteres 2 e 3-metílicos correspondentes²⁴. A metabolização ocorre por hidrólise aromática e uma grande variedade de metabólitos metilados e hidroxilados são formados, estando presentes sob formas livres ou conjugados com ácidos glicurônico e sulfúrico. O progestogênio sintético levonorgestrel é rápido e completamente absorvido após administração oral. Ele liga-se amplamente às proteínas plasmáticas, como também às globulinas de ligação dos hormônios sexuais. A metabolização ocorre por redução da ligação dupla do anel insaturado, e após várias etapas ocorre a glicuronização. Cerca de 60% do fármaco é excretado pela urina e 40% pelas fezes, por meio de conjugados e vários metabólitos polares²⁴.

A Tabela 1 apresenta as quantidades médias excretadas diariamente desses hormônios pela urina de humanos.

Tabela 1: Quantidade média de 17β -estradiol, estrona, 17α -etinilestradiol e levonorgestrel diariamente excretada na urina de humanos.

Estrógenos	Excreção ♂ ($\mu\text{g}/24\text{h}$)	Excreção ♀ menstruação ($\mu\text{g}/24\text{h}$)	Excreção ♀ gravidez ($\mu\text{g}/24\text{h}$)	Excreção ♀ menopausa ($\mu\text{g}/24\text{h}$)	Excreção ♀ ($\mu\text{g}/24\text{h}$)
17 β -Estradiol	1,6	3,5	259	2,3	NR
Estrona	3,9	8,0	600	4,0	NR
17α - etinilestradiol	NR	NR	NR	NR	35
Levonorgestrel	NR	NR	NR	NR	NR

NR: valores não reportados na literatura.

Fonte: Adaptado da referência 25

A Tabela 2 contém algumas propriedades físicas e químicas dos esteróides estudados.

Tabela 2: Propriedades físicas e químicas dos esteróides estudados.

Nome Comum	Fórmula	γ_{sat} (mg L ⁻¹ 20 °C)	Log K _{ow}	Pressão de Vapor (mm Hg)	K _{oc}
17 β -Estradiol	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	13	3,94	2,3 x 10 ⁻¹⁰	3300
Estrona	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	13	3,43	2,3 x 10 ⁻¹⁰	4882
17 α - Etinilestradiol	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	4,8	4,15	4,5 x 10 ⁻¹¹	4770
Levonorgestrel	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	NR	NR	NR	NR

γ_{sat} : Solubilidade em água; K_{ow}: Coeficiente de partição octanol/água; K_{oc}: Constante de sorção; NR: valores não reportados na literatura.

Fonte: referência 26

Observa-se na Tabela 2, que os hormônios naturais (17 β -estradiol e estrona) têm solubilidades de aproximadamente 13mg L⁻¹ em água, enquanto que 17 α -etinilestradiol é menos solúvel, 4,8mg L⁻¹. Os hormônios, exceto o levonorgestrel cujas características não são reportadas, possuem baixos valores de pressão de vapor, o que indica a baixa volatilidade desses compostos.

De acordo com as propriedades físicas e químicas desses hormônios, pôde-se observar que esses estrogênios são compostos orgânicos hidrofóbicos de baixa volatilidade, e a sorção nos solos e sedimentos poderão corresponder um fator significativo de redução das concentrações dessas substâncias na fase aquosa.

A Figura 2 apresenta as estruturas químicas dos hormônios naturais e sintéticos estudados.

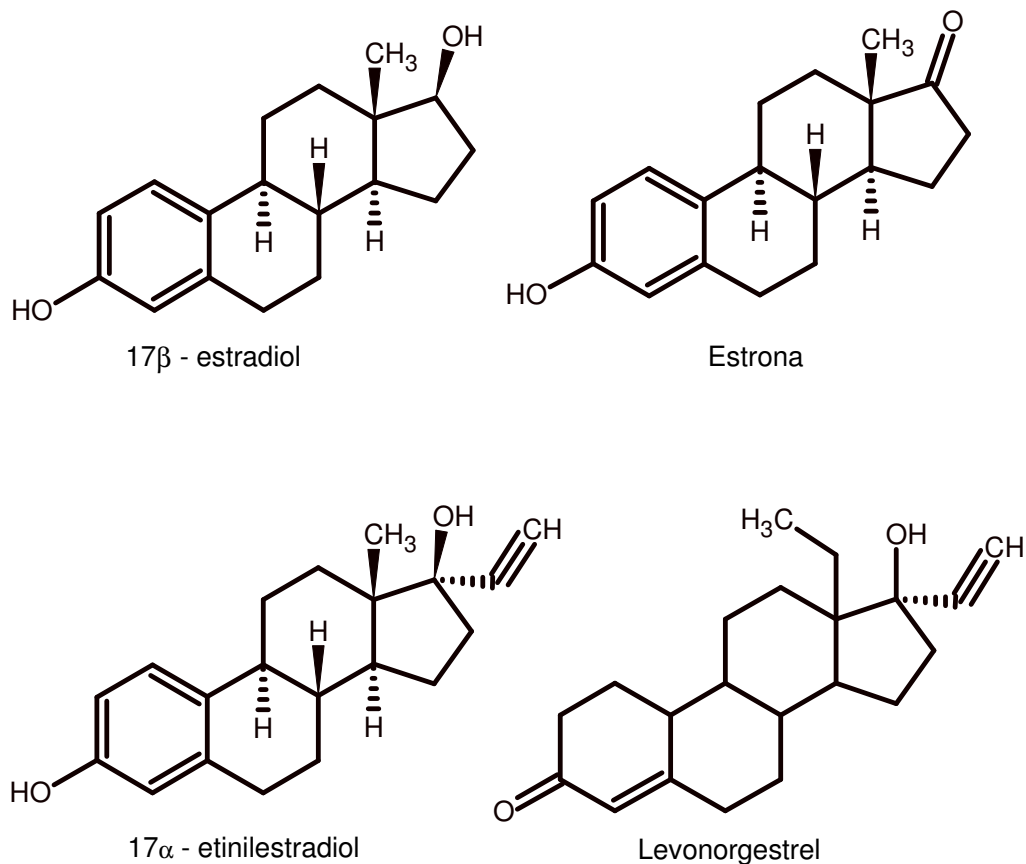


Figura 2: Estrutura dos hormônios sexuais.

1.4 Dinâmica dos hormônios sexuais

As vias de disseminação mais comuns dos hormônios naturais e sintéticos são os efluentes domésticos descartados em meio fluvial ou marinho. O lançamento de efluentes *in natura* ou mesmo processados são as principais vias de contaminação do ambiente aquático, seja pelo déficit de infra-estrutura em saneamento ou pela ineficiência das estações de tratamento²⁷ (tecnológica e/ou operacional).

A maioria do material estrogênico excretado provém de seres humanos, e portanto, presente em efluentes domésticos na forma menos ativa de conjugados (glicuronidas e sulfatos). Entretanto, a ocorrência de estrogênios “livres” em efluentes de estações de tratamento de esgotos (ETEs) indica que os metabólitos de estrogênios são convertidos de volta a sua forma ativa durante o tratamento dos efluentes²⁸⁻³².

Alguns pesquisadores sugerem que a desconjugação ocorre durante o tratamento de esgoto processo na própria ETE^{27,31-35}. A bactéria *Escherichia coli*, que é eliminada em grandes quantidades nas fezes, é apta em sintetizar grandes quantidades da enzima β -glicuronidase³⁶, a qual tem sido sugerida como responsável pela desconjugação dos metabólitos estrogênicos. Logo, os hormônios naturais e sintéticos, utilizados comumente em pílulas anticoncepcionais (como exemplos, 17 α -etinilestradiol e levonorgestrel) permanecem na sua forma ativa nos efluentes, os quais podem exercer influências no sistema reprodutivo de peixes e outros organismos aquáticos em concentrações mínimas³⁵.

O destino dos estrógenos no ambiente é dependente de suas características físicas e químicas e das propriedades do meio receptor. As inúmeras variáveis que atuam em conjunto no ambiente aquático como temperatura, turbidez, pH, oxigênio dissolvido, radiação solar, matéria orgânica e concentração de diversas outras substâncias, tornam a tarefa de modelar o comportamento destes compostos bastante complexa. Devido a sua lipofilicidade e baixa volatilidade o processo de sorção em sedimentos suspensos pode ser um fator significativo na redução dos estrógenos na fase aquosa^{26,37}. Segundo Gomes *et al.*³⁷, os processos de sorção dos compostos são predominantes a partir do valor do logaritmo do coeficiente de partição octanol/água ($\log Kow$) igual a 3. Assim, estrona ($\log Kow=3,43$), 17 β -estradiol ($\log Kow = 3,94$), e 17 α -etinilestradiol ($\log Kow = 4,15$) são esperados demonstrarem preferência pela fase sólida. Já Lai *et al.*²⁶, em estudos de partição entre sedimento e água simulando várias condições ambientais, sugerem que estrógenos dissolvidos na água podem rapidamente se adsorver nos sólidos em suspensão, indicando que a competição pelos sítios de ligação com outros compostos mais hidrofóbicos e a respectiva saturação destes sítios são os responsáveis pela proporção de estrógenos que permanecem na fase aquosa.

A Figura 3 apresenta um esquema simplificado da entrada dos hormônios no meio ambiente.

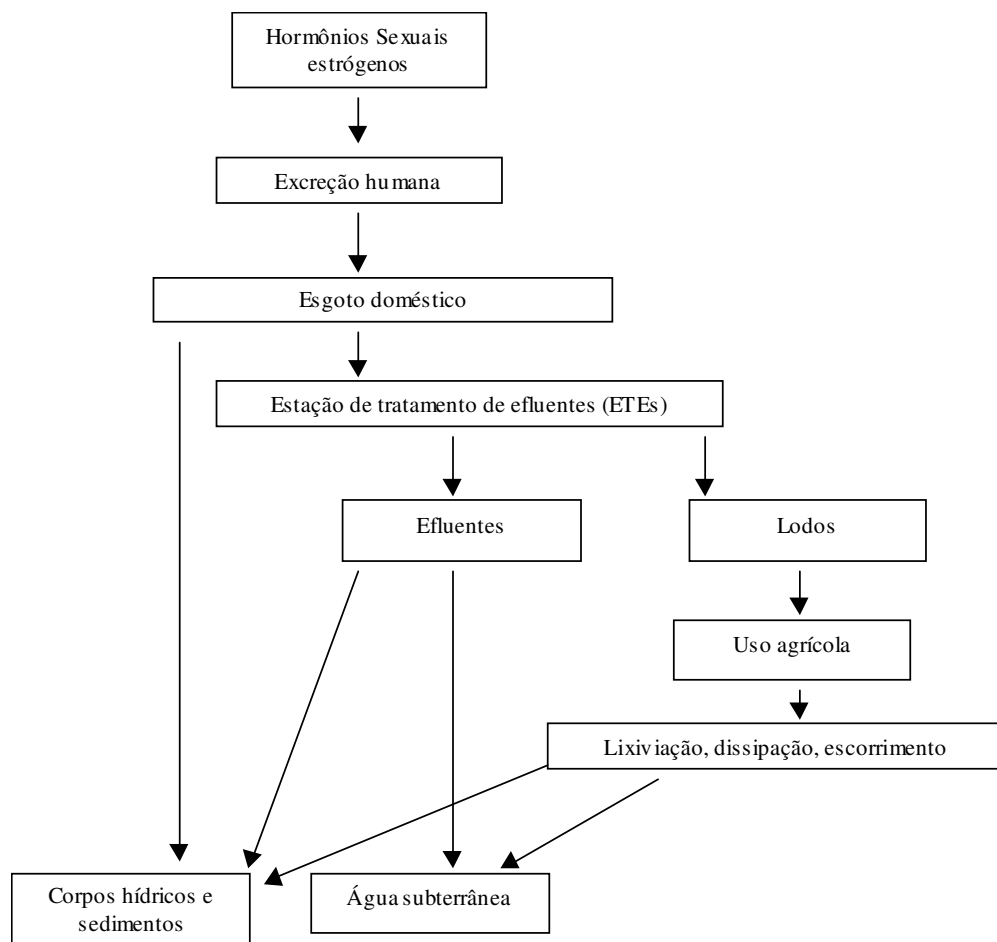


Figura 3: Representação esquemática da principal via de entrada de disruptores endócrinos hormonais em sistemas aquáticos. Adaptado da referência 38.

Como há uma preocupação científica quanto à presença dessas substâncias no meio ambiente e seus efeitos, torna-se necessária a análise de forma que resultados confiáveis possam ser obtidos. Para isso são necessários métodos de extração eficientes e técnicas analíticas sensíveis.

1.5 Métodos de extração e técnicas analíticas empregadas para a determinação de hormônios esteróides

A análise de traços de compostos orgânicos em água pode ser considerada como um dos maiores desafios da química analítica. A determinação de hormônios estrógenos no ambiente constitui em tarefa difícil, primeiro, devido à complexidade das matrizes

ambientais, e segundo, por causa de sua baixa concentração (ordem de ng L^{-1}), porém fisiologicamente ativa³⁹.

Na maioria das análises que envolvem amostras "reais", é necessário o enriquecimento substancial do analito para isolar os compostos alvos da matriz e para concluir os limites de detecção e quantificação requeridos. Dentre as várias etapas envolvidas na análise de amostras complexas, algumas mais comuns são: extração, *clean-up* (eliminação de impurezas), concentração, ajuste de condições (por exemplo, pH), antes da medida do analito de interesse. No caso de análises cromatográficas, além de evitar a interferência dos contaminantes da matriz que possam co-eluir com o analito de interesse, a remoção de interferentes em geral é importante para garantir a longevidade das colunas analíticas e evitar constantes limpezas no sistema de injeção⁴⁰⁻⁴².

Até recentemente, o método analítico mais usado no preparo de amostras complexas para análise era a extração líquido-líquido. Esta se baseia na solubilidade relativa dos analitos presentes na amostra em dois solventes, idealmente imiscíveis. Em geral, o analito de interesse, juntamente com os interferentes, encontra-se presente em uma matriz líquida, como água. Esta solução é colocada em um funil de separação ao qual se adiciona um solvente orgânico imiscível, o sistema é agitado e o analito passa da fase aquosa para a orgânica, enquanto que os interferentes permanecem, na sua maioria (idealmente na totalidade), na fase aquosa. Esta técnica é tediosa, requer grandes volumes de solventes orgânicos, apresenta custo elevado e de difícil automação, e geralmente pequena repetibilidade/reprodutibilidade em decorrências das várias etapas requeridas envolvendo o analito de interesse⁴².

Em meados da década de 70, visando à eliminação desses problemas, um novo método foi introduzido, o qual tem sido denominado de extração em fase sólida (SPE). A SPE é uma separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão. A SPE, em sua forma mais simples e conhecida, comporta-se como uma cromatografia líquida empregando-se uma pequena coluna aberta, usualmente denominada de cartucho de extração (Figura 4), a qual contém a fase sólida⁴¹. Os adsorventes podem ser grupos funcionais orgânicos hidrofóbicos quimicamente ligados a uma superfície sólida, como sílica. Um exemplo comum é a ligação do grupo C_{18} com a sílica, onde esse grupo interage com compostos orgânicos hidrofóbicos pela ação das forças de Van der Waals, e dessa forma são extraídos da fase aquosa⁴². A solução contendo o analito de interesse é colocada no topo do cartucho e

aspirada com pressão reduzida, ou pressionada levemente com uma seringa, de forma a penetrar no cartucho. Depois de drenada toda a fase líquida, o analito retido no cartucho é eluído com um pequeno volume de solvente, de forma a coletar o analito em concentração já apropriada para análise⁴¹. A Figura 6 apresenta as principais etapas empregadas em SPE. Uma alternativa ao uso de cartuchos em extração em fase sólida foi o desenvolvimento de discos constituídos de fases estacionárias cromatográficas imobilizadas com material inerte como PTFE (politetrafluoretileno) ou fibra de vidro⁴².

Segundo Barceló *et al.*⁴⁰, a extração de estrógenos em água é usualmente feita pela extração em fase sólida (SPE) em discos ou mais frequentemente cartuchos, sendo octadecilsilano (C₁₈) quimicamente ligado a sílica, o adsorvente mais empregado. Sorventes poliméricos de carbono preto grafitizado (GCB) também são utilizados em menor escala.

Até alguns anos atrás, grande parte das análises de amostras líquidas era acompanhada pela derivatização antes da separação por cromatografia gasosa⁴³, uma vez que cromatografia líquida ganhou popularidade a partir da década de 90.

No entanto, o pré-requisito necessário para a análise em cromatografia gasosa, é que o composto químico de interesse seja volátil e termicamente estável. Quando este não é o caso, a derivatização pode ser usada para superar esta limitação. Para a determinação de compostos estrogênicos por cromatografia gasosa é necessário o uso de derivados. No entanto, existem algumas desvantagens no procedimento da derivatização, os quais são: o intensivo trabalho de laboratório e a possibilidade de redução da recuperação do analito. O tempo de consumo no passo da derivatização e a possível perda do analito, uma vez que a hidrólise dos conjugados para estrogênios livres, via derivatização, pode compor em erros nos estágios de recuperação, extração e quantificação, devido à baixa eficiência na etapa de hidrólise⁴⁴, têm levado a considerar a técnica de cromatografia líquida como preferida para determinação de estrógenos.

De acordo com vários autores, os detectores e acoplamentos de detectores mais empregados para análise de hormônios pela técnica de HPLC são: eletroquímico⁴⁵⁻⁵⁰, fluorescência⁵⁰⁻⁵⁵, espectrômetro de massas^{37,40,43,44,49,56,57,58} (LC-MS, LC-MS-MS), e ultravioleta^{39,40} (LC-DAD, LC-DAD-MS).

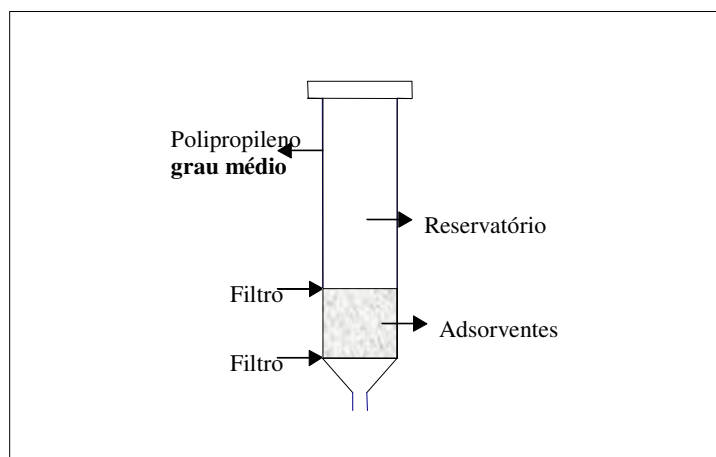


Figura 4: Cartucho de SPE (referência 41).

