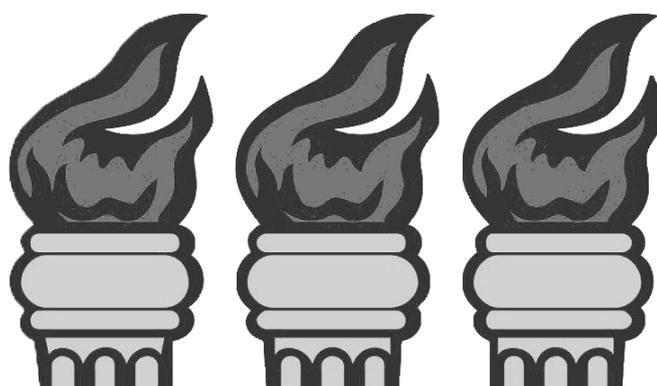




UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



TESE DE DOUTORADO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS
SPE/HPLC PARA A DETERMINAÇÃO DE ESTRÓGENOS E
FITOESTRÓGENOS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS**

Edilene Dantas Teles Moreira

SAPIENTIA AEDIFICAT

João Pessoa – PB – Brasil

Julho - 2015

Edilene Dantas Teles Moreira*

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS
SPE/HPLC PARA A DETERMINAÇÃO DE ESTRÓGENOS E
FITOESTRÓGENOS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química, área de concentração Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo

* Bolsista CNPq

João Pessoa – PB – Brasil

Julho - 2015

M838d Moreira, Edilene Dantas Teles.

Desenvolvimento e validação de metodologias SPE/HPLC para a determinação de estrógenos e fitoestrógenos em águas superficiais / Edilene Dantas Teles Moreira.- João Pessoa, 2015.

110f. : il.

Orientador: Mário César Ugulino de Araújo

Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN

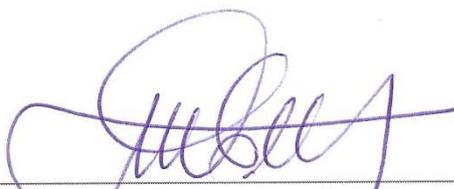
1. Química analítica. 2. Interferentes endócrinos.
3. Cromatografia. 4. Rio Cuiá - amostra de água - análise.
5. Fluorescência. 6. Arranjo de diodos.

UFPB/BC

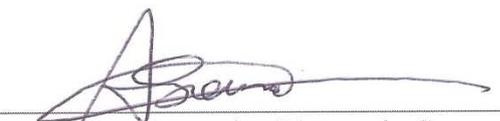
CDU: 543(043)

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS SPE/HPLC PARA A DETERMINAÇÃO DE ESTRÓGENOS E FITOESTRÓGENOS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS

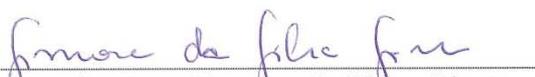
Tese de Doutorado apresentada pela aluna Edilene Dantas Teles
Moreira e aprovada pela banca examinadora em 01 de julho de
2015.



Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo
Orientador/Presidente



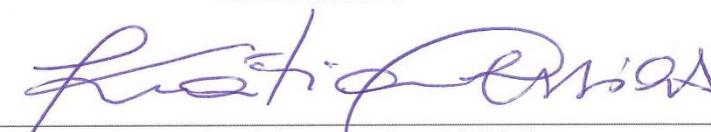
Prof. Dr. Antonio Cícero de Souza
Examinador



Profa. Dra. Simone da Silva Simões
Examinadora



Profa. Dra. Ilda Antonieta Salata Toscano
Examinadora



Profa. Dra. Kátia Messias Bichinho
Examinadora

DEDICATÓRIA

A DEUS PAI!!!
é dele a vitória alcançada em minha vida.

Ao meu amigo e esposo, pablo n. T. Moreira, por me “aguentar” nos meus momentos de *stress* e por me incentivar sempre, mostrando que com paciência e perseverança sempre podemos realizar nossos sonhos. Agradeço pelo seu amor, fidelidade, sinceridade e respeito. Meu amor, eu te amo.

À minha filha, ana júlia d. Moreira, presente de deus, meu tesouro, minha joia rara... Que, também, mesmo sem entender, aguentou os meus momentos de *stress* na etapa final do trabalho, sempre me amando e me mostrando que o que vale nesta vida é ser feliz e mais nada. Filha, eu te amo.