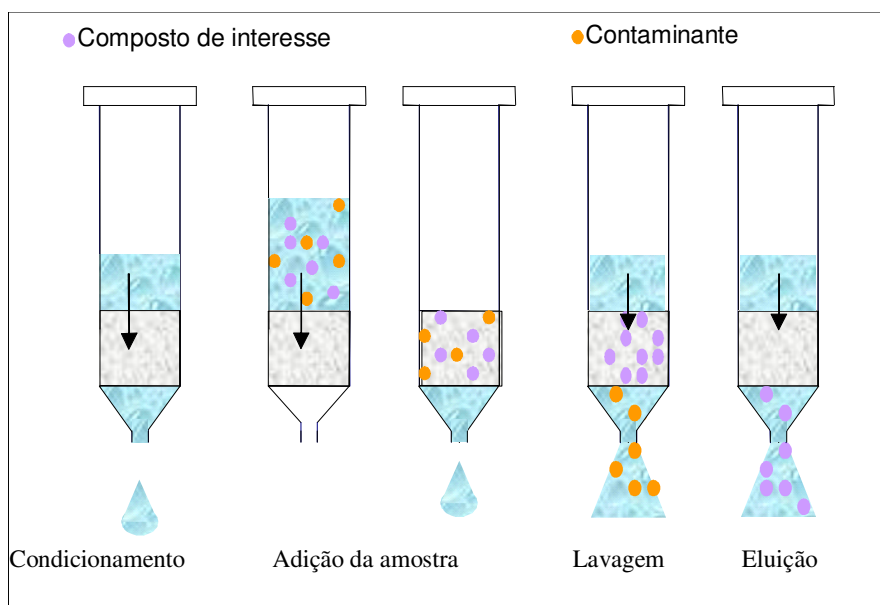


Figura 5: Principais etapas empregadas em SPE (referência 41).

1.6 Caracterização dos parâmetros experimentais

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve passar por uma avaliação denominada validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência⁵⁹. No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA⁶⁰ (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO⁶¹ (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e

Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003.

É essencial que os estudos de validação sejam representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras sejam adequados. Um método para um composto majoritário requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para análise de traços. A frequência com que o método será utilizado (um dia, uma vez em um dia, uma vez em um mês, etc.) também influencia o tipo de estudo de validação que é necessário⁵⁹. Os parâmetros analíticos devem ser baseados na intenção do uso do método. Por exemplo, se o método será usado para análise em nível de resíduos, não há necessidade de testar e validar a linearidade do método sobre toda a faixa linear dinâmica do equipamento. Desta forma, os experimentos podem ser limitados para o que realmente é necessário⁶².

É possível distinguir dois tipos de validação de métodos^{63,64}, o primeiro é denominado validação no laboratório (“in house validation”), onde as etapas de validação são realizadas em único laboratório, tanto para validar um novo método que tenha sido desenvolvido localmente, quanto para verificar se um método externo adotado, está sendo aplicado adequadamente. O segundo tipo é a validação completa (“full validation”), e envolve todas as características de desempenho de um estudo interlaboratorial utilizado para verificar como uma metodologia se comporta com uma determinada matriz, em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza associada à metodologia como um todo.

Os parâmetros analíticos normalmente utilizados para a validação de métodos de separação são: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação⁶².

1.6.1 Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outra substância ativa, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes. A seletividade garante que o pico de

resposta seja exclusivamente do composto de interesse. A seletividade pode ser obtida de várias maneiras. A primeira forma de se avaliar a seletividade é comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra. Uma segunda maneira é através da avaliação com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza-se isto como uma indicação da presença do composto puro. Estas duas maneiras são as mais utilizadas^{59,62}.

O mesmo significado tem sido freqüentemente utilizado para o termo especificidade. Esta situação gera confusão desnecessária e isto pode ser evitado utilizando somente o termo seletividade, como sugerido pela IUPAC⁵⁹. Um método instrumental de separação que produz resposta para uma única substância de interesse, normalmente um dado elemento, pode ser chamado de específico, e um método que produz resposta para vários compostos químicos, com uma característica em comum, pode ser chamado de seletivo⁵⁹.

1.6.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. O intervalo de trabalho expressa a faixa entre a menor e a maior concentração dos padrões usados na construção do gráfico de calibração⁶⁵.

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão **a** e **b**, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0; menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A ANVISA⁶⁰ recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO⁶¹ um valor acima de 0,90. Em qualquer técnica instrumental, a relação linear é simples, descrita pela equação $y = ax + b$, só é válida em um determinado intervalo de massa ou concentração da espécie medida. Este intervalo de massa ou concentrações, no qual se pode construir uma curva analítica linear, é a faixa linear dinâmica.

A faixa de aplicação de um método corresponde ao intervalo entre o valor superior e o valor inferior do analito no gráfico de calibração, o qual atenda os requisitos de precisão e exatidão. A faixa de aplicação é normalmente expressa nas mesmas unidades dos resultados obtidos pelo método. Diferentes recomendações são fornecidas na literatura e dependem da aplicação. Para fármacos e medicamentos, a ANVISA⁶⁰ recomenda uma faixa entre 80-120% da concentração teórica do analito. A IUPAC⁶⁴ recomenda duas faixas: 0-150% ou 50-150% do valor esperado, dependendo de qual destas opções for a mais adequada. Para resíduos de hormônios, não há nenhum valor teórico máximo de concentração que estes analitos possam ser encontrados em efluentes de rios e ETEs.

A ANVISA⁶⁰ e ICH⁶⁶ recomendam que a linearidade seja determinada pela análise de no mínimo 5 concentrações diferentes, dentro dos critérios estabelecidos para a faixa de aplicação.

1.6.3 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção representa a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada^{59,62}. O limite de detecção pode ser obtido pelo método visual, método sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica. No método visual, o LD é determinado utilizando a matriz com adição de concentrações conhecidas do analito de interesse até a visualização da menor concentração visível (detectável) em que seja possível distinguir entre sinal e ruído. Este procedimento também pode ser realizado através do instrumento, utilizando parâmetros de detecção da integração⁵⁹.

No método sinal-ruído, o sinal de amostras contendo o analito em concentrações muito baixas é comparado com o sinal de uma amostra “branco” (matriz isenta do analito de interesse), estabelecendo uma relação sinal-ruído que pode ser 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitas como estimativa do limite de detecção⁵⁹.

Outra maneira de expressar o limite de detecção é através de parâmetros do gráfico de calibração:

$$LD = 3,3x \frac{S}{S}$$

Onde: s é a estimativa do desvio padrão da resposta e S é a inclinação ou coeficiente angular do gráfico de calibração.

1.6.4 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação é definido como a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas. O LQ também pode ser estabelecido pelos mesmos métodos utilizados para LD (método visual, método sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica), sendo que para LQ a relação sinal-ruído adotada é 10:1 e a equação utilizada baseada em parâmetros da curva analítica é a seguinte:

$$LQ = 10x \frac{s}{S}$$

Onde: s é a estimativa do desvio padrão da resposta e S é a inclinação ou coeficiente angular do gráfico de calibração.

1.6.5 Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas. É um parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra do processo analítico. É avaliada pelo desvio padrão absoluto (σ), que utiliza um número significativo de medições normalmente maior que 20. Na prática, em validações de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Onde: \bar{x} = média aritmética de um pequeno número de medidas; x_i = valor de cada medida; n = número de medidas.

A precisão também pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), conhecido também como coeficiente de variação (CV):

$$CV = \frac{s}{M} \times 100$$

Na qual: s = desvio-padrão das recuperações e M = média das recuperações.

A precisão costuma ser expressa como repetitividade, precisão intermediária ou reprodutibilidade.

A repetitividade é a concordância entre os resultados de medidas repetidas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições (mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento, mesmo local, repetições em um curto intervalo de tempo). A repetibilidade envolve várias medidas de uma mesma amostra, em diferentes preparações, e também pode ser denominada precisão intra-ensaio ou intra-corrída, sendo expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV)⁵⁹.

A precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias, diferentes analistas ou diferentes equipamentos, ou uma combinação destes fatores. A reprodutibilidade é estudada entre diferentes laboratórios, em diversas localidades do mundo, utilizando o mesmo conjunto de amostras⁶⁷.

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados de ensaios realizados com uma mesma amostra em diferentes laboratórios. A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos para a inclusão em farmacopéias, etc.

1.6.6 Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro⁵⁹. A exatidão pode ser estimada pelo cálculo do erro absoluto e relativo e a precisão pelas medidas de dispersão, como desvio-padrão, variância e coeficiente de variação. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência certificados; comparação de métodos e ensaios de recuperação^{59,68}.

Os materiais de referência, quando disponíveis, são os preferíveis, pois estes materiais são reconhecidos diretamente por padrões internacionais. O procedimento consiste em analisar um número suficiente de materiais de referência e comparar os resultados com os valores certificados. Porém, devido ao alto custo, seu uso acaba sendo limitado.

A comparação de métodos consiste em confrontar os resultados obtidos empregando-se o método em desenvolvimento e os resultados conseguidos através de um método de referência, avaliando o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, o grau de exatidão do método testado em relação ao de referência⁵⁹. Esta abordagem assume que a incerteza do método de referência é conhecida. No entanto, nem sempre se encontra um método de referência preexistente.

O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra⁶⁹. A recuperação (ou fator de recuperação), R, é definida como a eficiência da extração de um processo analítico reportada como porcentagem da quantidade medida do analito em relação à quantidade adicionada na matriz (branco), após as etapas de extração do método⁶². Calcula-se a quantidade percentual recuperada pelo processo usando a seguinte fórmula:

$$Rec\% = \frac{c_m}{c_p} \times 100$$

Onde:

c_m : concentração do analito na amostra fortificada;

c_p : concentração do analito na solução padrão.

No estudo de recuperação são realizados testes de significância, utilizando o teste “t” de Student de acordo com a seguinte fórmula⁶⁵:

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

Na qual: Rec = a média das recuperações obtidas para n repetições; 100 = a recuperação percentual desejada; n = o número de determinações (trabalha-se com no mínimo 5 repetições); S_{Rec} = o desvio padrão das recuperações.

Se o valor “ t ” obtido estiver enquadrado no intervalo estabelecido pelo valor tabelado, ou seja $t \leq t_{\text{tab}}$, para $n-1$ graus de liberdade em dado nível de significância, então o método será considerado exato, ou seja, não se pode afirmar diferenças significativas entre as recuperações obtidas e o valor esperado (100%).

É importante considerar como a eficiência do método varia em função da concentração da substância. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Por esse motivo, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse. Isso pode ser feito adicionando a substância em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de quantificação, próximo a concentração máxima permitida pelo método em teste e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método⁵⁹.

É importante ressaltar que o processo de fortificação tenta simular condições reais, não interferindo significativamente nas interações que ocorrem na própria amostra. Porém, isso nem sempre é possível, visto que a solução de fortificação é preparada com solventes orgânicos, geralmente não presentes na matriz. Por essa razão, tenta-se usar volume reduzido de solução de fortificação e condições que alterem a amostra o mínimo possível⁶⁹.

1.7 Caracterização do local de estudo

Devido à ausência de uma estação de tratamento de efluentes domésticos no município de São Carlos foi necessário realizar o estudo em outra cidade. Por estar localizada cerca de 40 km da cidade de São Carlos e por possuir uma ETE, Araraquara foi escolhida como local de estudo.

A área total do município de Araraquara é de 1.312 Km² com cerca de 80 Km² ocupados pelo espaço urbano, está localizada no centro geográfico do estado de São Paulo.

Segundo dados do Ministério da Saúde⁷⁰, a população feminina em idade fértil (10-49 anos) residente no município é de 64.894 mulheres, sendo a proporção da população feminina em idade fértil de 64,2% das mulheres. Não é reportada pelo Ministério da Saúde a proporção de mulheres que utilizam hormônios sintéticos ou naturais em terapias de reposição hormonal.

Após uma pesquisa realizada juntamente com farmácias e médicos de Araraquara, verificou-se que os anticoncepcionais orais mais utilizados naquela população, são os que possuem em suas composições o estrogênio sintético 17 α -etinilestradiol e o progestogênio sintético levonorgestrel.

1.7.1 A Estação de tratamento de efluentes de Araraquara

A Estação de Tratamento de Esgotos de Araraquara está localizada na Rodovia SP 255, na bacia hidrográfica do Médio Tietê inferior, tendo como corpo receptor o Ribeirão das Cruzes, enquadrado como rio classe 4 (CONAMA 20/86)⁷¹. Possui dois módulos com capacidade total de tratamento de 800 litros de esgotos por segundo. Cada módulo é composto de lagoa aerada, lagoa de sedimentação e lagoa de lodo⁵³. A seguir estão relatadas as etapas do tratamento de efluentes procedidos na estação de tratamento.

O resíduo bruto que chega na estação através de emissário subterrâneo é submetido a um gradeamento inicial para a separação dos detritos maiores. Separados os resíduos e objetos mais grosseiros, o efluente segue para os desarenadores, cuja função é separar a areia do líquido que seguirá para o tratamento nas lagoas.

Na lagoa de aeração o efluente é submetido à agitação mecânica realizada pelos aeradores, que promovem a oxigenação da mistura, eliminando gases indesejáveis e acelerando o processo de decomposição. O tempo médio de detenção na lagoa de aeração é de 3 dias, considerando uma vazão nominal média de cada módulo de 400L/s.

Na lagoa de sedimentação a água permanece por um período em descanso para que as partículas sólidas ainda presentes na mistura se depositem no fundo da mesma. O tempo médio de detenção é de 1,7 dias, e a vazão nominal média de cada módulo é de 400L/s. Ao longo desse processo de decantação as impurezas vão se transformando em lodo. Esse material (lodo) posteriormente será conduzido para a lagoa de lodo de onde poderá ser transferido para o aterro sanitário ou utilizado como adubo orgânico.

A Figura 6 apresenta o esquema da estação de tratamento de efluentes de Araraquara.

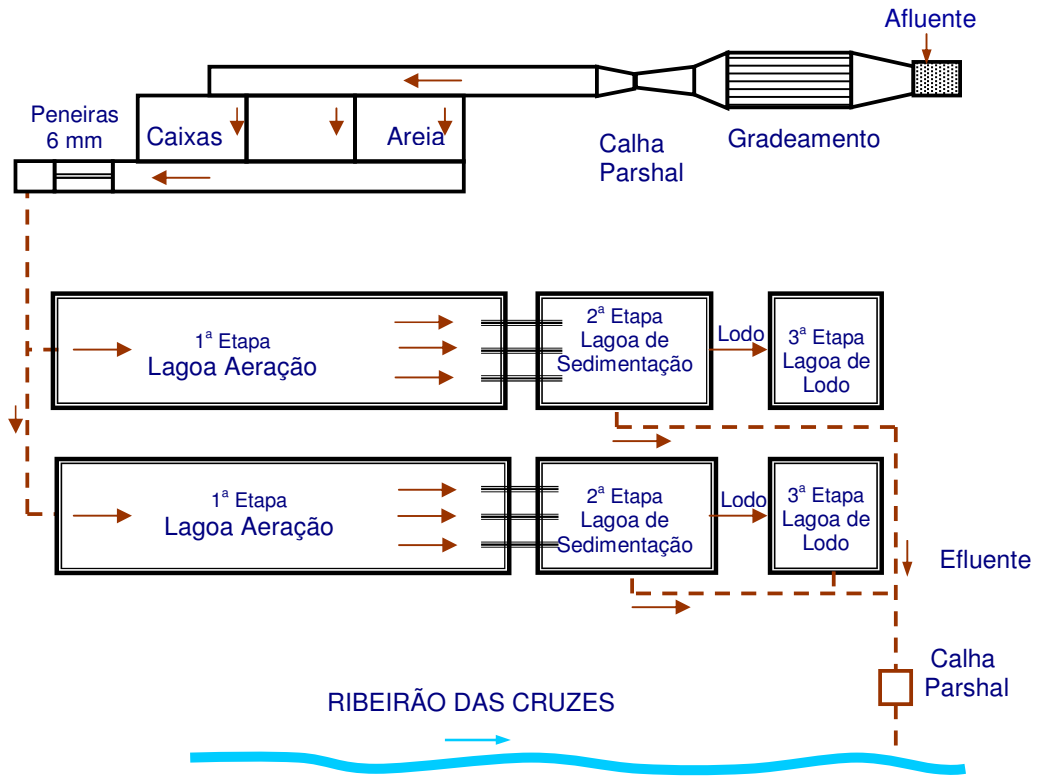


Figura 6: Esquema da ETE-Araraquara.

2. Objetivo Geral

Verificar a eficiência do tratamento de efluentes domésticos na remoção de hormônios femininos naturais (17β -estradiol e estrona) e sintéticos (levonorgestrel e 17α -etinilestradiol).

2.1 Objetivos específicos

- 1) Otimizar a separação dos hormônios por cromatografia em fase líquida utilizando detecção por ultravioleta e luminescente;
- 2) Otimizar os parâmetros envolvidos no processo de extração pela técnica SPE;
- 3) Verificar a eficiência do método analítico;
- 4) Quantificar os hormônios sexuais nos afluentes e efluentes da estação de tratamento de esgoto (ETE) do município de Araraquara-SP.

3. Parte Experimental

3.1 Materiais utilizados

Fase sólida

- Octadecil silano (C₁₈): cartucho AccuBOND C18 500mg/ 6mL– Agilent Technologies

Solventes

- Acetonitrila (*HPLC solvent*, J. T. Baker);
- Metanol (*HPLC solvent*, J. T. Baker);
- água Milli-Q.

Padrões analíticos

-17β-estradiol, estrona, 17α-etinilestradiol e levonorgestrel com pureza acima de 98% Sigma-Aldrich USA.

3.2 Instrumentação

Foi utilizado um equipamento espectrofotométrico do modelo Cary 5G UV-Vis-NIR (Varian) para obtenção dos espectros de absorção, que compreenderam uma varredura de 200 a 800 nm. Os comprimentos de onda correspondentes aos máximos de absorbância de cada analito, foram utilizados posteriormente para a determinação analítica dos hormônios pelo método cromatográfico com detecção de arranjo de díodos.

Também foi utilizado um equipamento espectrofluorímetro do modelo F-4500 (Hitachi) para a obtenção dos espectros de emissão dos analitos em estudo. Os comprimentos de onda correspondentes à excitação e emissão de cada analito, foram utilizados posteriormente para a determinação analítica dos hormônios pelo método cromatográfico com detecção luminescente.

Foram utilizados dois sistemas cromatográficos neste estudo, ambos de mesmo modelo (SLC-10A, Shimadzu), os quais consistiram em um injetor manual (seringa), com um volume de injeção ajustado para 20μL, e duas bombas modelo LC-10ADVP

(Shimadzu). Foram utilizados dois tipos de detectores, um sistema DAD modelo SPD-M10AVP (Shimadzu) e um espectrofluorímetro modelo RF-551 versão 2.4 (Shimadzu).

3.2.1 Condições cromatográficas

A coluna cromatográfica utilizada foi LC-18 Supelco, com 250mm de comprimento, diâmetro interno de 4,6mm e espessura do filme de 5 μ m. A eluição da fase móvel foi feita no modo isocrático, com a proporção dos solventes: acetonitrila/água de 48:52, com um fluxo de 1mL/min. No sistema DAD, os comprimentos de onda selecionados para a quantificação foram: 240nm para o levonorgestrel e 280nm para E1, E2 e EE2. No detector espectrofluorímetro, os comprimentos de onda selecionados para a excitação e emissão dos analitos E1, E2 e EE2 foram: 280nm e 306nm, respectivamente. O hormônio levonorgestrel não emite radiação fluorescente considerável para quantificação ao nível de traços, portanto, só foi analisado pelo sistema de detecção DAD.

3.3 Amostras

3.3.1 Esgoto sintético

Para se efetuar o estudo de recuperação, uma matriz simulando esgotos sanitários foi utilizada com o intuito de se ter uma amostra controle (testemunha) livre dos analitos de interesse e possibilitar condições de trabalho mais seguras em relação a riscos microbiológicos, uma vez que as etapas de otimização do método de extração necessitam de um longo período de análise, o que poderia acarretar em contaminação microbiológica. O procedimento analítico para o preparo da matriz de esgoto sintético está descrito na seção 3.5.

3.3.2 Obtenção e armazenamento das amostras de esgoto doméstico

As amostras de esgoto foram coletadas na ETE de Araraquara. A periodicidade de execução abrangeu duas estações de um ciclo anual (julho/agosto e novembro), para

melhor prover possíveis variações do desempenho do tratamento de efluentes durante as mudanças climáticas.

As coletas foram feitas em triplicata, em dois pontos da estação, os quais foram: após o gradeamento, antes de iniciar o tratamento, e após o término deste, antes de ser lançado no Ribeirão da Cruzes (Figura 7) . As amostras foram obtidas em volumes de 1 L e armazenadas em frascos de vidro âmbar com tampas de teflon, adicionou-se algumas gotas de metanol nas amostras de efluentes logo após a coleta, a fim de cessar as atividades microbianas. As amostras foram conservadas a 4°C até análise, que se procedeu no máximo em dois dias. Antes da extração, as amostras de efluentes foram filtradas em membrana 0,45µm para retirar as partículas em suspensão.

3.4 Preparação das soluções padrão individuais e misturas padrão

As soluções estoques individuais dos hormônios foram preparadas pela dissolução de cada composto em metanol. Pesou-se 10,0mg de cada substância e solubilizou-se, individualmente, em metanol, completando o balão para 1,0L de solução.

As misturas padrão foram preparadas em várias concentrações, pela diluição apropriada das soluções estoques individuais em metanol.

Todas as soluções foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e estocadas a 4°C.

3.5 Preparação das amostras de esgoto sintético

O esgoto sintético foi preparado a partir da mistura dos seguintes compostos: sacarose, amido, celulose, extrato de carne, óleo de soja, NaCl, MgCl₂.H₂O, CaCl₂.2H₂O, NaHCO₃ e detergente comercial.

Segundo recomendações de Torres⁷², os componentes orgânicos foram dissolvidos em 1 litro de água do sistema público de abastecimento de água e depois fervido durante aproximadamente 2 horas, com agitação continua para garantir que as soluções ficassem homogêneas e evitar a formação de grumos, principalmente na solução de amido e celulose. Este procedimento não foi feito com a sacarose, pois os

açúcares são geralmente consumido crus, enquanto os outros componentes, usualmente são previamente cozidos.

Além dos componentes orgânicos, o esgoto sintético foi enriquecido com soluções de sais minerais e de metais, normalmente presentes em águas residuárias. Para corrigir o pH e a alcalinidade do esgoto sintético, foi utilizado bicarbonato de sódio (faixa 6-8). Adicionou-se gotas de detergente, com o objetivo de emulsionar as gorduras e também porque o detergente é um componente normal no esgoto sanitário, em concentrações baixas.

As amostras de esgoto sintético foram armazenadas em frascos de vidro âmbar a 4°C.

A composição do substrato sintético utilizado neste estudo está relatada na Tabela 3.

Tabela 3: Composição da água residuária sintética.

Substâncias	Concentração (mgL ⁻¹)
Sacarose	35
Amido	114
Celulose	34
Extrato de carne	208
Óleo de soja	51
NaCl	250
MgCl ₂ .6H ₂ O	7
CaCl ₂ .2H ₂ O	4,5
NaHCO ₃	200
Detergente comercial	3 gotas

Referência 72.

3.6 Fortificação das amostras

As amostras de esgoto sintético foram fortificadas em três níveis de concentração. Tomou-se 5 replicatas de 100,0mL de amostra testemunha (esgoto sintético) para cada nível de fortificação, estas amostras foram dopadas com os

hormônios estudados. A Tabela 4 apresenta as concentrações dos analitos em 100,0 mL de solução, referentes a cada nível de fortificação.

Tabela 4: Concentrações dos analitos em cada nível de fortificação.

Hormônios	Nível 1*	Nível 2*	Nível 3*	Nível 1**	Nível 2**	Nível 3**
	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)
Levonorgestrel	0,250	0,375	0,500	-	-	-
Estrona (E1)	2,50	3,75	500	0,750	1,00	1,25
17 β -estradiol (E2)	2,50	3,75	500	0,150	0,200	0,250
17 α -etinilestradiol (EE2)	2,50	3,75	500	0,200	0,250	0,300

*Análise realizada no sistema de detecção DAD

** Análise realizada no sistema de detecção Fluorescente

3.7 Procedimento de extração por SPE

3.7.1 Extração da amostra testemunha

Para a extração dos hormônios, cerca de 200mL da amostra testemunha foi retirada da geladeira e esperou-se atingir temperatura ambiente. Filtrou-se a vácuo em membrana 0,45 μm . Transferiu-se 100,0mL para um balão volumétrico (100,0mL), homogeneizou e procedeu-se a extração. A extração foi feita em manifold a vácuo. Antes da percolagem da amostra o cartucho foi condicionado com 5mL de metanol, 7mL de acetonitrila e 5mL de água Milli-Q, em uma razão de fluxo de 3mL min⁻¹. Após a passagem de 100,0mL da amostra (fluxo de 2mL min⁻¹), lavou-se o cartucho com 5mL de água Milli-Q, o cartucho, então, foi seco a vácuo (40 a 50 kPa) por 1 hora. Procedeu-se a eluição com 6mL de acetonitrila (fluxo de 1 mL min⁻¹). O extrato coletado, após o término da extração, foi seco sob um suave fluxo de nitrogênio. O extrato seco foi reconstituído em 500 μL de metanol e homogeneizado. Executou-se a análise cromatográfica. A Figura 7 apresenta as etapas de extração dos analitos.

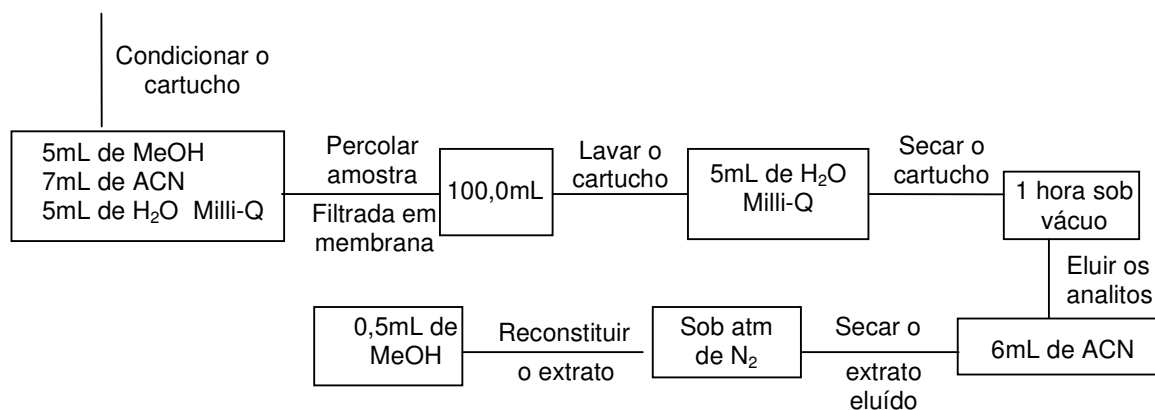


Figura 7: Esquema de extração dos analitos.

3.7.2 Extração das amostras fortificadas

As amostras fortificadas foram homogêneas e deixadas em repouso, à temperatura ambiente, por cerca de 30 minutos. A seguir, foram filtradas a vácuo em membrana 0,45 μ m e realizou-se o procedimento de extração, como descrito na seção 3.7.1.

3.7.3 Extração das amostras de esgoto da ETE-Araraquara

Antes da extração dos hormônios as amostras de esgoto bruto (afluente) e esgoto tratado (efluente) foram filtradas a vácuo em membrana 0,45 μ m, a fim de se eliminar as partículas sólidas em suspensão. Procedeu-se à etapa de extração, percolando-se 250,0mL de amostra pelo cartucho.

3.8 Avaliação do método proposto

3.8.1 Determinação da linearidade de resposta dos detectores (DAD e Fluorescência)

As regiões lineares de resposta dos detectores foram determinadas pelas análises nos cromatógrafos (HPLC-DAD e HPLC-Fluorescência), com condições operacionais já otimizadas. As soluções da mistura de padrões foram injetadas três vezes. As concentrações utilizadas para o estudo dos hormônios E2, EE2 e E1 no detector DAD, foram: 0,300; 0,500; 0,750; 1,00 e 1,25mg L⁻¹, enquanto que para o hormônio levonorgestrel foram: 0,050; 0,075; 0,10; 0,30 e 0,50mg L⁻¹. No detector de fluorescência, as concentrações de E2 foram: 0,015; 0,030; 0,040; 0,050 e 0,060mg L⁻¹, para EE2 foram: 0,030; 0,040; 0,050; 0,060 e 0,070mg L⁻¹ e para E1 foram: 0,12; 0,15; 0,20; 0,25; e 0,30mg L⁻¹. Foram construídos gráficos de calibração para cada hormônio estudado, relacionando-se os valores de concentração das soluções no eixo das abcissas e os valores das áreas dos picos no eixo das ordenadas.

3.8.2 Determinação dos limites de detecção e quantificação pelos equipamentos (HPLC-DAD e HPLC-Fluorescência)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estabelecidos experimentalmente através da análise de misturas padrão, contendo os hormônios estudados, em concentrações decrescentes.

Os limites de detecção e quantificação dos instrumentos para cada contaminante estudado foram determinados seguindo recomendações do programa computacional *validate 1.0*⁷³. Preparou-se uma série de soluções diluídas do padrão analítico de cada composto. Analisou-se cada uma das soluções no cromatógrafo e obteve-se os cromatogramas de interesse. Determinaram-se o valor da amplitude do ruído na região do pico cromatográfico do analito de interesse, o valor da altura do pico cromatográfico e a concentração relativa ao pico cromatográfico do analito de interesse. Esses valores foram selecionados no programa, e este calculou os LD e LQ.

3.8.3 Estudo de recuperação

A avaliação do método quanto à precisão e exatidão foi feita a partir de estudos de recuperação dos analitos, o qual foi realizado aplicando-se o método proposto (seção 3.7) em amostras enriquecidas de esgoto sintético em três níveis de concentração das soluções de padrões (seção 3.6).

O procedimento experimental constou da adição de volumes das soluções padrões na matriz de esgoto sintético, a fim de que as concentrações finais dos analitos após a etapa de extração (em 500 μ L de extrato final) fossem:

- para a análise no sistema de detecção DAD: 0,50; 0,75 e 1,0mg L⁻¹ para E1, E2 e EE2; e 0,050; 0,075 e 0,10mg L⁻¹ para levonorgestrel.

- para o sistema de detecção fluorescente: 0,03; 0,04 e 0,05mgL⁻¹ para E2; 0,04; 0,05 e 0,06mgL⁻¹ e EE2; e 0,15; 0,20 e 0,25mg L⁻¹ para E1.

Por exemplo, para se obter a concentração de 1,0mg L⁻¹ de E1 em 0,5mL de solução final, necessita-se de 5.10⁻⁴mg do analito ($c = \frac{m}{v} \rightarrow 1,0 \text{ mgL}^{-1} \cdot 0,50 \cdot 10^{-3} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mg}$). Como foi percolado um volume de 100,0mL de esgoto sintético enriquecido pelo cartucho, esta amostra deve ter concentração de 5.10⁻³mgL⁻¹ ($c = \frac{m}{v} \rightarrow c = \frac{5 \cdot 10^{-4} \text{ mg}}{100 \cdot 10^{-3} \text{ L}} = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mgL}^{-1}$). Partindo-se de uma solução estoque de 10 mgL⁻¹, o volume da solução padrão a ser adicionado na matriz de esgoto sintético é de 0,05mL ($c_{\text{padrão}} \cdot v_{\text{padrão}} = c_{\text{amostra}} \cdot v_{\text{amostra}} \rightarrow 10 \text{ mgL}^{-1} \cdot v_{\text{padrão}} = 5 \cdot 10^{-3} \cdot 100 \text{ mL} \rightarrow 0,05 \text{ mL}$, ou 50 μ L). Portanto para se obter a concentração de 1,000mg L⁻¹ dos analitos em 0,5000mL de extrato final, é necessário adicionar 0,05000mL de uma solução 10,00mgL⁻¹ de cada um e completar o volume para um balão de 100,0mL.

4. Resultados e Discussões

4.1 Seleção dos comprimentos de onda utilizados em HPLC-DAD

Obteve-se os espectros de absorção correspondentes aos hormônios em estudo, os quais compreendem uma varredura de 200 a 800nm. Os comprimentos de onda correspondentes aos máximos de absorbância de cada analito, foram selecionados posteriormente para a determinação analítica dos hormônios pelo método cromatográfico com detecção arranjo de diodos.

A Figura 8 apresenta, como exemplo, o espectro UV-Vis do 17β -estradiol obtido pelo equipamento espectrofotômetro. Os comprimentos de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) selecionados foram 240nm para o levonorgestrel e 280nm para os demais compostos.

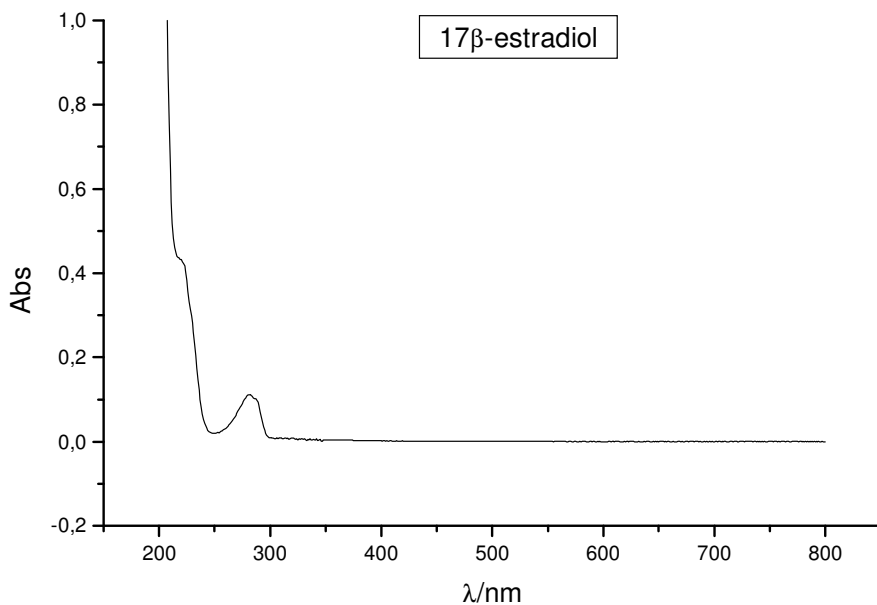


Figura 8: Espectro UV-Vis do hormônio natural 17β -estradiol.

4.2 Seleção dos comprimentos de onda utilizados em HPLC-Fluorescência

Obteve-se os comprimentos de onda de excitação e emissão de cada analito em estudo, os quais foram selecionados posteriormente para a determinação analítica dos hormônios pelo método cromatográfico com detecção fluorescente. A Figura 9 apresenta, como exemplo, o espectro de emissão do 17β -estradiol obtido pelo espectrofluorímetro. Os comprimentos de onda selecionados para excitação e emissão de E2, EE2 e E1 foram: 280 e 306 nm.