Ao meu pequenininho pedro amorel, uma sementinha que crescia dentro de mim quando eu finalizava este trabalho, e que hoje está conosco em nossas vidas. Um verdadeiro presente de deus que nos enche de alegria. Filho, eu te amo.

Enfim, a DEUS e à minha família, com muito amor e gratidão,
Eu dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Regina Lúcia e Edivaldo Dantas, pelo amor e pela educação que me deram ao longo de todo o meu crescimento, permitindo a realização de mais esta vitória. Por todo o exemplo de vida que eles são para mim.

Aos meus irmãos, Márcio, Alessandro e Michele, pela família que somos.

A todos os meus sobrinhos e sobrinhas, pela alegria da vida.

A todos os meus cunhados e cunhadas, em especial à minha cunhada e comadre Iana, pela amizade.

À minha sogra Maria Salete (*in memoriam*) pelas palavras sempre positivas e pelos momentos de lazer e descontração proporcionados.

Ao Prof. Dr. Mário Ugulino pela oportunidade de trabalho, orientação, apoio, confiança e amizade.

Aos membros da banca de qualificação, Prof^ª Dr^ª. Ilda Toscano e Prof^ª Dr^ª. Kátia Bichinho, pelas contribuições para a finalização deste trabalho.

Ao colega Anderson, pelo apoio e dedicação cedida ao trabalho.

Aos amigos Adriano e Licarion, pela amizade além do laboratório e pela ajuda mais do que imprescindível para a finalização do trabalho.

Aos amigos Paulo Henrique e Wellington Lira por todo apoio.

Aos vários colegas do LAQA que passaram pelo laboratório, ao longo dos 12 anos que estive lá, pela convivência e troca de idéias.

Aos alunos do IFPB, André, Jeremias, Mariana e Thaís pela ajuda em dias de coleta e análise.

Ao CNPq pelo fornecimento da bolsa.

Ao INCTAA, pela iniciativa do projeto e pela oportunidade.

Muito Obrigada!

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidas e validadas duas metodologias analíticas, utilizando extração em fase sólida e cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês: *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC), para identificação e quantificação de interferentes endócrinos em águas superficiais. Uma metodologia foi utilizada para analisar quatro estrógenos: 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, estrona e estriol, e a outra metodologia usada para analisar seis fitoestrógenos: biochanin A, genistina, genisteína, daidizina, daidizeína e formononetina. Na etapa de preparo das amostras foi desenvolvido um método de extração empregando extração em fase sólida (SPE). Os cartuchos utilizados foram eficazes na extração dos analitos, tanto dos estrógenos como dos fitoestrógenos, utilizando 1.000 mL de amostra de rio, sendo atingido um fator de pré-concentração de 2.857 vezes e recuperações acima de 90%. O método para os estrógenos utilizou detector de fluorescência, enquanto o método para os fitoestrógenos utilizou o detector de arranjo de diodos. Na validação dos métodos foram avaliadas as figuras de desempenho analítico para ambos os métodos. A avaliação da seletividade demonstrou que não havia a presença de picos interferentes em ambos os métodos avaliados. As curvas analíticas geradas apresentaram linearidade satisfatória e coeficientes de correlação acima de 0,99, para todos os analitos estudados. A linearidade das curvas foi avaliada com os testes de ANOVA e análise dos gráficos de resíduos os quais demonstraram que os modelos não apresentaram falta de ajuste. Os LD's e LQ's estimados para os estrógenos mostraram-se similares aos valores apresentados em outros estudos, enquanto que os LD's e LQ's estimados para os fitoestrógenos tiveram valores mais altos. No entanto podem ser considerados satisfatórios para o tipo de matriz avaliada. A precisão dos métodos foi avaliada pela repetitividade e pela precisão intermediária, as quais apresentaram CV < 13 %. A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação, que esteve na faixa de 72,9 a 113 %. Na avaliação da estabilidade, as soluções padrões de ambos os métodos se mostraram estáveis por um período de até 30 dias sob refrigeração. Os resultados demonstraram que os métodos propostos são confiáveis e que foram validados com sucesso. Depois de validados, os métodos foram aplicados nas análises das amostras de água do Rio Cuiá, situado na cidade de João Pessoa, Paraíba (Brasil), em diferentes pontos de coleta e, em três campanhas amostrais. Em todas as campanhas observou-se a ocorrência dos quatro estrógenos e dos seis fitoestrógenos, em concentrações que variaram de 1,40 a 4.754 ng L⁻¹ para os estrógenos e de 3,58 a 2.210 μ g L⁻¹ para os fitoestrógenos.