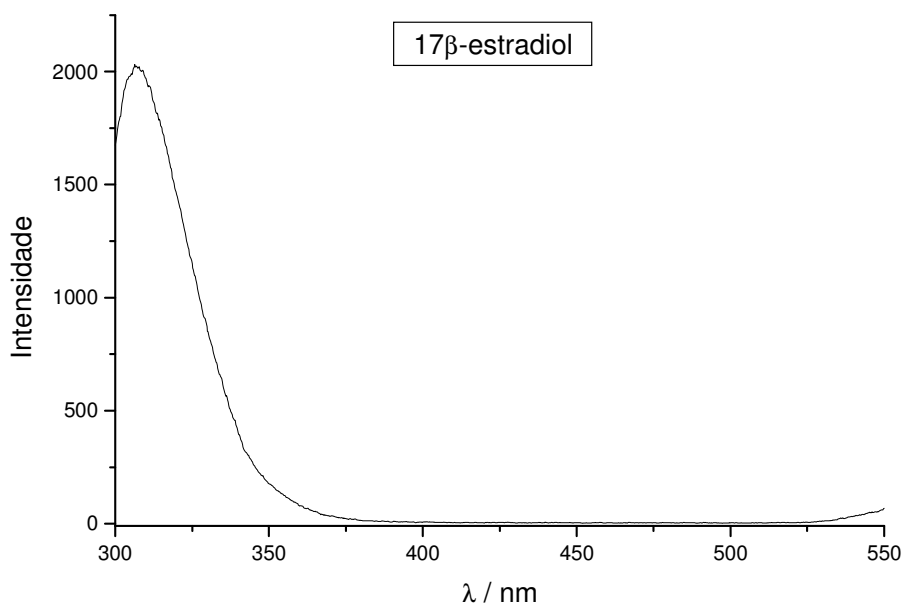


Figura 9: Espectro de Emissão do hormônio natural 17β -estradiol.

O hormônio levonorgestrel não apresentou radiação fluorescente notável, isso se deve ao fato que a fluorescência dificilmente resulta da absorção de radiação ultravioleta de comprimentos de onda menores que 250nm, porque tal radiação é suficientemente energética para causar desativação dos estados excitados por pré-dissociação ou dissociação da molécula (ruptura de ligações)⁷⁴. Como este analito possui um máximo de absorção de radiação em 240nm, não se observou uma radiação fluorescente considerável.

4.3 Desenvolvimento da análise qualitativa dos hormônios por cromatografia líquida de alta eficiência

A etapa inicial da análise qualitativa por HPLC consistiu na otimização dos parâmetros experimentais como: escolha da coluna, composição da fase móvel e fluxo da fase móvel. O estabelecimento das condições iniciais de análise foi feito utilizando soluções-padrão individuais e a mistura de padrões.

Esta otimização foi realizada no HPLC-DAD, devido a maior disponibilidade deste equipamento em relação ao HPLC-Fluorescência.

4.3.1 Otimização das condições experimentais da separação cromatográfica

Para se obter uma melhor separação cromatográfica, algumas colunas foram testadas, as quais variaram o comprimento, a fase estacionária e o tamanho da partícula da fase estacionária, sendo estas:

- Coluna RP-8, 200mm X 4,6mm, 10 μ m, Hewlett Packard;
- Coluna RP-18, 150mm X 4,6mm, 5 μ m, Hewlett Packard;
- Coluna RP-18, 200mm X 4,6mm, 10 μ m, Hewlett Packard;
- Coluna RP-18, 250mm X 4,6mm, 3 μ m, Hewlett Packard;
- Coluna LC-18, 250mm X 4,6mm, 5 μ m, Supelco.

A composição da fase móvel também foi testada. Avaliou-se a mistura metanol/água e acetonitrila/água em várias proporções desde 30% a 100% dos solventes orgânicos, tanto no modo isocrático como gradiente.

Para otimizar o tempo de análise sem comprometer a separação dos picos, o fluxo da fase móvel foi submetido à variação de 0,2 a 1,0mL.min⁻¹.

As condições operacionais que proporcionaram uma separação adequada dos compostos de interesse, em um menor tempo de análise, foram descritas na seção 3.7.1.

A Figura 10 apresenta os cromatogramas da mistura de padrões dos hormônios obtidos com as condições cromatográficas estabelecidas para o método.

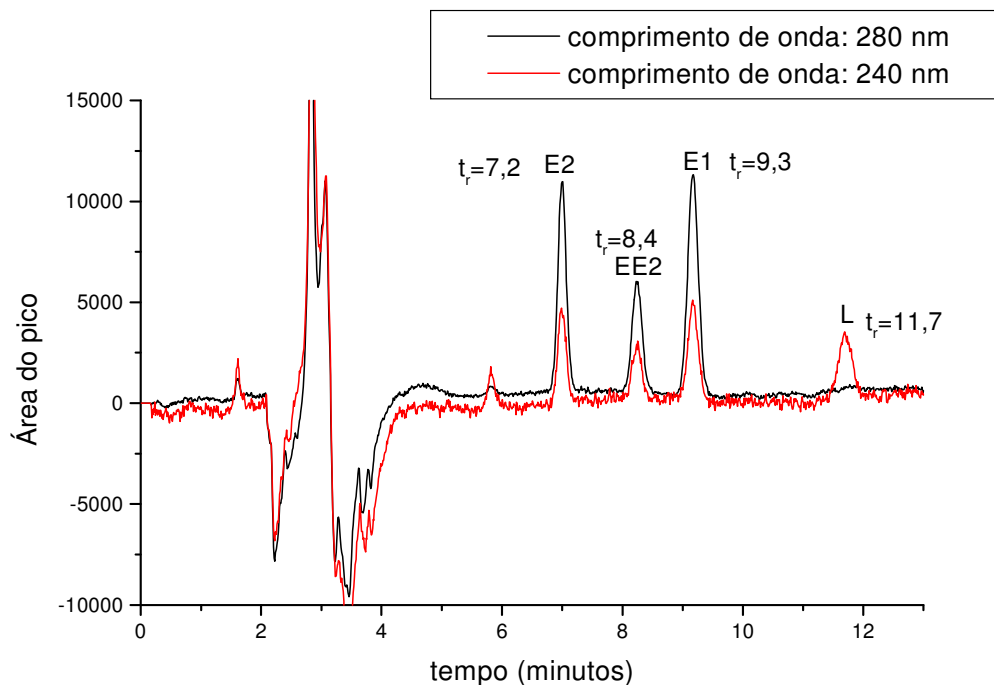


Figura 10: Cromatogramas dos hormônios estudados obtidos pelo HPLC-DAD, onde: L (levonorgestrel), E2 (17β -estradiol); E1 (estrona) e EE2 (17α -etinilestradiol). Concentrações: $0,3\text{mg L}^{-1}$ de cada analito.

De acordo com o cromatograma apresentado, as condições experimentais estabelecidas foram adequadas, pois se pode notar a boa separação dos analitos, isto é, não houve co-eluição das espécies, o que prejudicaria a quantificação das mesmas.

4.3.2 Desenvolvimento da metodologia de extração dos hormônios da matriz de esgoto sintético pela técnica de extração em fase sólida (SPE)

A metodologia de extração utilizada neste trabalho, baseou-se em vários estudos ^{36,39,41,43-45}. Para o estabelecimento da metodologia, vários parâmetros para a extração dos hormônios foram verificados, desde a escolha do cartucho, etapa de condicionamento do cartucho (escolha dos solventes: metanol e acetonitrila), tempo de secagem do cartucho, solvente extrator e solvente para reconstituição da amostra.

Os testes preliminares, realizados para a otimização dos principais parâmetros que afetam a eficiência do processo de extração em fase sólida, foram feitos utilizando-se volumes de 100,0mL de amostras de esgoto sintético dopadas com os hormônios no nível de fortificação 3 (HPLC-DAD): $0,5\mu\text{g L}^{-1}$ para levonorgestrel, $5\mu\text{g L}^{-1}$ para E1, E2 e EE2. Foram feitas duplicatas das extrações e triplicatas das injeções cromatográficas. A recuperação foi o parâmetro utilizado para avaliar a eficiência da extração do processo analítico, sendo reportada como porcentagem da quantidade medida do analito em relação à quantidade adicionada na matriz de esgoto sintético (testemunha), após as etapas de extração do método.

Com o intuito de se obter uma melhor recuperação multiresíduos, três cartuchos foram testados, os quais foram:

- SPE C₁₈ – 500 mg/3mL, J. T. Baker Bakerbond,
- SPE C₁₈ – 500 mg/6mL, J. T. Baker Bakerbond,
- SPE C₁₈ – 500 mg/6mL, Bond^{II} ODS.

Os cartuchos SPE C₁₈ – 500mg/6mL das marcas J. T. Baker Bakerbond e Bond^{II} ODS não mostraram diferenças significativas nas porcentagens de recuperação das amostras de esgoto sintético fortificadas com soluções padrões dos analitos, sendo estas recuperações superiores a do cartucho 500mg/3mL - J. T. Baker Bakerbond (Figura 11).

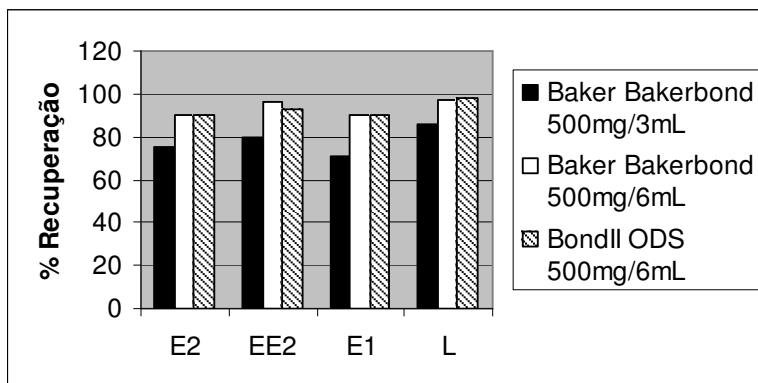


Figura 11: Porcentagens de recuperação dos hormônios em esgoto sintético, no nível de fortificação 3 (HPLC-DAD), utilizando diferentes cartuchos para extração.

De acordo com os resultados de recuperação apresentados pela Figura 11, as extrações podem ser feitas utilizando qualquer uma das marcas, desde que a capacidade do cartucho seja 500mg/6mL.

Em relação aos solventes empregados para o condicionamento do cartucho, pode-se verificar de acordo com a Figura 12, que os resultados de recuperação dos analitos foram baixos quando somente metanol/água, e acetonitrila/água foram utilizados para o condicionamento do cartucho, ou seja, somente metanol/água ou somente acetonitrila/água não é suficiente para ativar o adsorvente contido no cartucho (C_{18}), no entanto mostrou-se adequado à série metanol, acetonitrila e água (Figura 12).

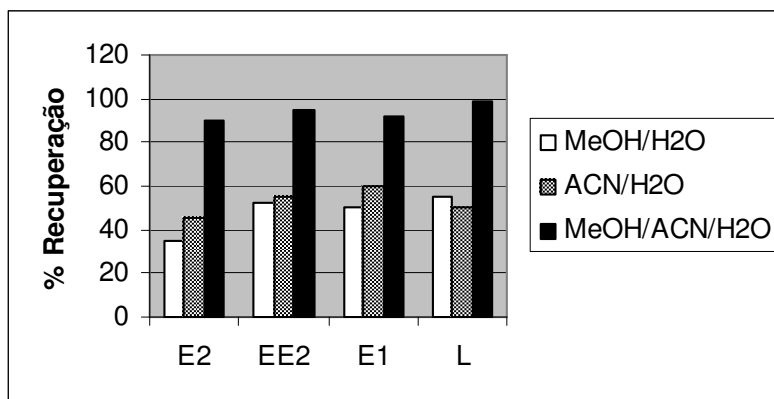


Figura 12: Porcentagens de recuperação dos hormônios em esgoto sintético, no nível de fortificação 3, com diferentes condições de condicionamento do cartucho.

Testou-se 3 períodos de secagem dos cartuchos, os quais foram: 30 minutos, 45 minutos e 60 minutos. O período suficiente de secagem do cartucho para não prejudicar a recuperação dos analitos foi de 1 hora (Figura 13).

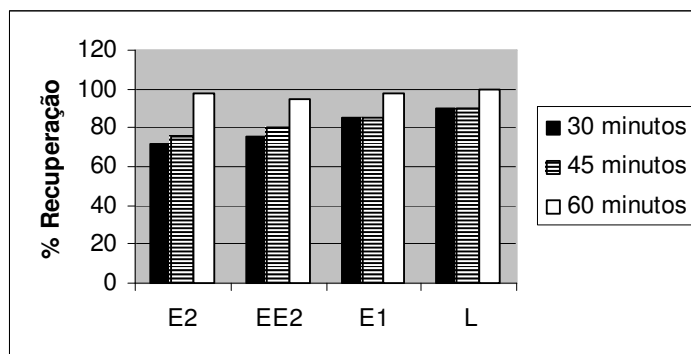


Figura 13: Porcentagens de recuperação dos hormônios em esgoto sintético, no nível de fortificação 3, com diferentes períodos (tempos) de secagem do cartucho.

A secagem do cartucho após a passagem da amostra foi imprescindível, quando o cartucho não estava seco o suficiente, a recuperação dos analitos foi relativamente baixa (60-80%), isso ocorre devido à hidratação dos analitos pelas moléculas de água presentes, impedindo o solvente extrator (acetonitrila) de interagir com os analitos, logo

é necessária uma secagem eficiente do cartucho (tempo de 60 minutos) para garantir uma boa recuperação dos analitos.

Foram testados dois solventes para a extração dos analitos, acetonitrila e metanol, e volumes de 5mL e 6mL. Dentre eles o que demonstrou melhor extração dos analitos em um menor volume (6mL) foi a acetonitrila (Figura 14). Não houve variação significativa das porcentagens de recuperação do hormônio levonorgestrel quando se empregou 6mL MeOH ou ACN como solvente para a extração (cerca de 100% nos dois casos).

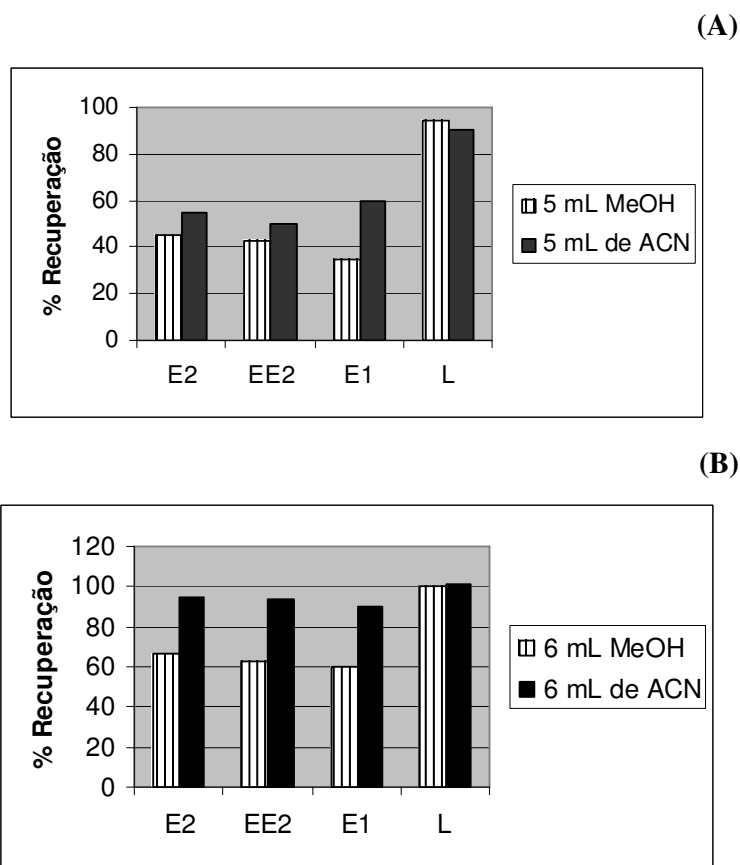


Figura 14: Porcentagens de recuperação dos hormônios em esgoto sintético, no nível de fortificação 3 (HPLC-DAD). (A) eluição com 5mL dos solventes MeOH e ACN; (B) eluição com 6 mL dos solventes MeOH e ACN.

A Figura 15 apresenta as porcentagens de recuperação de E2, EE2 e E1 utilizando ACN como solvente para a reconstituição do extrato, foram 70, 72 e 81% respectivamente, enquanto que usando MeOH, as porcentagens de recuperação para estes analitos foram superiores (próximas a 100%). Isto se deve a maior solubilidade

dos analitos em MeOH. Não houve variação significativa das porcentagens de recuperação do hormônio levonorgestrel quando se empregou MeOH ou ACN como solvente para a reconstituição da amostra (cerca de 100% nos dois casos). Logo, empregou-se MeOH para reconstituição da amostra, pois se obteve porcentagens mais altas de recuperação dos hormônios E2, EE2 e E1.

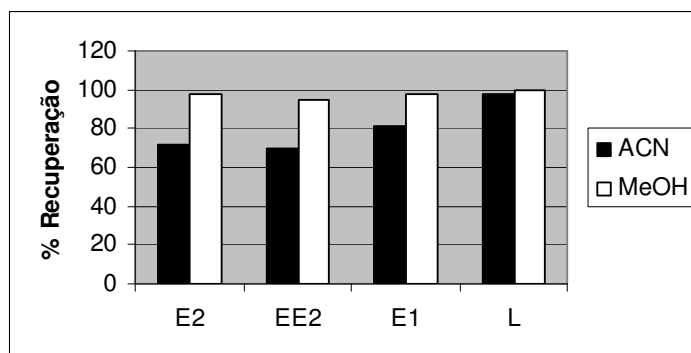


Figura 15: Porcentagens de recuperação dos hormônios em esgoto sintético, no nível de fortificação 3, reconstituídos com 500 μ L de MeOH e 500 μ L de ACN.

O procedimento proposto para a extração dos hormônios da matriz de esgoto sintético (seção 3.7), permite uma pré-concentração dos analitos de 200 vezes, já que 100,0mL de amostra são submetidos a SPE, resultando em 0,5mL de extrato final.

Para as amostras coletadas na estação de tratamento de efluentes, o volume submetido a SPE foi de 250,0mL, pois a concentração dos analitos em amostras de efluentes são muito baixas, na razão de nanogramas por litro^{35,39,40}, logo foi necessária uma pré-concentração de 500 vezes.

Como a extração dos analitos em 250,0mL demanda um longo período, verificou-se a possibilidade do estudo de recuperação ser realizado com extrações de um volume de 100,0mL. Para verificar se havia diferença nas porcentagens de recuperação dos analitos, entre a passagem de 100,0mL e 250,0mL de amostras dopadas, vários ensaios foram realizados para comparação dos dois procedimentos e nenhuma diferença foi observada nas avaliações das porcentagens de recuperação. Logo, foi adotado nos estudos de recuperação dos hormônios a percolagem de 100,0mL de amostra, o que tornou o procedimento experimental mais rápido e menos exaustivo.

4.4 Avaliação do método SPE/HPLC-DAD para a matriz de esgoto sintético

Os parâmetros de desempenho investigados foram: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão.

4.4.1 Seletividade

Para testar a seletividade do método, foram analisados extratos brancos de esgoto sintético (Figura 16) e extratos fortificados com os hormônios (Figura 17). No extrato branco, não foram observados picos de compostos durante todo o tempo de corrida, apenas sinais característicos do solvente e/ou impurezas no início do cromatograma (Figura 16).

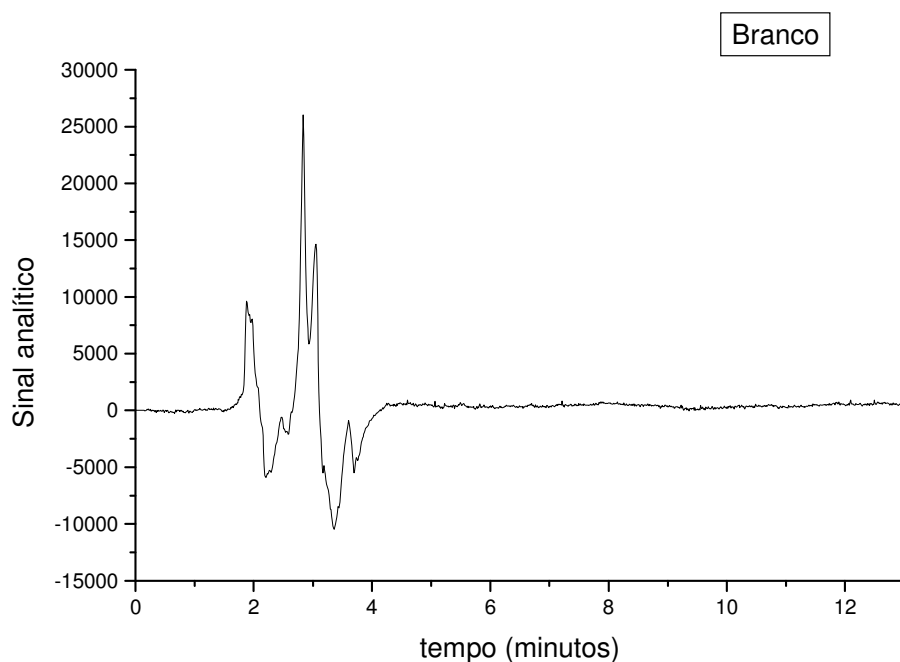


Figura 16: Cromatograma obtido por HPLC-DAD do extrato branco de esgoto sintético, após aplicação do método de extração proposto.

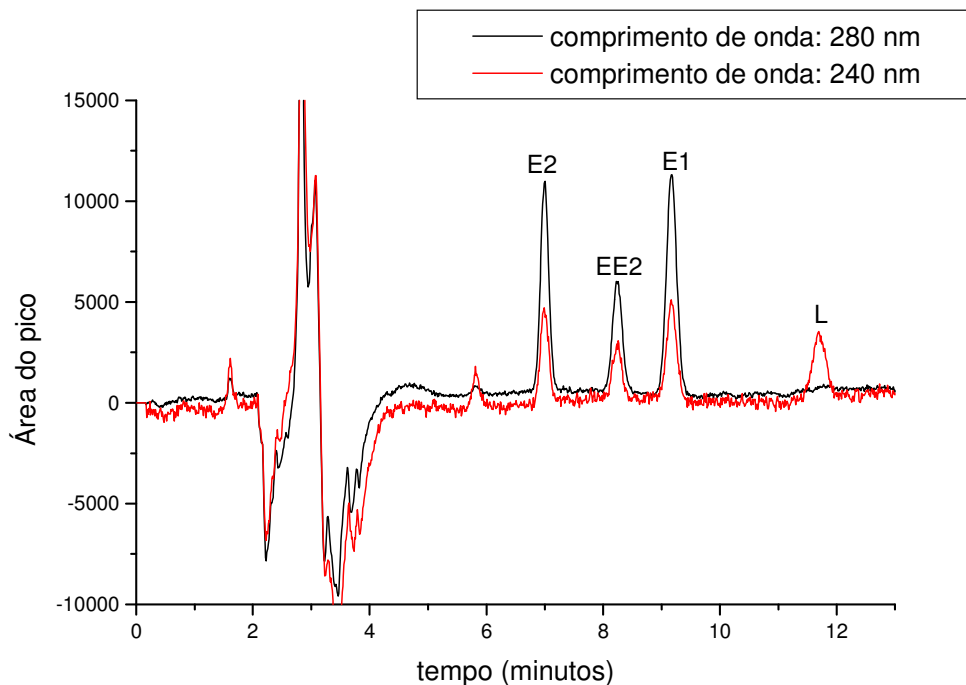


Figura 17: Cromatograma obtido por HPLC-DAD do esgoto sintético fortificado (nível 2), após aplicação do método de extração proposto.

De acordo com a Figura 17, pode-se observar que não houve co-eluição de interferentes com os analitos alvos pelo método aplicado.

4.4.2 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram estabelecidos experimentalmente através da análise de misturas padrão, contendo os hormônios estudados, em concentrações decrescentes. Foram calculados através do programa computacional *Validate 1.0*⁷², no qual foi necessário entrar com o valor da amplitude do ruído na região do pico cromatográfico do analito de interesse, com o valor da altura do pico cromatográfico do analito de interesse e com a concentração relativa ao pico cromatográfico mencionado no item anterior.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos hormônios fornecidos pelo programa *Validate 1.0* estão contidos na Tabela 5.

Tabela 5: Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os hormônios estudados.

Hormônios	LD (mgL ⁻¹)	LQ (mgL ⁻¹)
17β-estradiol (E2)	0,0769	0,231
17α-etinilestradiol (EE2)	0,0833	0,250
Estrona (E1)	0,0800	0,240
Levonorgestrel	0,0164	0,049

Pode-se observar que não há diferenças significantivas entre os valores de limites de detecção dos analitos E2, EE2 e E1, no entanto, pode-se observar uma distinção entre o LD do levonorgestrel em relação aos LDs dos outros analitos. Essa divergência ocorre devido a maior sensibilidade deste analito (levonorgestrel) ao detector UV, isto é, a conjugação da dupla ligação com o grupo carbonil proporciona uma absorção intensa ($\epsilon = 8000$ a 20000) correspondente da transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do grupo carbonil, esta absorção é encontrada entre 220 e 250nm. A transição $n \rightarrow \pi^*$ é bem menos intensa ($\epsilon = 50$ a 100) e se apresenta entre 310 a 330nm⁷⁵ (Figura 3).

No caso das substâncias aromáticas, E2, EE2 e E1 (Figura 3), a baixa sensibilidade é devido as intensidades baixas de absorção (ϵ) do anel benzênico na região ultravioleta. Há três transições eletrônicas no anel benzênico, estas transições são chamadas de bandas primárias, que compreendem os comprimentos de onda de 184 e 202nm, e a banda secundária em 255nm. A banda primária que aparece em 184nm possui uma absorvidade molar de 47000, sendo esta uma transição permitida. Entretanto, esta transição não é observada sob condições experimentais usuais, uma vez que esta absorção (184nm) é observada na região espectral do ultravioleta no vácuo, que não compreende o alcance de varredura do equipamento utilizado (200-800nm). A banda em 202nm é bem menos intensa ($\epsilon = 7400$), e corresponde a uma transição proibida. A banda secundária (255nm) é a menos intensa das bandas do benzeno ($\epsilon = 230$), e corresponde também a uma transição eletrônica proibida⁷⁵. Devido a essas características estruturais, os sinais analíticos de E2, EE2 e E1 são pouco intensos na região ultravioleta.

Considerando a pré-concentração de 500 vezes dos analitos, uma vez que 250,0mL de amostra de efluentes é submetida a SPE, resultando em 0,5mL de extrato final, permite-se inferir que esta técnica possibilita a análise de amostras com

concentrações de 462ng L⁻¹ de E2, 500ng L⁻¹ de EE2, 480ng L⁻¹ de E1 e 98ng L⁻¹ de levonorgestrel.

Devido aos altos valores de LD e LQ do instrumento (detector) para E2, EE2 e E1, optou-se por utilizar também o detector de fluorescência.

4.4.3 Linearidade

Como não há uma legislação na qual se limite à quantidade máxima permitida desses contaminantes em efluentes de rios, ETEs e águas subterrâneas e considerando que em nível de traços (nanogramas) estes agentes já possam causar algum dano à biota aquática^{1-5,11,35,39,40}, a linearidade dos hormônios foi estudada utilizando misturas de calibração, em cinco níveis de concentração próximos aos limites de quantificação dos hormônios.

Na Tabela 6 são apresentados os intervalos de concentração estudados, as equações de regressão linear e o coeficiente de correlação (r^2) dos gráficos de calibração para os quatro hormônios.

Tabela 6: Intervalos de concentrações estudados, equações de regressão linear e coeficientes de correlação (r^2) dos gráficos de calibração obtidos para os hormônios estudados. (y = área cromatográfica e x = concentração).

Hormônios	Intervalo (mg L ⁻¹)	Equação de regressão linear	Coefficiente de correlação (r^2)
17 β -estradiol (E2)	0,3 a 1,25	$y = 10243,70884 x + 109,38128$	0,9935
17 α -etinilestradiol (EE2)	0,3 a 1,25	$y = 8649,50607 x + 53,57539$	0,9993
Estrona (E1)	0,3 a 1,25	$y = 13783,83882 x + 283,2825$	0,9989
Levonorgestrel	0,05 a 0,5	$y = 62874,76351 x - 1028,92652$	0,9997

Os gráficos de calibração obtidos para todos os hormônios foram lineares, apresentado coeficientes de correlação (r^2) superiores a 0,9900, que é recomendado pela ANVISA⁶⁰ para validação de métodos analíticos. Esses bons coeficientes de correlação demonstram que a resposta do detector foi linear nos intervalos de concentração estudados.

Na Figura 18 está apresentada a curva analítica para o hormônio 17 α -etinilestradiol como exemplo. As demais curvas analíticas se encontram no anexo.

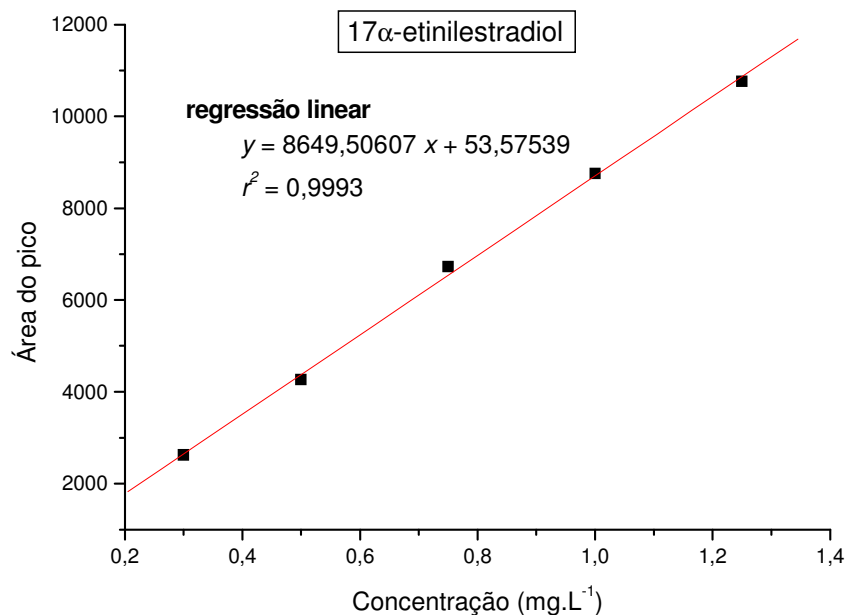


Figura 18: Curva de calibração do 17 α -etinilestradiol no intervalo de concentração de 0,300 – 1,25mg L⁻¹.

4.4.4 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão do método foram determinadas a partir de ensaios de recuperação com amostras de esgoto sintético em 3 níveis de concentração (2,50; 3,75 e 5,00 μ g L⁻¹ para E1, E2 e EE2, 0,250; 0,375 e 0,500 μ g L⁻¹ para levonorgestrel). Os níveis de fortificação utilizados neste estudo foram escolhidos de acordo com os limites de quantificação dos analitos.

As porcentagens de recuperação dos analitos nos três níveis estudados são apresentadas na Tabela 7. Para confirmar a exatidão do método, os resultados foram submetidos ao teste “t” de Student de significância.

Tabela 7: Resultados de percentuais de recuperação e coeficientes de variação para os hormônios, em amostras de esgoto sintético, nos três níveis de fortificação estudados.

Hormônios	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação* (%)	CV (%)	$t_{\text{calculado}}$
17 β -estradiol (E2)	2,50	94 (89-100)	5,8	-2,31
	3,75	102 (97-104)	3,0	1,66
	5,00	108 (83-123)	13,5	1,25
17 α -etinilestradiol (EE2)	2,50	101 (97-102)	2,2	0,24
	3,75	98 (93-104)	4,5	-1,19
	5,00	109 (97-122)	8,7	2,10
Estrona (E1)	2,50	102 (97-111)	2,2	2,44
	3,75	102 (100-105)	2,2	2,44
	5,00	106 (95-114)	7,7	1,67
Levonorgestrel	0,250	102 (99-104)	2,0	2,74
	0,375	99 (94-104)	3,9	-0,11
	0,500	95 (89-98)	3,9	-2,55

Nota: * é a média aritmética (n=5) entre os valores de recuperação, CV é o coeficiente de variação dos resultados, $t_{95\%}=2,78$.

O teste “t”, com 95% de confiança e n-1 graus de liberdade, apresentou valores calculados absolutos menores que o valor tabelado ($t_{95\%}=2,78$). Deste modo, não se pode afirmar a existência de diferenças significativas entre as recuperações obtidas e o valor esperado (100%), considerando, então, que o método é exato.

Para o estudo de precisão, os intervalos dos coeficientes de variação são considerados adequados até $\pm 20\%$ e, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de até $\pm 15\%$ ⁵⁹. Como todos os valores de CV mostraram-se inferiores ao estabelecido, o método proposto foi considerado preciso.

Os resultados da Tabela 7, apontam que o método proposto para a determinação dos hormônios é eficiente quanto à exatidão (% recuperação) e a precisão (coeficiente de variação) para os níveis de fortificação estudados (2,50; 3,75 e 5,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ para E1, E2 e EE2; e 0,25; 0,375 e 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para levonorgestrel) em um mesmo dia, mesmo analista, mesmo método, mesmo instrumento, mesmo local, repetições em um curto intervalo de tempo (repetibilidade).

4.5 Avaliação do método SPE/HPLC-Fluorescência para a matriz de esgoto sintético

Os mesmo parâmetros de desempenho investigados para o método SPE/HPLC-DAD foram abordados neste estudo de avaliação, sendo eles: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão.

4.5.1 Seletividade

Para testar a seletividade do método, foram analisados extratos brancos de esgoto sintético e extratos fortificados com os hormônios. No extrato branco, não foram observados picos de compostos no tempo de retenção dos hormônios (Figura19).

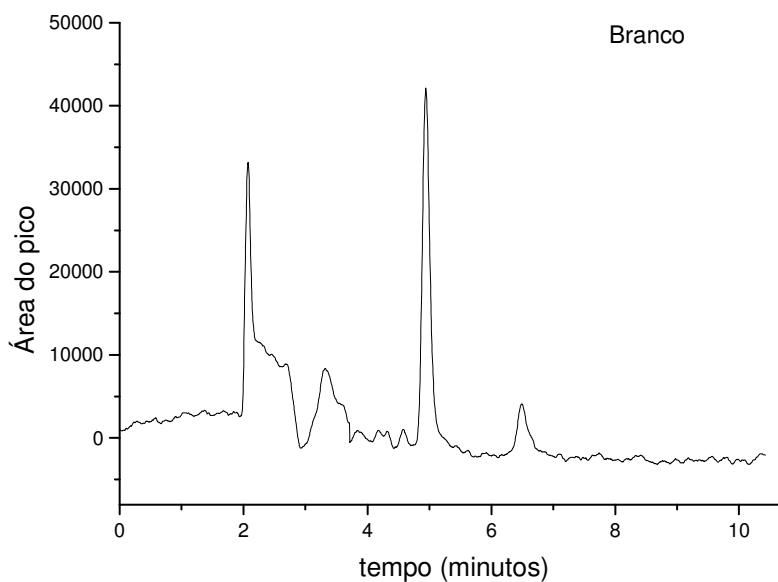


Figura 19: Cromatograma obtido por HPLC-Fluorescência do extrato branco de esgoto sintético, após aplicação do método de extração proposto. Comprimentos de onda selecionados: λ excitação=280nm, λ emissão=306nm.

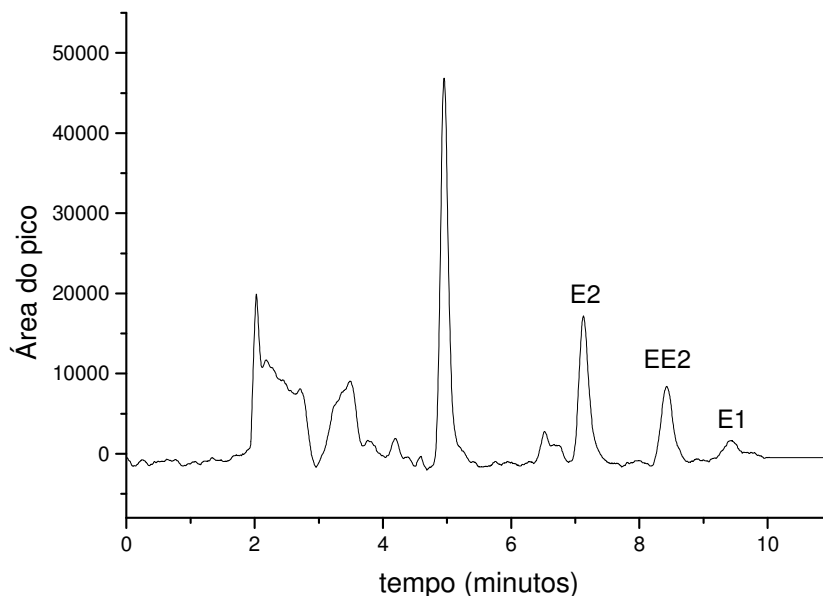


Figura 20: Cromatograma obtido por HPLC-Fluorescência do esgoto sintético fortificado (nível 2), após aplicação do método de extração proposto.