Palavras-chave: Interferentes endócrinos, cromatografia, Rio Cuiá, fluorescência e arranjo de diodos.

ABSTRACT

In this work were developed and validated two analytical methodologies using solid phase extraction and High Performance Liquid Chromatography (HPLC), for identification and quantification of endocrine disruptors in surface water. A methodology was used to analyze four estrogens: 17 β -estradiol, ethinyl estradiol, estrone and estriol, and the other methodology was used to analyze six phytoestrogens: biochanin A, genistin, genistein, daidzin, daidzein and formononetin. In the sample preparation step we developed an extraction method using solid phase extraction (SPE). The used cartridges were effective in the extraction for both estrogens and phytoestrogens using 1000 ml of river sample, and reached a pre-concentration factor of 2,857 times and recoveries above 90%. The proposed method uses fluorescence detector for estrogens, while the one for the phytoestrogens uses diode array detector. On methods validation were evaluated analytical performances for both methods. The selectivity shows that there was no presence of interfering peaks in both evaluated methods. The generated calibration curves presented good linearity and good correlation coefficients (above 0.99) for all studied analytes. The curves linearity was evaluated by an ANOVA and analysis of graphical residue which showed that the model shows no lack of fit. The limit of detection (LOD) and of quantification (LOQ) for estrogens and phytoestrogens determined in this study were similar to the observed values in other studies and therefore were considered appropriate for the evaluated matrix type. The accuracy of the methods was assessed by the repeatability and intermediate precision, which presented CV <13%. The accuracy was assessed using the recovery test, which was in the range of 72.9 -113%). In the evaluated stability, standard solutions of both methods were stable for a period of 30 days under refrigeration. The results showed that the proposed methods are reliable and have been validated successfully. After validated the methods were applied in the analysis of water samples from the Cuiá River, located in João Pessoa, Paraíba (Brazil), on different collection points, and three sampling campaigns. In all campaigns it was observed the presence of the four estrogens and phytoestrogens six in concentrations ranging from 1.40 to 4754 ng L⁻¹ for estrogens and 3.58 to 2210 μ g. L⁻¹ to phytoestrogens in the aquatic studied system.

Keywords: Endocrine disruptors, chromatography, Rio Cuiá, fluorescence and diode array .

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1** - Ilustração do sistema endócrino humano, masculino e feminino (fonte: Adaptado de Farabee, 2001). 7
- Figura 2.2** - Fórmulas estruturais em bastão com representações tridimensionais dos estrógenos: (a) Estrona, (b) 17 β - estradiol, (c) Estriol e (d) 17 α - etinilestradiol (Fonte: elaborada pela autora). 10
- Figura 2.3** - Fórmulas estruturais em bastão com representações tridimensionais dos fitoestrógenos: (a) Daidizina; (b) Genistina; (c) Daidizeína; (d) Genisteína; (e) Formononetina e; (f) Biochanin A (Fonte: elaborada pela autora). 13
- Figura 2.4** - Mecanismo de atuação dos IE: a) resposta natural, (b) efeito agonista, (c) efeito antagonista. (GHISELLI e JARDIM, 2007). 15
- Figura 2.5** - Esquema da contaminação das águas por hormônios e fitormônios (Adaptado de TERNES *et al.*, 1999). 17
- Figura 2.6** - Operações típicas de preparo de amostra para análises cromatográficas (Fonte: Adaptado de Lanças, 2009). 20
- Figura 2.7** - Organograma de classes das técnicas de extração. Extração com fluido supercrítico (do inglês: *Supercritical Fluid Extraction – SFE*), extração acelerada com solventes (do inglês: *Accelerated Solvent Extraction – ASE*) e a extração com fluido sub-crítico (do inglês: *Subcritical Fluid Extraction – Sub-SFE*); a extração em fase sólida (do inglês: *Solid Phase Extraction – SPE*); micro-extração em fase sólida (do inglês: *Solid Phase Micro-Extraction – SPME*), extração dinâmica em fase sólida (*Solid Phase Dynamic Extraction – SPDE*), micro-extração por solvente empacotado (do inglês: *Microextraction by Packed Sorbent – MEPS*) e extração sortiva em barra magnética (do inglês: *Stir Bar Sorptive Extraction – SBSE*). Extração ultra-sônica (do inglês: *Ultrasonic Extraction – UE*); Extração assistida por micro-ondas (do inglês: *Microwave-Assisted Solvent Extraction – MASE*). (Fonte: Adaptado de Lanças, 2009). 21
- Figura 2.8** - Seleção, desenvolvimento, validação e utilização de um método analítico (adaptado de CASS e DEGANI, 2009). 25
- Figura 3.1** – Mapa da cidade de João Pessoa-PB, com destaques das áreas ambientais desde parques, zonas de preservação e recursos hídricos principalmente da bacia do Rio Cuiá. ((Retirado e adaptado de <http://www.joaopessoahistorica.com/2011/05/croquis-de-joao-pessoa.html> acesso disponível em maio de 2015). 44
- Figura 3.2** - Imagem aérea do Rio Cuiá em João Pessoa-PB. Destaque para os cinco pontos de coleta de amostras, nascente (*), foz (†) e os três principais afluentes: rio Laranjeira (linha laranja tracejada), riacho Mangabeira (linha amarela tracejada); riacho Sanhavá (linha verde tracejada) (Fonte: adaptado de *google maps*). 45