Pode-se observar na Figura 20 que não houve co-eluição dos analitos com possíveis interferentes da amostra testemunha.

4.5.2 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram estabelecidos experimentalmente através da análise de misturas padrão, contendo os hormônios estudados, em concentrações decrescentes. Foram calculados através do programa computacional *Validate 1.0*⁷³, no qual foi necessário entrar com o valor da amplitude do ruído na região do pico cromatográfico do analito de interesse, com o valor da altura do pico cromatográfico do analito de interesse e com a concentração relativa ao pico cromatográfico mencionado no item anterior.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos hormônios fornecidos pelo programa *Validate 1.0* são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os hormônios estudados.

Hormônios	LD (μgL^{-1})	LQ (μgL^{-1})
17 β -estradiol (E2)	4,70	14,1
17 α -etinilestradiol (EE2)	7,50	22,5
Estrona (E1)	40,0	120

Comparando os valores da Tabela 8 com os da Tabela 5, pode-se observar as diferenças dos LDs e LQs dos analitos E2, EE2 e E1. Isso se deve ao fato que os métodos fluorimétricos são intrinsecamente aplicáveis a faixas de concentração mais baixas que as medidas espectrofotométricas baseadas em absorvância. Essa maior sensibilidade vem do fato que o parâmetro relacionado à concentração para a fluorimetria F pode ser medido independentemente da potência da fonte P_0 . Em contraste, uma medida de absorvância necessita da medida de P_0 e P , porque a absorvância depende da razão destas duas quantidades. A sensibilidade do método fluorimétrico pode ser aumentada, intensificando-se P_0 ou amplificando-se posteriormente o sinal de fluorescência. Na espectrofotometria baseada em absorvância, em contraste, um aumento em P_0 resulta em um aumento proporcional em P e, portanto, não afeta a absorvância. Assim, os métodos fluorimétricos, como a fluorescência, geralmente têm sensibilidades de uma a três ordens de grandeza melhores que os métodos correspondentes de absorvância⁷⁴, verifica-se, por exemplo, que o LD do HPLC-Fluorescência para E2 é cerca de 16 vezes menor que para o LD do HPLC-DAD.

Considerando a pré-concentração de 500 vezes dos analitos, uma vez que 250,0mL de amostra de esgoto é submetida a SPE, resultando em 0,5mL de extrato final, permite-se inferir que esta técnica possibilita a análise de amostras com concentrações de 28,2ng L⁻¹ de E2, 45ng L⁻¹ de EE2 e 240ng L⁻¹ de E1, valores mais próximos àqueles encontrados no meio ambiente²⁹⁻³⁴, com exceção do E1 que apresentou LD e LQ ainda altos.

4.5.3 Linearidade

A linearidade do equipamento para os hormônios foi estudada utilizando misturas de calibração, em cinco níveis de concentração próximos aos limites de quantificação dos hormônios.

Na Tabela 9 são apresentados os intervalos de concentração estudados, as equações de regressão linear e o coeficiente de correlação (r^2) dos gráficos de calibração para 17 β -estradiol (E2), 17 α -etinilestradiol (EE2) e estrona (E1).

Tabela 9: Intervalos de concentrações estudados, equações de regressão linear e coeficientes de correlação (r^2) dos gráficos de calibração obtidos para os hormônios estudados. (y = área cromatográfica e x = concentração).

Hormônios	Intervalo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação de regressão linear	Coefficiente de correlação (r^2)
17 β -estradiol (E2)	15 a 60	$y = 7950,8321 x - 15556,71311$	0,9995
17 α -etinilestradiol (EE2)	30 a 70	$y = 8104,825 x - 135164,95$	0,9997
Estrona (E1)	120 a 300	$y = 193,60862 x + 1506,10131$	0,9997

Os gráficos de calibração obtidos para os hormônios foram lineares, apresentado coeficientes de correlação (r^2) superiores a 0,9990, maiores que a recomendação da ANVISA⁵⁹, a qual estima valores superiores a 0,9900 para validação de métodos analíticos. Esses bons coeficientes de correlação demonstram que a resposta do detector de fluorescência foi linear nos intervalos de concentração estudados.

Na Figura 21 está apresentada a curva analítica para o hormônio 17 α -etinilestradiol como exemplo. As demais curvas de calibração se encontram no anexo.

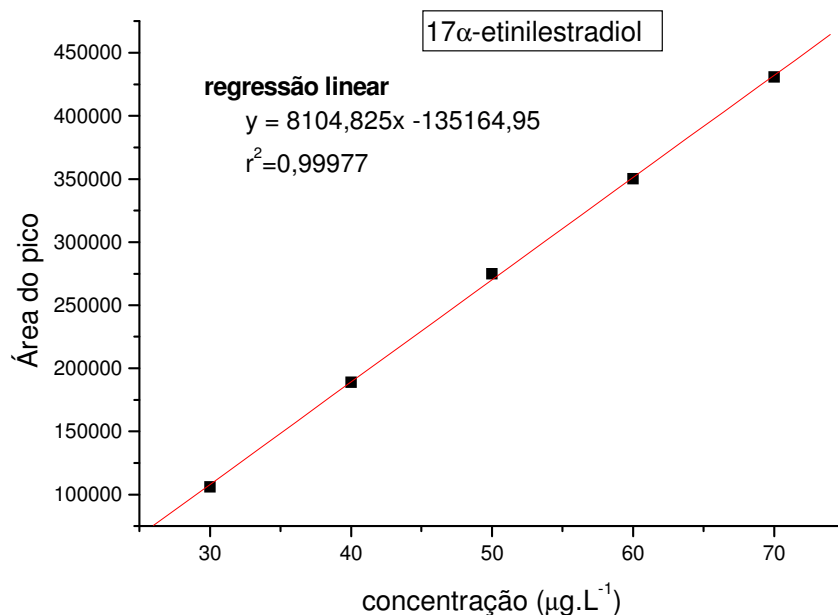


Figura 21: Curva de calibração do 17 α -etinilestradiol no intervalo de concentração de 30 – 70 $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.5.4 Precisão e Exatidão

A exatidão e a precisão do método foram determinadas a partir de ensaios de recuperação com amostras de esgoto sintético em 3 níveis de concentração (0,750; 1,00 e 1,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ para E1; 0,15; 0,20 e 0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ para E2 e 0,20; 0,25 e 0,30 $\mu\text{g L}^{-1}$ EE2). Os níveis de fortificação utilizados neste estudo foram escolhidos de acordo com os limites de quantificação dos analitos.

A Tabela 10 contém as porcentagens de recuperação dos analitos nos três níveis estudados.

Tabela 10: Resultados de percentuais de recuperação e coeficientes de variação para os hormônios, em amostras de esgoto sintético, nos três níveis de fortificação estudados.

Hormônios	Nível de fortificação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação* (%)	CV (%)	$t_{\text{calculado}}$
17 β -estradiol (E2)	0,20	102 (99-103)	1,9	2,28
	0,25	98 (97-103)	1,4	-1,05
	0,30	102 (98-108)	4,5	1,26
17 α -etinilestradiol (EE2)	0,20	99 (96-103)	2,4	-0,42
	0,25	100 (96-101)	1,0	0,21
	0,30	98 (95-100)	1,0	-1,58
Estrona (E1)	0,750	97 (94-101)	4,4	-1,71
	1,00	101 (98-102)	1,8	1,71
	1,25	99 (97-100)	1,6	-0,82

Nota: * é a média aritmética (n=5) entre os valores de recuperação, CV é o coeficiente de variação dos resultados, $t_{95\%}=2,78$.

De acordo com os valores de $t_{\text{calculado}}$, não se pode afirmar que há diferenças significativas entre as recuperações obtidas e o valor esperado (100%), uma vez que todos os valores absolutos de $t_{\text{calculado}}$ são menores que o valor tabelado de t , logo pode se afirmar que o método proposto é exato.

Os intervalos dos coeficientes de variação (1,0-4,5%) apresentados são considerados adequados, visto que não ultrapassam os limites estabelecidos ($\pm 20\%$).

Portanto, os resultados da Tabela 10 demonstram a eficiência do método proposto para a determinação dos hormônios quanto à exatidão (% recuperação e valores de $t_{\text{calculado}}$) e a precisão (coeficiente de variação) para os níveis de fortificação estudados em um mesmo dia, mesmo analista, mesmo método, mesmo instrumento, mesmo local, repetições em um curto intervalo de tempo (repetibilidade).

4.6 Aplicação do método proposto para a determinação de resíduos de hormônios em amostras de afluentes e efluentes da estação de tratamento de esgoto

O método proposto após ser desenvolvido e avaliado pelos dois sistemas, foi utilizado para estimar a qualidade dos efluentes da estação de tratamento de esgoto de Araraquara quanto à presença dos hormônios estudados.

Foram coletadas amostras em dois períodos: inverno (junho e julho) e primavera (novembro). As amostras referentes a junho e julho foram analisadas apenas no equipamento HPLC-DAD, enquanto que as amostras relativas a novembro foram submetidas à análise nos dois equipamentos (HPLC-DAD e HPLC-Fluorescência).

4.6.1 Análises realizadas por HPLC-DAD

De acordo com as análises procedidas, não foram detectados os analitos em nenhuma das amostras examinadas antes e após o tratamento de efluentes domésticos nos períodos citados (inverno e primavera).

Pode-se inferir que as concentrações dos analitos no esgoto bruto e no efluente final se encontram abaixo do limite de detecção do equipamento.

A Figura 23 apresenta os cromatogramas concernentes ao período de novembro das amostras coletadas após o tratamento de efluentes.

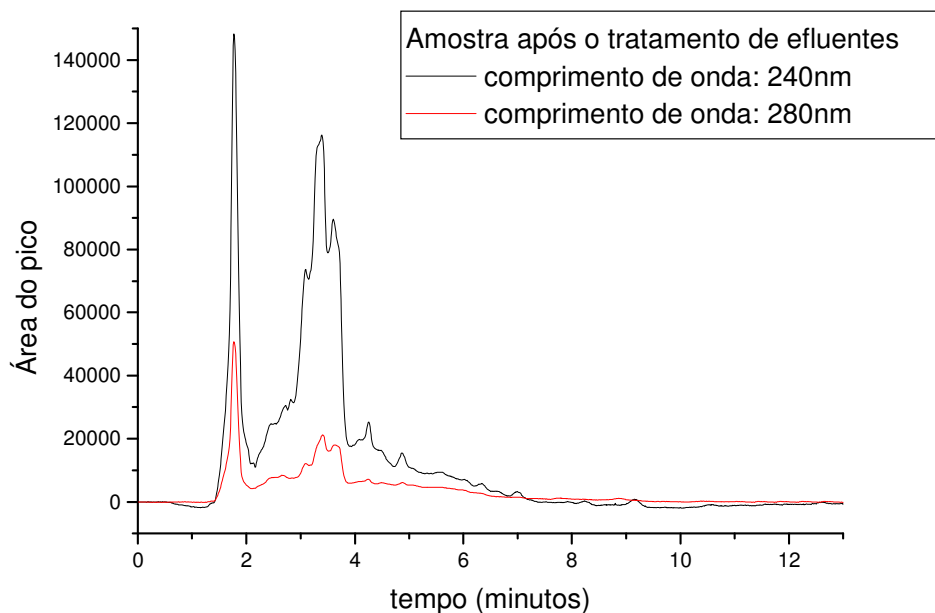


Figura 22: Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD de amostra de efluentes domésticos coletada após o tratamento.

Verifica-se na Figura 22, que não há picos relativos aos analitos alvos, ou seja, estes não foram detectados, possivelmente devido as baixas concentrações dos hormônios nos efluentes.

4.6.2 Análises realizadas por HPLC-Fluorescência

Foram analisadas apenas as amostras referentes a novembro pelo HPLC-Fluorescência, devido à disponibilidade do equipamento somente naquele período.

De acordo com as análises procedidas, foi detectado o hormônio 17β -estradiol (E2) nas amostras coletadas antes do tratamento de efluentes domésticos (esgoto bruto), já nas amostras após o tratamento não foram detectados nenhum dos analitos estudados.

As Figuras 24 e 25 apresentam os cromatogramas das amostras coletadas antes e após o tratamento de esgoto.

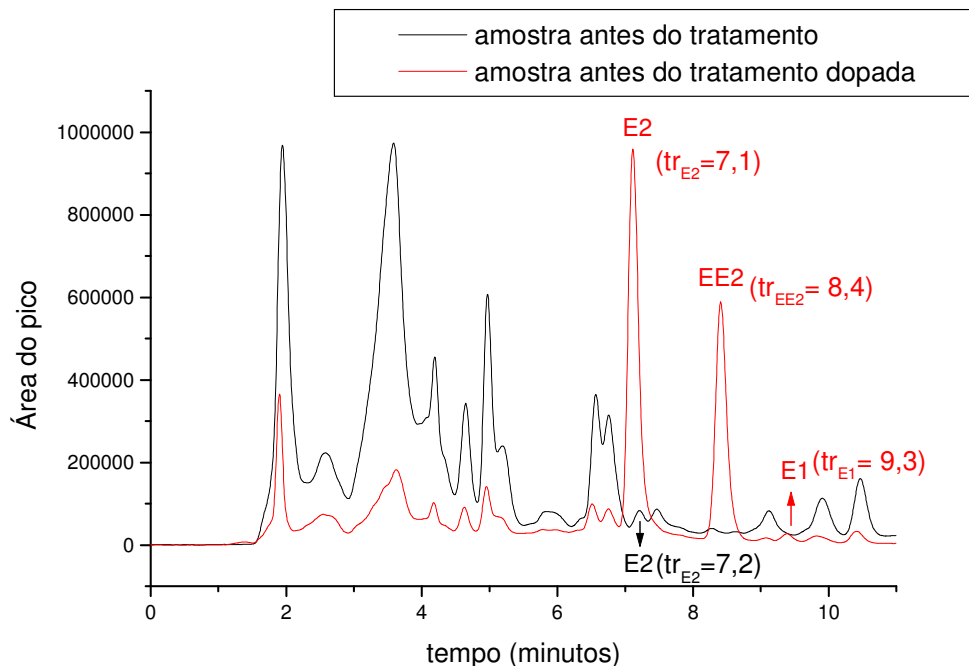


Figura 23: Cromatogramas obtidos por HPLC-Fluorescência de amostra de efluentes domésticos coletada antes do tratamento (esgoto bruto).

De acordo com a Figura 23, apenas o hormônio natural E2 foi detectado nas amostras coletadas de esgoto bruto, os outros analitos não foram encontrados, ou seja, os limites de detecção e quantificação não foram suficientemente baixos para determinar essas substâncias nas amostras de afluentes. Analisando o cromatograma da Figura 23, verifica-se a presença de um pico referente ao hormônio E2 indicado pela flecha preta (linha preta), o tempo de retenção deste analito é muito próximo ao hormônio E2 nas mesmas condições cromatográficas, isto é verificado analisando o cromatograma da amostra dopada com os hormônios estudados (linha vermelha), que se sobrepõem ao cromatograma em preto. A Tabela 11 apresenta os valores das áreas dos picos cromatográficos do hormônio E2 referentes às injeções das amostras coletadas antes do tratamento analisadas pelo HPLC-fluorescência.

Tabela 11: Valores das áreas dos picos cromatográficos do hormônio E2 referentes a três injeções de amostras coletadas antes do tratamento de efluentes domésticos analisado pelo HPLC-Fluorescência.

	Área 1	Área 2	Área 3	Média
Amostra 1	106775	100412	111452	109113,5
Amostra 2	114236	135123	119896	117066
Amostra 3	117789	108096	106456	107276
				108194,75

Nota: valores em negrito foram desconsiderados para o cálculo da Média.

De acordo com a equação da reta para o hormônio E2, $y = 7950,8321 x - 15556,71311$, a concentração (x) obtida é $15,56459262 \mu\text{g L}^{-1}$ em 0,5mL de solução, como foi percolado um volume de 250,0mL, a concentração do hormônio em amostras coletadas antes do tratamento de efluentes da estação de tratamento de esgotos de Araraquara é $31,13 \text{ng L}^{-1}$.

A Figura 24 apresenta o cromatograma obtido pela análise das amostras coletadas nos efluentes da estação de tratamento de esgoto (após o tratamento).

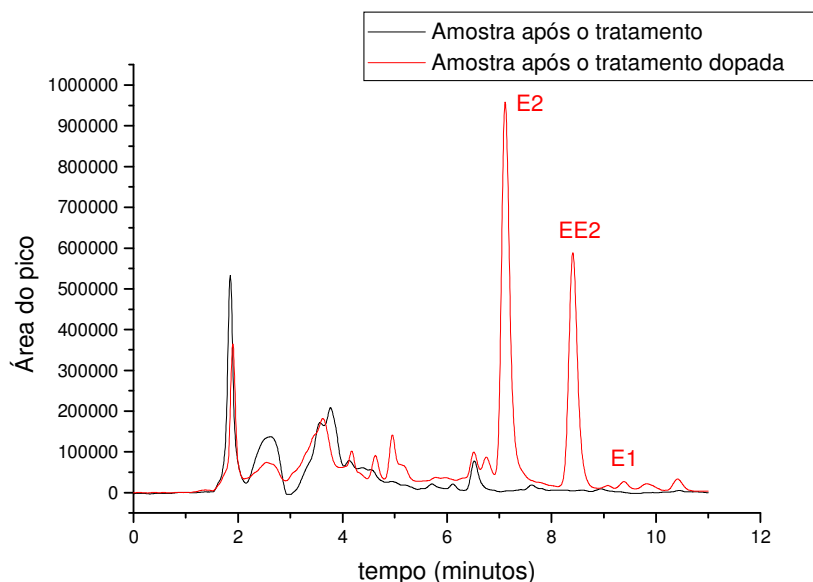


Figura 24: Cromatogramas obtidos por HPLC-Fluorescência de amostra de efluentes domésticos coletada após o tratamento de efluentes.

Como se pode observar pelo cromatograma da Figura 24, não foram detectados picos dos hormônios nas amostras de efluentes de esgoto coletadas após o tratamento destes.

Em trabalhos recentes, esteróides estrogênicos têm sido detectados em afluentes e efluentes de estações de tratamento de esgoto em vários países. Na Itália, a média de concentrações de estrogênios (E2, E1 e EE2) em afluentes de seis ETEs que operam com o sistema de lodo ativado foram 12, 52 e 3ng L⁻¹, respectivamente³². Os hormônios E2, E1 e EE2 também foram detectados em afluentes de três ETEs holandesas com concentrações de até 48ng L⁻¹ de E2, 140ng L⁻¹ de E1 e 8,8 ng L⁻¹ de EE2³¹. No Japão, Isobe *et al*⁵⁷ determinaram a presença do hormônio natural E1 no Rio Tamagawa (Tóquio) com concentração de 34ng L⁻¹ e no lago Kasumigaura (Ibaraki) com concentração de 0,7ng L⁻¹. Em ETEs britânicas, as concentrações em afluentes de E1 variam de 1,4 a 76ng L⁻¹, e para E2 variam de 3,2 a 55ng L⁻¹²³. Em seu trabalho, Ternes *et al*⁷⁶ detectaram a presença dos hormônios E1, E2 e EE2 em afluentes de ETEs canadenses, alemãs e brasileiras. No Canadá, os hormônios E1 e E2 foram determinados em afluentes com concentrações máximas de 48 e 64ng L⁻¹, respectivamente, e o hormônio sintético EE2 foi detectado em 9 das 10 amostras de efluentes, com concentração máxima de 42ng L⁻¹. No Brasil, os hormônios E1, E2 e EE2 foram encontrados no esgoto bruto da ETE-Rio de Janeiro com concentrações médias de 21, 40 e 6ng L⁻¹, respectivamente. Na Alemanha, as concentrações foram 15ng L⁻¹ para E2 e 27ng L⁻¹ para E1 em amostras de esgoto bruto.

De acordo com trabalhos realizados em outros países, a concentração do hormônio E2 (31ng L⁻¹) em afluentes da ETE-Araraquara, está coerente com os dados da literatura.

Em relação às amostras coletadas após o tratamento de esgotos, não foram encontrados os hormônios estudados. Há vários trabalhos descritos na literatura sobre diversos tipos de ETEs que operam com diferentes sistemas de tratamento de esgoto. A remoção dos estrogênios da água durante o tratamento de esgoto é devido aos processos de biodegradação e adsorção nos lodos, e isso depende do desempenho da estação. Comparando as concentrações de estrogênios em afluentes e efluentes, Baronti *et al*.³² verificaram em ETEs que operam com sistema de lodo ativado na Itália, que as porcentagens de remoção dos hormônios foram 87, 85 e 61% de E2, EE2 e E1, respectivamente.

Na ETE brasileira que opera com o sistema de tanque de aeração e filtro biológico, Ternes *et al.*⁷⁶ observaram a remoção de 64 a 78% de EE2, de 67 a 83% de E1 e de 92 a 99% de E2. Na estação alemã que opera com tanque de aeração com adição de cloreto de ferro (II), a remoção foi mais baixa para E2, apenas 64%.

Servo *et al.*⁷⁷, em seu trabalho comparam a eficiência da remoção dos hormônios E2 e E1 em 4 categorias de ETEs, as quais são: tratamentos primários, secundários, terciários e de lagoas. As porcentagens de remoção de E2 e E1 nas estações que possuem tratamento secundário variam de 39 a 97% para E2 e -62 a 95% para E1, o sinal negativo indica que no efluente final a concentração de E1 foi maior que no afluente (esgoto bruto). Nas estações terciárias, as remoções variaram de 83 a 99% para E2 e 67 a 98% para E1. Nas estações que utilizaram tratamento em lagoas, as remoções variaram de 80 a 98% para E2, enquanto que para E1 as remoções variaram de 46 a 96%. As estações primárias não demonstraram eficiência na remoção desses contaminantes, verificando-se em alguns casos o aumento na concentração dos hormônios no efluente final.

Os resultados obtidos das amostras coletadas após o tratamento são concordantes com os dados apresentados, ou seja, segundo a literatura as remoções dos hormônios das águas residuárias podem ser de até 98% para E1, 99% para E2 e 85% para EE2, logo se esperaria que as concentrações dos hormônios no efluente final da estação estivessem abaixo dos LD e LQ da técnica, o que se pode verificar com E2, cuja concentração foi menor (abaixo dos LD e LQ) que no esgoto bruto.

Em relação aos períodos em que as amostras foram coletadas, junho e julho (inverno) e novembro (primavera), não se pôde estabelecer comparações com as porcentagens de remoção dos hormônios, uma vez que em ambos os períodos não foram detectados os analitos de interesse pela técnica cromatográfica com detecção ultravioleta (HPLC-DAD), e como somente as amostras referentes à primavera foram analisadas pelo HPLC-Fluorescência, as quais indicaram a presença do hormônio E2, não se puderam prover possíveis variações do desempenho do tratamento de esgoto durante as mudanças climáticas. Porém, conforme relatado por Ternes *et al.*⁷⁶, houve diferenças entre as remoções de hormônios de ETEs do Brasil e da Alemanha, as quais operam com os mesmos sistemas de lodo ativado, e se atribui esta diferença a temperatura do ambiente. Na Alemanha durante o período de amostragem a média de temperatura era -2°C, enquanto que no Brasil era 20 °C. Logo, esta disparidade na remoção é devido ao fato que a eficiência de uma ETE para a eliminação de

contaminantes é influenciada por vários parâmetros, tal como atividades microbianas, que pareceu ser mais expressiva no clima tropical, o que pode ter contribuído para a eficácia da ETE do Brasil na eliminação dos hormônios. Entretanto, as temperaturas ambientes em que foram realizadas as amostragens neste estudo não diferiram de 5 °C, podendo-se pressupor que este parâmetro não alteraria a execução de trabalho da ETE-Araraquara.

5. Conclusões

Após estudos sistemáticos com o objetivo de proporcionar a melhor separação e recuperação multresíduos, as condições instrumentais e experimentais foram definidas.

A separação dos hormônios 17β -estradiol, estrona, 17α -etinilestradiol e levonorgestrel foi desempenhada em um tempo relativamente curto, cerca de 13 minutos. Uma metodologia simples foi adaptada e otimizada para a determinação dos analitos em matrizes de efluentes domésticos. O procedimento proposto foi avaliado nos dois sistemas utilizados (HPLC-DAD e HPLC-Fluorescência) quanto à: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e precisão. O método mostrou-se seletivo, linear, exato e preciso nas condições estabelecidas. Os LD e LQ do HPLC-DAD não se apresentaram satisfatórios para os hormônios E1, E2 e EE2, já os LD e LQ do HPLC-Fluorescência mostraram-se adequados.

A aplicação do método às amostras coletadas na estação de tratamento de efluentes domésticos de Araraquara possibilitou a identificação e quantificação do hormônio natural E2 em amostras obtidas antes do tratamento de esgoto. Não foram detectadas concentrações dos analitos em amostras obtidas imediatamente após o tratamento.

Portanto, de acordo com os resultados apresentados, não se pode concluir o quanto o tratamento da ETE-Araraquara é eficiente para a remoção dos hormônios estudados, uma vez que as concentrações dos hormônios no efluente final da estação podem estar abaixo dos LD e LQ da técnica, mesmo após extensiva concentração das amostras. Para se obter limites de detecção e quantificação mais baixos, deve-se utilizar detectores mais sensíveis, tal como espectrômetro de massas.

6. Referências Bibliográficas

1. REYS, L. L. Tóxicos Ambientais: Desreguladores do Sistema Endócrino. **RFML**, série III, v.6, n.4, p.213-225, 2001.
2. CASTRO, C. M. B. Perturbadores endócrinos ambientais: uma questão a ser discutida. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.7, n.1, p.4-5, 2002.
3. MEYER, A.; SARCINELLI, P. N.; MOREIRA, J. C. Estarão alguns grupos populacionais brasileiros sujeitos à ação de disruptores endócrinos? **Caderno de Saúde Pública**, v.15, n.4, p.845-850, 1999.
4. MC MURRY, C. S.; DIKERSON, R. L. Effects of binary mixtures of six xenobiotics on hormone concentrations and morphometric endpoints of northern bobwhite quail (*Colinus virginianus*). **Chemosphere**, v.43, p.829-837, 2001.
5. NOGUEIRA, J. M. F. Desreguladores endócrinos: efeitos adversos e estratégias para monitorização dos sistemas aquáticos. **Química**, v.88, p.65-71, 2003.
6. SIMMONDS, R.J. **Chemistry of biomolecules: an introduction**, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1992.
7. SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Química Orgânica**. 7.ed. Rio de Janeiro: LCT, 2000. 474p.
8. GRAY, T.P.R.; JOBLING, S.; MORRIS, S.; KELLY, C.; KIRBY, S.; JANBAKSH, A.; HARRIES, J.E.; WALDOCK, M.J.; SUMPTER, J.P.; TYLER, C.R.; **Environmental Science & Technology**, v.34, p.1521 - 1528, 2000.
9. BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622p.
10. SERRANO, N. O.; CABRERA, M. F. F.; ENCINAS, R. P.; SERRANO, O. F. Endocrine disruption chemicals: harmful substances and how to test them. **Caderno de Saúde Pública**, v.18, n.2, p.489-494, 2002.
11. CRAIN, D. A.; ROONEY, A. A.; ORLANDO, E. F.; GUILLETTE, L. Jr. Endocrine disrupting contaminants and hormone dynamics: lessons from wildlife. In: GUILLETTE, L. Jr., CRAIN, D. A. (Eds.) **Environmental endocrine disruptors: an evolutionary perspective**. New York: Taylor & Francis, 2000. p.1-21.
12. BIBBO, M.; HAENSZEL, W. M.; WIED, G. L.; HUBBY, M.; HERBST, A. L. A twenty-five-year follow-up study of women exposed to diethylstilbestrol during pregnancy. **New England Journal of Medicine**, v.298, p.763-767, 1978.
13. EERTMANS, F., DHOOGHE, W., STUYVAERT, S. Endocrine Disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment. **Toxicology in Vitro**, v.17, p.515-524, 2003.

14. McLACHLAN, J. A.; NEWBOLD, R. R.; BUROW, M. E.; LI, S. F. From malformations to molecular mechanisms in the male: three decades of research on endocrine disrupters. **APMIS**, v.109, p.263-272, 2001.
15. BHATT, R.V. Environmental influence on reproductive health. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v.70, p.69-75, 2000.
16. FOSTER, W. G.; NEAL M. S.; YOUNGLAI, E. V. Endocrine disrupters and ovarian function. **International Congress Series**, v.1266, p.126–132, 2004.
17. AOU, S.; INOUE, T.; FUJIMOTO, T.; MIZUNO M.; OOMURA, Y.; KUBO, K.; ARAI, O. Chemical impacts on higher brain functions. **International Congress Series**, v.1269, p.101– 104, 2004.
18. MATTHIESSEN, P.; ALLEN, Y.; BAMBER, S.; CRAFT, J.; HURST, M.; HUTCHINSON, T.; FEIST, S.; KATSIADAKI, I.; KIRBY, M.; ROBINSON, C.; SCOTT, S.; THAIN, J.; THOMAS, K. The impact of oestrogenic and androgenic contamination on marine organisms in the United Kingdom-summary of the EDMAR programme. Endocrine disruption in the marine environment. **Marine Environmental Research**, v.54, p.645-649, 2002.
19. JOBLING, S.; NOLAN, M.; TYLER, C. R.; BRIGHTY, G.; SUMPTER, J. P. Widespread sexual disruption in wild fish. **Environmental Science & Technology**, v.32, p.2498 –2506, 1998.
20. PREZIOSI, P. Endocrine disrupters as environmental signallers: an introduction. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, v.70, p.1617 –1631, 1998.
21. PURDOM, C. E.; HARDIMAN, P. A.; BYE, V. J.; ENO, N. C.; TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. **Chemistry and Ecology**, v.8, p.275 –285, 1994.
22. ROUTLEDGE, E. J.; SHEAHAN, D.; DESBROW, C.; SUMPTER, J. P.; WALDOCK, M. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. **Environmental Science & Technology**, v.32, p.1559 – 1565, 1998.
23. DESBROW, C.; ROUTLEDGE, E. J.; BRIGHTY, G. C.; SUMPTER, J. P.; WALDOCK, M. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. Chemical fractionation and in vitro biological screening. **Environmental Science & Technology**, v.32, p.1549 –1558, 1998.
24. GILMAN, A., G.; HARDMAN, J. E.; LIMBIRD, L. E. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 2003. 8153p.
25. YING, G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. **Environment International**, v.28, p.545-551, 2002.

26. LAI, K. M.; JOHNSON, K. L.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. **Environmental Science & Technology**, v.34, p.3890-3894, 2000.
27. ERICKSON, B. E. Analysing the ignored environmental contaminants. **Environmental Science & Tecnology**, v.36, p.140-145, 2002.
28. SHORE, L. S.; GUREVITZ, M.; SHEMESH, M. Estrogen as an environmental pollutant. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.51, p.361 – 366, 1993.
29. TERNES, T. A.; KRECHEL, P.; MUELLER, J. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – II. Aerobic batch experiments with activated sludge. **The Science of the Total Environment**, v.225, p.91-99, 1999.
30. BELFROID, A. C.; VAN DER HORST, A.; VETHAAK, A. D.; SCHAFFER, A. J.; WEGENER, J.; COFINO, W. P. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and wastewater in Netherlands. **Science of the Total Environment**. v.225, p.101 –108, 1999.
31. JOHNSON, A. C.; BELFROID, A.; DI CORCIA, A. Estimating steroid estrogen input into activated sludge treatment works and observation on their removal from the effluent. **Science of the Total Environment**, v.256, p.163-173, 2000.
32. BARONTI, C.; CURINI, R.; D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; GENTILI, A.; SAMPERI, R. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in receiving river water. **Environmental Science & Technology**, v.24, p. 5059 –5066, 2000.
33. TYLER, C. R.; ROUTLEDGE, E. J. Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. **Pure and Applied Chemistry**, v.70, p.1795 –1804, 1998.
34. ALLEN, Y.; MATTHIESEN, P.; SCOTT, A. P.; HAWORTH, S.; FEIST, S.; THAIN, J. E. The extent of estrogenic contamination in the UK estuarine and marine environments—further survey of flounder. **Science of the Total Environment**, v.233, p.5 –10, 1999.
35. SOLÈ, M.; PORTE, C.; BARCELÓ, D. Analysis of the estrogenic activity of sewage treatment works and receiving waters using vitellogenin induction in fish as a biomarker. **Trends in Analytical Chemistry**, v.20, p.1-8, 2001.
36. DRAY, J.; DRAY, F.; TILLER, F.; ULMAN, A. Hydrolysis of urine metabolites of different steroid hormones by (-glucuronidase from *Escherichia coli*). **Annales de l'Institute Pasteur**, v.123, p.853 –857, 1972.
37. GOMES, R. L.; AVCIOGLU, E.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. Steroid estrogen determination in sediment and sewage sludge: a critique of sample preparation and chromatographic/mass spectrometry considerations, incorporating a case in method development. **Trends in Analytical Chemistry**, v.23, n.10-11, p.737-743, 2004.

38. LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A. Endocrine disruptors in the environment. **IUPAC Technical Report**, v. 75, n. 5, p. 631–681, 2003.
39. BARCELÓ, D.; ALDA, M. J. L. 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.
40. BARCELÓ, D. M.; ALDA L. J.; DÍAZ-CRUZ, S. 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.
41. LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: Rima, 2004. 96p.
42. CHRISTIAN, G.D. **Analytical chemistry**, New York: Wiley, 1994. 812p.
43. INGRAND, V.; HERRY, G.; BEAUSSE, J.; ROUBIN, M. Analysis of steroid hormones in effluents of wastewater treatment plants by chromatography – tandem mass spectrometry. **Journal Chromatography A**, v.1020, p.99-104, 2003.
44. GOMES, L. R.; SCRIMSHAW, D. M.; LESTER, J.N. Determination of endocrine disrupters in sewage treatment and receiving waters. **Trends in Analytical Chemistry**, v.22, n.10, p.697-707, 2003.
45. SHIMADA, K.; TANAKA, T.; NAMBARA, T. Studies on steroids CLXV. Determination of isomeric catechol estrogens in pregnancy urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 223, p.33-39, 1981.
46. REID, J.J.; STITZEL, R.E.; HEAD, R.J. HPLC procedure for the measurement of o-methylation of catechol estrogens by vascular tissue. **Journal of Pharmacology Methods**, v.14, p.25-39, 1985.
47. SHIMADA, K.; NAGASHIMA, E.; ORI, I.; NAMBARA, T. New derivatization method using ferrocene reagents for the determination of steroid glucuronides by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal Pharmaceutical and Biochemical Analysis**, v.5, p.361-368, 1987.
48. FERNÁNDEZ, N.J.J.; GARCÍA, M.J.; DIEZ, M.T. Rapid high-performance liquid chromatography assay of ethinyloestradiol in rabbit plasma. **Journal of Chromatography: Biomedical Applications**, v.619, p.143-147, 1993.
49. GIESE, R.W. Measurement of endogenous estrogens: analytical challenges and recent advances. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 401-412, 2003.
50. NOVAKOVI, J.; TVRZICKÁ, E.; PACÁKOVÁ, V. High performance liquid chromatography determination of equine estrogens with ultraviolet absorbance and electrochemical detection. **Journal of Chromatography A**, v.678, p.359-363, 1994.