Figura 4. 1- Esquema do procedimento experimental definido para SPE (Fonte: elaborada pela autora).....	48
Figura 4. 2 - (a) Espectro em três dimensões registrado no detector de DAD de 190 a 500 nm e (b) cromatograma registrado com um fluorímetro com $\lambda_{\text{emissão}} = 306 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{excitação}} = 230 \text{ nm}$, ambos de uma solução de trabalho quatro estrógenos nas seguintes concentrações: estriol, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol = $0,10 \text{ mg L}^{-1}$ e estrona = $5,00 \text{ mg L}^{-1}$, empregando o método HPLC-FLU e as condições otimizadas apresentadas na Tabela 4.4 (Fonte: elaborada pela autora).....	49
Figura 4. 3 - Cromatogramas de uma solução de trabalho contendo os fitoestrógenos daidizina, genistina, daidizeína, genisteína, formononetina e biochanin A na concentração de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ obtidos pelo método HPLC-DAD com (a) fase móvel ACN/H ₂ O e (b) MeOH/H ₂ O (Fonte: elaborada pela autora)	51
Figura 4. 4 - Cromatogramas de uma solução de trabalho contendo os estrógenos nas seguintes concentrações: estriol, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol = $0,10 \text{ mg L}^{-1}$ e estrona = $5,00 \text{ mg L}^{-1}$, registrados com o método HPLC-FLU com (a) fase móvel MeOH/H ₂ O e (b) ACN/H ₂ O (Fonte: elaborada pela autora).	51
Figura 4. 5 - Cromatograma de uma solução de trabalho contendo os fitoestrógenos daidizina, genistina, daidizeína, genisteína, formononetina e biochanin A, na concentração de $20,0 \text{ mg L}^{-1}$, obtido empregando uma corrida isocrática (Fonte: elaborada pela autora).	53
Figura 4. 6 - Cromatograma de uma solução de trabalho quatro estrógenos nas seguintes concentrações: estriol, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol = $0,10 \text{ mg L}^{-1}$ e estrona = $5,00 \text{ mg L}^{-1}$, obtido empregando o método HPLC-FLU e as condições otimizadas. Tempos de retenção são indicados em cada pico. (Fonte: elaborada pela autora).	55
Figura 4. 7- Cromatograma de uma solução de trabalho contendo os fitoestrógenos daidizina, genistina, daidizeína, genisteína, formononetina e biochanin A na concentração de $20,0 \text{ mg L}^{-1}$, obtido empregando o método HPLC-DAD e as condições otimizadas. Tempos de retenção são indicados em cada pico. (Fonte: elaborada pela autora).	55
Figura 4. 8 - Cromatogramas de: (1) mistura padrão de concentração intermediária dos quatro estrógenos ($25,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para estriol, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e $1,25 \text{ mg L}^{-1}$ para estrona), (2) de uma amostra testemunha, coletada no ponto P1 e fortificada no nível de concentração intermediária ($25,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para estriol, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e $1,25 \text{ mg L}^{-1}$ para estrona) e (3) uma amostra testemunha, coletada no ponto P1 sem fortificação. Todos os cromatogramas foram registrados por HPLC-FLU (Fonte: elaborada pela autora).	56
Figura 4. 9 - Cromatogramas de: (1) mistura padrão dos fitoestrógenos daidizina, genistina, daidizeína, genisteína, formononetina e biochanin A, de concentração intermediária ($1,00 \text{ mg L}^{-1}$), (2) de uma amostra testemunha, coletada no ponto P1 e fortificada no nível de concentração intermediária ($1,00 \text{ mg L}^{-1}$) e; (3) de uma amostra testemunha, coletada no ponto P1 sem ser fortificada. Todos os cromatogramas foram registrados por HPLC-DAD (Fonte: elaborada pela autora).	57