51. GATTI, R.; GOTTI, R.; GIOIA, M.G.; CAVRINI, V. HPLC analysis of pharmaceutical estrogens in raw materials and dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.17, p.337-347, 1998.
52. GATTI, R.; GIOIA, M.G.; DI PIETRA, A.M.; CAVRINI, V. HPLC- fluorescence determination of unconjugated estrogens in pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.18, 187-192, 1998.
53. MATSUMOTO, K.; TSUKAHARA, Y.; UEMURA, T.; TSUNODA, K.; KUME, H.; KAWASAKI, S.; TADANO, J.; MATSUYA, T. Highly sensitive time-resolved fluorometric determination of estrogens by high-performance liquid chromatography using a β -diketone europium chelate. **Journal of Chromatography B**, v.773, p.135-142, 2002.
54. BOER, T.; OTJENS, D.; MUNTENDAMB, A.; MEULMANB, E.; VAN OOSTIJEN, M.; ENSING, K. Development and validation of fluorescent receptor assays based on the human recombinant estrogens receptor subtypes alpha and beta. **Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis**, v.34, n.3, p.671-679, 2004.
55. MAO, L.; SUN, C.; ZHANG, H.; LI, Y.; WU, D. Determination of environmental estrogens in human urine by high performance liquid chromatography after fluorescent derivatization with p-nitrobenzoyl chloride. **Analytica Chimica Acta**, v.522, p.241-246, 2004.
56. BARCELÓ, D.; ALDA, M. J. L. Use of solid-phase in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water. **Journal of Chromatography A**, v. 938, p.145-153, 2001.
57. ISOBE, T.; SHIRAIISHI, H.; YASUBA, M.; SHINOBA, A. Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.984, p.195-202, 2003.
58. LÀGANA, A.; BACALONI, A.; LEVA, I.; FABERI, A.; FAGO, G.; MARINO A. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v.501, p.79-88, 2004.
59. RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n.5, p.771-780, 2004.
60. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA-ANVISA. Resolução RE nº 899, de 29/05/2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 31 out. 2004.
61. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL-INMETRO. DOQ-CGCRE-008, 2003. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br>> . Acesso em 31 out. 2004.

62. FREITAS, S. S. **Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação multiresíduo de pesticidas em frutas brasileiras.** Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2005.
63. ASSOCIATION OF ANALYTICAL COMMUNITIES (AOAC/FAO/IAEA/IUPAC). **Guidelines for single-laboratory validation of analytical methods for trace-level concentration of organic chemicals.** Expert Consultation, 1999. Disponível em: <http://www.eudra.org/emea.html>. Acesso em 30 out. 2004.
64. THOMPSON, M.; ELLISON, S.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **IUPAC**, v. 74, p. 835-855, 2002.
65. BRITO, N. M.; AMARANTE, O. P. Jr.; POLESE, L.; SANTOS, T. C. R.; CALDAS, E. P. A.; VALE, M. L. B. F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Caderno de Pesquisa**, v. 12, n.1/2, p.116-131, 2001.
66. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Validation of analytical procedures: methodology.** London, 1996. Q2B (CPMP/ICH/281/95). Disponível em: <<http://www.eudra.org/emea.html>>. Acesso em 28 out. 2004.
67. BRITO, N. M.; AMARANTE, O. P. Jr.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L.; SANTOS, T. C. R. Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.12, p.155-1168, 2002.
68. LOURENCETTI, C. **Resíduos pesticidas organoclorados e bifenilas policloradas em composto de resíduos sólidos urbanos: metodologia e aplicação.** Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2004.
69. BRITO, N. M.; AMARANTE, O. P. Jr.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.13, p.129-146, 2003.
70. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em 31 out. 2005.
71. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA), Resolução 20/86.
72. TORRES, P. **Desempenho de um reator anaeróbico de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgotos sanitário.** Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1992.
73. LANÇAS, F. L. **Validação de métodos cromatográficos de análise.** São Carlos: Rima, 2004, 46p.
74. SKOOG, A. D.; HOLLER, J. F; NIEMAN, A. T. **Princípios de análise instrumental.** 5.ed. Porto Alegre: Bookman. 1998, 628p.

75. PAVIA, L. D.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, S. G. **Introduction to spectroscopy**. 3. ed. Brooks/Cole. 2001, 579p.

76. TERNES, T. A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R. D.; SERVOS, M. 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.

77. SERVOS, M. R.; BENNIE, D. T.; BURNISON B. K.; JORKOVIC, A.; MCINNIS, R.; NEHELI, T.; SCHNELL, A.; SETO, P.; SMYTH, S. A.; TERNES, T. A. **Science of the Total Environment**, v.336, p.155-170, 2005.

APÊNDICES

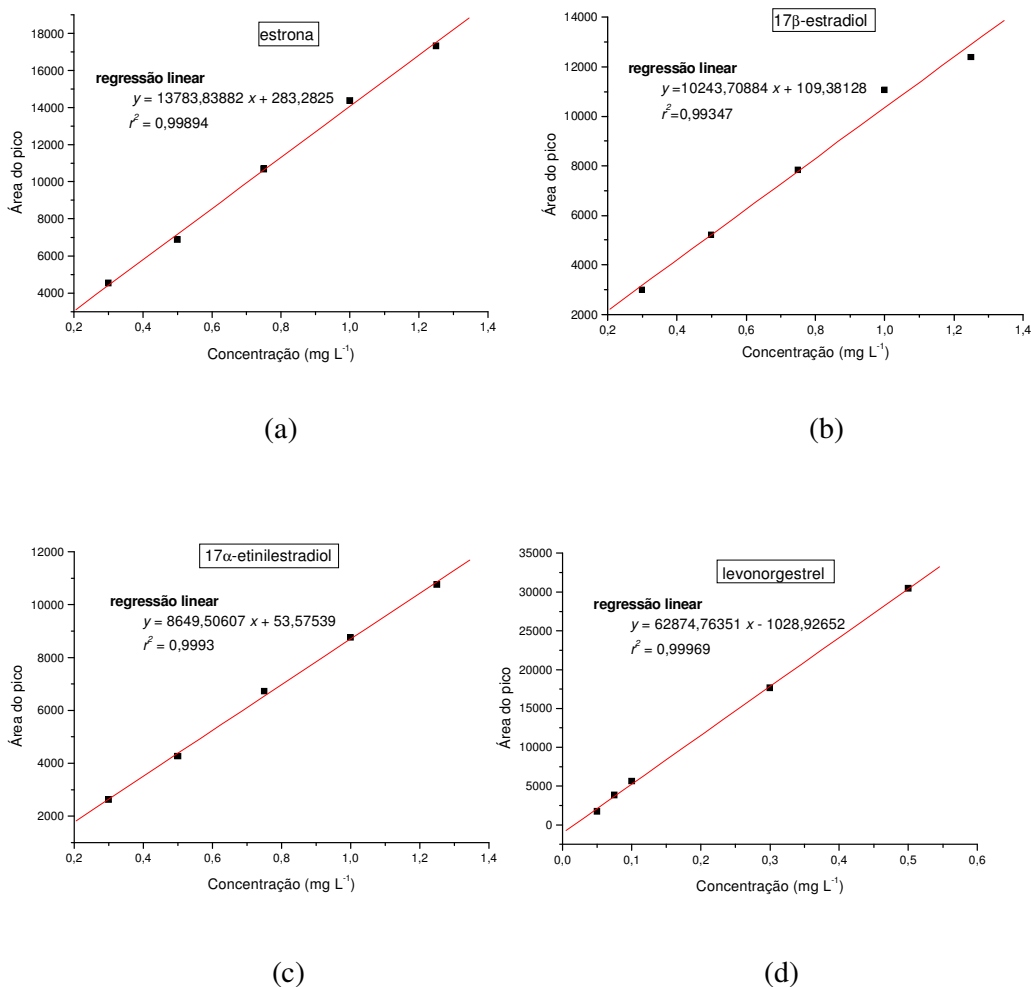
A.I) Curvas analíticas dos hormônios 17β -estradiol, estrona, 17α -etinilestradiol e levonorgestrel analisados por HPLC-DAD

Figura 25: Curva analítica (HPLC-DAD) dos hormônios: (a) estrona, (b) 17β -estradiol, (c) 17α -etinilestradiol e (d) levonorgestrel.

A.II) Curvas analíticas dos hormônios 17β -estradiol, estrona, 17α -etinilestradiol e levonorgestrel analisados por HPLC-Fluorescência

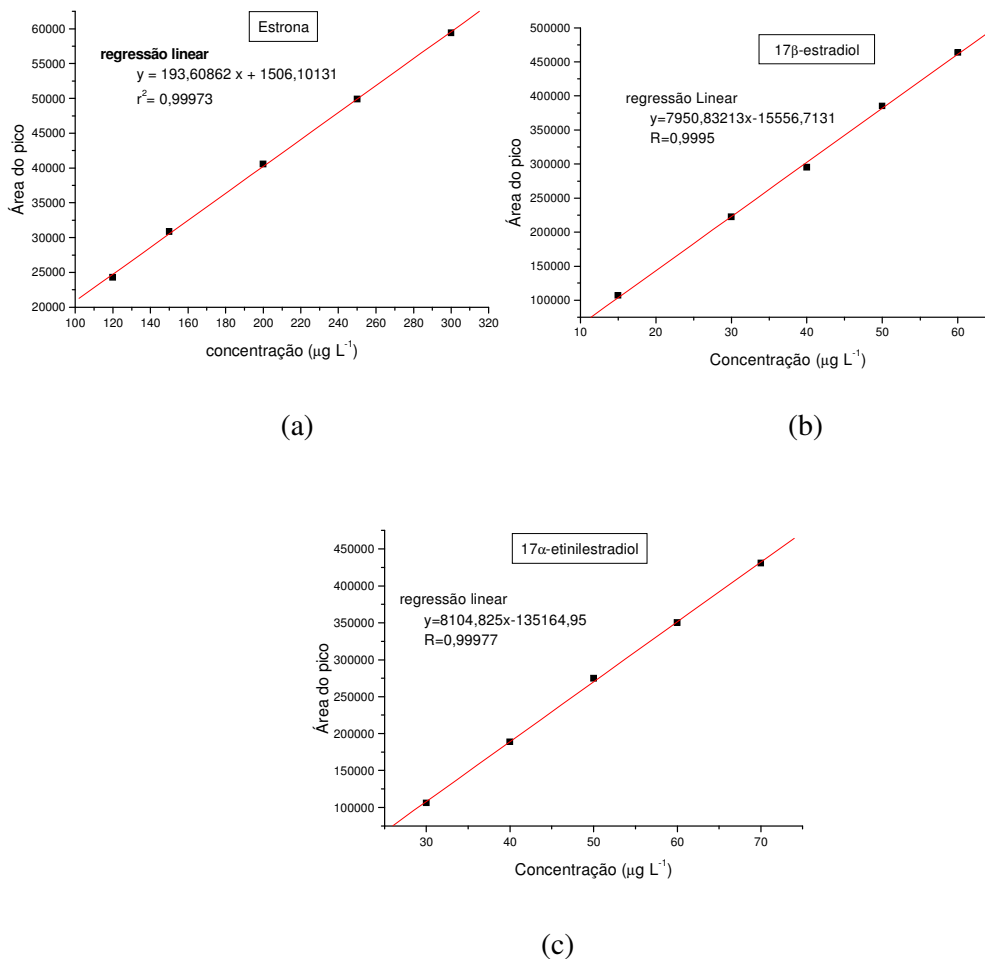


Figura 26: Curva analítica (HPLC-Fluorescência) dos hormônios: (a) estrona, (b) 17β -estradiol e (c) 17α -etinilestradiol.

B.I) Espectros de absorção na região do ultravioleta/visível dos hormônios 17 β -estradiol, estrona, 17 α -etinilestradiol e levonorgestrel analisados por HPLC-DAD

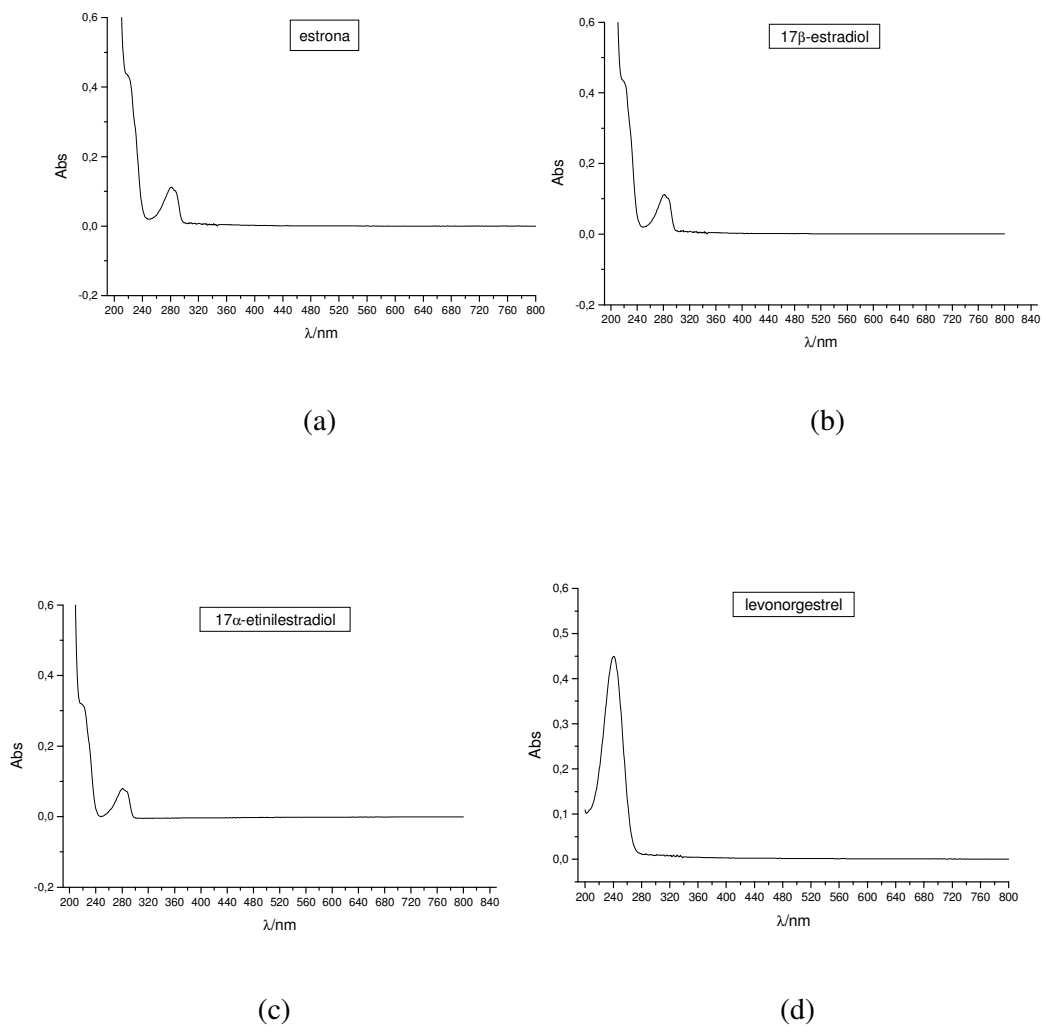


Figura 27: Espectro no UV/Vis dos hormônios: (a) estrona, (b) 17 β - estradiol, (c) 17 α -etinilestradiol e (d) 17 α -etinilestradiol.

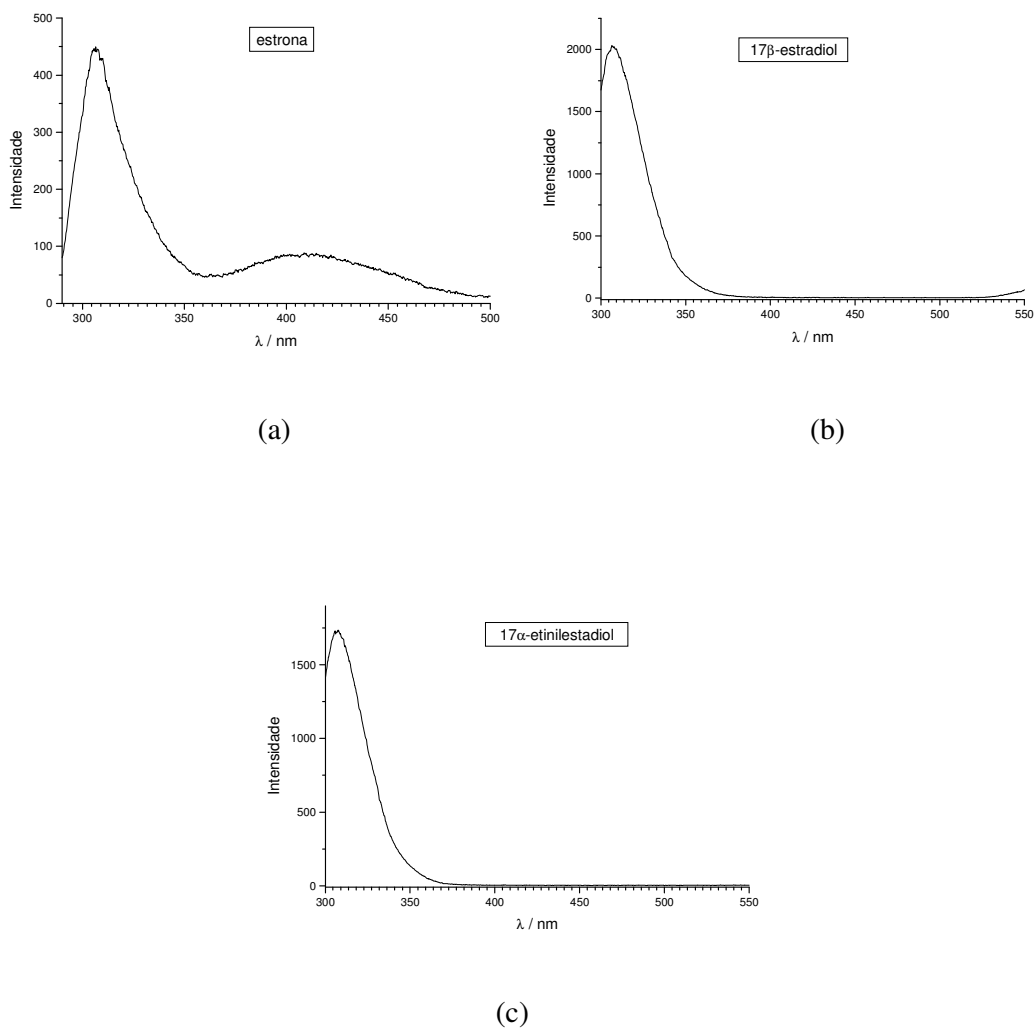
B.II) Espectros de emissão dos hormônios 17β -estradiol, estrona, 17α -etinilestradiol e levonorgestrel analisados por HPLC-Fluorescência

Figura 28: Espectro de emissão dos hormônios : (a) estrona, (b) 17β -estradiol e (c) 17α -etinilestradiol.