Figura 4. 10 - Espectros de absorção molecular UV-Vis obtidos em corrida cromatográfica de: (1) daidizina; (2) genistina e; (3) daidizeína em (—) padrão de 10,0 mg L ⁻¹ e em (—) amostra testemunha fortificada a 10,0 mg L ⁻¹ . (Fonte: elaborada pela autora).....	58
Figura 4. 11 - Espectros de absorção molecular UV-Vis obtidos em corrida cromatográfica de: (1) genisteína; (2) formononetina e; (3) biochanin A em (—) padrão de 10,0 mg L ⁻¹ e em (—) amostra testemunha fortificada a 10,0 mg L ⁻¹ . (Fonte: elaborada pela autora).....	59
Figura 4. 12 - Curvas analíticas obtidas para os quatro estrógenos na faixa de concentração de 3,12 a 100 µg L ⁻¹ para 17 β-estradiol, 17 α-etinilestradiol e estrona e 15,6 a 500 µg L ⁻¹ para estriol (Fonte: elaborada pela autora).....	60
Figura 4. 13 - Curvas analíticas obtidas para os seis fitoestrógenos daidizina, genistina, daidzeína, genisteína, formononetina e biochanin A na faixa de concentração de 0,25 a 20,0 mg L ⁻¹ (Fonte: elaborada pela autora).....	61
Figura 4. 14 - Gráficos dos resíduos das curvas analíticas dos estrógenos estriol (E3), 17 β-estradiol (E2), 17 α-etinilestradiol (EE2) e estrona (E1) (Fonte: elaborada pela autora).....	63
Figura 4. 15 - Gráficos dos resíduos das curvas analíticas dos fitoestrógenos daidizina, genistina, daidzeína, genisteína, formononetina e biochanin A (Fonte: elaborada pela autora).....	64
Figura 4. 16 - Cromatogramas referentes aos ensaios de repetibilidade, realizados para validação do método HPLC-FLU que quantifica os quatro estrógenos.....	70
Figura 4. 17 - Cromatogramas referentes aos ensaios de repetibilidade, realizados para validação do método HPLC-DAD que quantifica os seis fitoestrógenos.....	70
Figura 4. 18 - Cromatogramas sobrepostos resultantes de três momentos distintos de análise da mistura padrão fitoestrógenos (daidizina, genistina, daidizeína, genisteína, formononetina e biochanin A) de concentração alta, registrados pelo método HPLC-DAD.....	74
Figura 4. 19 - Cromatogramas sobrepostos resultantes de três momentos distintos de análise da mistura padrão dos quatro estrógenos (estriol, 17 β-estradiol, 17 α-etinilestradiol, estrona) em alta concentração, registrados com método HPLC-FLU.....	75
Figura 4. 20 - Gráfico de barras das concentrações dos (a) estrógenos e (b) fitoestrógenos nos quatro pontos de coleta, na primeira campanha amostral.....	77
Figura 4. 21 - Cromatograma obtido com o método HPLC-FLU para quantificar os estrógenos E3 (estriol), E2 (17 β-estradiol), EE2 (17 α-etinilestradiol) e E1 (estrona), em uma amostra de água do Rio Cuiá, coletada no ponto P1, em julho de 2012 (Primeira campanha amostral).....	78
Figura 4. 22 - Cromatograma obtido com o método HPLC-DAD para quantificar os seis fitoestrógenos em uma amostra de água do Rio Cuiá, coletada no ponto P1, em julho de 2012 (Primeira campanha amostral).....	79

Figura 4. 23 - Gráfico de barras das concentrações dos (a) estrógenos e (b) fitoestrógenos nos cinco pontos, coletados na segunda campanha amostral.....	79
Figura 4. 24 - Cromatograma obtido com o método HPLC-FLU para quantificar os estrógenos estriol, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e estrona, em uma amostra de água do Rio Cuiá, coletada no ponto P1, em dezembro de 2012 (Segunda campanha amostral).....	80
Figura 4. 25 - Cromatograma obtido com o método HPLC-DAD para quantificar os seis fitoestrógenos em uma amostra de água do Rio Cuiá, coletada no ponto P1, em dezembro de 2012 (Segunda campanha amostral).....	81
Figura 4. 26 - Gráfico de barras das concentrações dos (a) estrógenos e (b) fitoestrógenos nos quatro pontos, coletados na terceira campanha amostral.....	82
Figura 4. 27 - Cromatograma obtido com o método HPLC-FLU para quantificar os estrógenos E3 (estriol), E2 (17 β -estradiol), EE2 (17 α -etinilestradiol) e E1 (estrona), em uma amostra de água do Rio Cuiá, coletada no ponto P2, em maio de 2013 (terceira campanha amostral).....	83
Figura 4. 28 - Cromatograma obtido com o método HPLC-DAD para quantificar os seis fitoestrógenos em uma amostra de água do Rio Cuiá, coletada no ponto P2, em maio de 2013 (terceira campanha amostral).	83
Figura A-1 - Cromatograma em três dimensões da daidizina, obtido relacionando intensidade de sinal analítico (mAu) versus tempo de corrida (minutos) versus comprimento de onda (nm), de uma corrida cromatográfica realizada com o método HPLC-DAD de um mix de 20,0 mg L ⁻¹	101
Figura A-2 - Cromatograma em três dimensões da genistina, obtido relacionando intensidade de sinal analítico (mAu) versus tempo de corrida (minutos) versus comprimento de onda (nm), de uma corrida cromatográfica realizada com o método HPLC-DAD de um mix de 20,0 mg L ⁻¹	101
Figura A-3 - Cromatograma em três dimensões da daidizeína, obtido relacionando intensidade de sinal analítico (mAu) versus tempo de corrida (minutos) versus comprimento de onda (nm), de uma corrida cromatográfica realizada com o método HPLC-DAD de um mix de 20,0 mg L ⁻¹	102
Figura A-4 - Cromatograma em três dimensões da genistéina, obtido relacionando intensidade de sinal analítico (mAu) versus tempo de corrida (minutos) versus comprimento de onda (nm), de uma corrida cromatográfica realizada com o método HPLC-DAD de um mix de 20,0 mg L ⁻¹	102
Figura A-5 - Cromatograma em três dimensões da formononetina, obtido relacionando intensidade de sinal analítico (mAu) versus tempo de corrida (minutos) versus comprimento de onda (nm), de uma corrida cromatográfica realizada com o método HPLC-DAD de um mix de 20,0 mg L ⁻¹	103
Figura A-6 - Cromatograma em três dimensões da biochanin A, obtido relacionando intensidade de sinal analítico (mAu) versus tempo de corrida (minutos) versus comprimento de onda (nm),	

de uma corrida cromatográfica realizada com o método HPLC-DAD de um mix de 20,0 mg L⁻¹103

Figura B.1 - Cromatogramas dos doze experimentos realizados de acordo com o planejamento experimental mostrado na Tabela 3.2, por HPLC-FLU com modificações. (Fonte: elaborada pela autora).....103

Figura B.2 - Cromatogramas dos doze experimentos realizados de acordo com o planejamento experimental mostrado na Tabela 3.2, por HPLC-DAD com modificações. (Fonte: elaborada pela autora).....104

LISTA DE TABELAS

Tabela 2. 1 - Excreção diária (μg) per capita de estrogênios por humanos.....	11
Tabela 2. 2 - Diferentes mecanismos de ação dos interferentes endócrinos.	15
Tabela 3. 1 - Informações sobre os quatro estrógenos e os seis fitoestrógenos utilizados.....	33
Tabela 3. 2 - Planejamento experimental realizado para definição dos parâmetros de análise cromatográfico: vazão, temperatura e pH da fase móvel.....	38
Tabela 3. 3 - Diferentes programas de eluição testados para o método HLPC-FLU.....	39
Tabela 3. 4 - Diferentes programas de eluição testados para o método HLPC-DAD.....	39
Tabela 3. 5 - Localização, em coordenadas geográfica, dos pontos de coleta de amostras água superficial do Rio Cuiá em João Pessoa-PB.....	46
Tabela 3. 6 - Informações das campanhas amostrais realizadas.....	46
Tabela 4. 1 - comprimentos de onda (λ) de máxima absorção para os seis fitoestrógenos.....	50
Tabela 4. 2 - Programa de eluição definido para o método HLPC-FLU.....	52
Tabela 4. 3 - Programa de eluição definido para o método HLPC-DAD.....	53
Tabela 4. 4 - Resumo das condições otimizadas dos métodos HPLC-FLU e HPLC-DAD.....	54
Tabela 4. 5 - Equações das retas ($y = ax + b$), faixa linear dinâmica e coeficientes de correlação linear das curvas analíticas dos quatro estrógenos.....	62
Tabela 4. 6 - Equações das retas ($y = ax + b$), faixa linear dinâmica e coeficientes de correlação linear das curvas analíticas dos seis fitoestrógenos.....	62
Tabela 4. 7 - Dados obtidos na aplicação da ANOVA aos modelos de calibração dos dez analitos estudados.....	65
Tabela 4. 8 - Limites de detecção e quantificação obtidos para os estrógenos pelo método HPLC-FLU.....	66
Tabela 4. 9 - Limites de detecção e quantificação obtidos para os fitoestrógenos pelo método HPLC-DAD.....	66
Tabela 4. 10 - Trabalhos publicados na literatura que analisaram amostras contendo estrógenos.	67

Tabela 4. 11- Trabalhos publicados na literatura que analisaram amostras contendo fitoestrógenos.....	68
Tabela 4. 12 - CV (%) obtidos na avaliação da precisão (repetibilidade intradia) do método HPLC-FLU para os estrógenos, nos três níveis de concentração.....	69
Tabela 4. 13 - CV (%) obtidos na avaliação da precisão (repetibilidade intradia) do método HPLC-DAD para os fitoestrógenos, nos três níveis de concentração.	69
Tabela 4. 14 - Coeficientes de variação (CV) das análises obtidos em três dias diferentes para a avaliação da repetibilidade interdia do método HPLC-FLU, para os quatro estrógenos em três níveis de concentração.....	71
Tabela 4. 15 - Desvios padrão relativo obtidos na avaliação da precisão intermediária do método HPLC-DAD, para os seis fitoestrógenos nos três níveis de concentração.....	71
Tabela 4. 16 - Valores de recuperação (%) obtidos para os ensaios da avaliação da exatidão, com seus respectivos coeficientes de variação (CV), para os seis fitoestrógenos nos três níveis de concentração.....	73
Tabela 4. 17 - Valores de recuperação (%) obtidos para os ensaios da avaliação da exatidão, nos três níveis de concentração, dos quatro estrógenos.....	73
Tabela 4. 18 - Valores de área dos cromatogramas registrados, três momentos diferentes, pelo método HPLC-DAD, para avaliação da estabilidade das soluções padrão de fitoestrógenos.....	74
Tabela 4. 19 - Valores de área dos cromatogramas registrados, três momentos diferentes, pelo método HPLC-FLU, para avaliação da estabilidade das soluções padrão de estrógenos.....	76
Tabela 4. 20 - Valores de concentração de estrógenos e fitoestrógenos encontrados em diversos trabalhos.	84
Tabela C.1 - Dados da ANOVA para a daidizina.....	105
Tabela C.2 - Dados da ANOVA para a genisteína.....	105
Tabela C.3 - Dados da ANOVA para a genistina.....	105
Tabela C.4 - Dados da ANOVA para a daidizeína.....	105
Tabela C.5 - Dados da ANOVA para a formononetina.....	105
Tabela C. 6 - Dados da ANOVA para a biochanin A.....	106
Tabela C. 7 - Dados da ANOVA para o estriol.....	106
Tabela C. 8 - Dados da ANOVA para a estrona.....	106

Tabela C.9 - Dados da ANOVA para o 17 β -estradiol.....	106
Tabela C.10 - Dados da ANOVA para a 17 α -etinilestradiol.....	106
Tabela D.1 - Concentrações dos estrógenos e fitoestrógenos, da campanha 1, realizada em julho de 2012.....	107
Tabela D.2 - Concentrações de estrógenos e fitoestrógenos encontradas no Rio Cuiá, na campanha 2, realizada em dezembro de 2012.....	107
Tabela D.3 - Concentrações de estrógenos e fitoestrógenos encontradas no Rio Cuiá, na campanha 3, realizada em maio de 2013.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CE	Contaminantes emergentes
GC-MS	Cromatografia as gás com detecção por espectrometria de massas
CV	Coefficiente de variação
DAD	Detector de arranjo de diodos
DDE	<i>Dicloro-difenil-dicloroetano</i>
DDT	<i>Dicloro-difenil-tricloroetano</i>
DE	Desreguladores endócrinos
DES	Dietilestilbestrol
E1	Estrona
E2	17 β -estradiol
E3	Estriol
EE2	17 α -etinilestradiol
ETE	Estação de tratamento de esgotos
FE	Fitoestrógenos
FLU	Fluorescência
CG	Cromatografia a gás
GPS	Global position system
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LD	Limite de detecção
LLE	Extração líquido-líquido
LPME	Microextração em fase líquida

LQ	Limite de quantificação
LSE	Extração sólido líquido
MASE	Extração assistida por microondas
ME	Extração com membranas
MeOH	Metanol
MEPS	Microextração com sorvente empacotado
mm	Milímetro
MMLLE	Extração líquido-líquido em membrana microporosa
MS	Espectrometria de massas
nm	Nanômetro
SBSE	Extração com barra sortiva de agitação
SFE	Extração com fluido supercrítico
SLM	Extração suportada por membranas
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida
UV-VIS	Radiação eletromagnética na região ultravioleta-visível
USEPA	United States Environmental Protection Agency
μm	Micrometro

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	i
AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
SUMÁRIO	xix
1- Introdução	3
1.1– Justificativa e caracterização da problemática.....	3
1.2– Objetivos.....	4
1.2.1– <i>Objetivo Geral</i>	4
1.2.2– <i>Objetivos Específicos</i>	5
2– Fundamentação Teórica	7
2.1– O Sistema Endócrino	7
2.2– Interferentes Endócrinos	8
2.3– Substâncias classificadas como interferentes endócrinos	9
2.3.1– <i>Estrógenos</i>	10
2.3.2– <i>Fitoestrógenos ou fitormônios</i>	12
2.4– Forma de atuação dos interferentes endócrinos	14
2.5– Ocorrência dos interferentes endócrinos no meio ambiente	16
2.6– Métodos de determinação de interferentes endócrinos	17
2.6.1– <i>Técnicas de preparo de amostras</i>	20
2.6.1.1– <i>Extração em fase sólida</i>	22
2.6.2– <i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>	24

2.7– Validação de métodos analíticos.....	25
2.7.1– Seletividade	25
2.7.2– Linearidade e faixa dinâmica.....	26
2.7.3– Limite de detecção e limite de quantificação.....	28
2.7.4– Precisão.....	28
2.7.5– Exatidão.....	29
2.7.6– Estabilidade	30
3- Materiais e Métodos.....	32
3.1- Materiais e reagentes	32
3.2– Limpeza das vidrarias	32
3.3– Preparação das soluções.....	32
3.3.1– Preparação das soluções estoque e padrão	32
3.3.2 – Preparação das soluções utilizadas como fase móvel.....	33
3.4 – Desenvolvimento da etapa de extração em fase sólida.....	34
3.4.1– Preparo das amostras	34
3.4.2– Otimização das condições de extração em fase sólida	34
3.5– Análises por cromatografia líquida de alta eficiência.....	36
3.5.1– Otimização das condições cromatográficas.....	37
3.5.1.1– Escolha do tipo de detector.....	37
3.5.1.2– A fase móvel	37
3.5.1.3– Vazão, temperatura e pH da fase móvel	37
3.5.1.4– Modo de eluição.....	39
3.5.1.5– A fase estacionária.....	40
3.6 – Validação dos métodos analíticos HPLC-FLU e HPLC-DAD.....	41
3.6.1– Seletividade	41
3.6.2 – Linearidade e faixa de concentração.....	41

3.6.3 – Limite de detecção e limite de quantificação.....	42
3.6.4 – Precisão.....	42
3.6.5 – Exatidão	43
3.6.6 – Estabilidade.....	43
3.7– Seleção da área de estudo	44
3.7.1– Os pontos de coleta.....	45
3.8 – Coleta e armazenamento das amostras	46
4– Resultados e Discussão.....	48
4.1– Otimização das condições para a fase extratora	48
4.2– Otimização das condições cromatográficas	48
4.2.1– Escolha do tipo de detector	48
4.2.2– A fase móvel.....	50
4.2.3– Vazão, temperatura e pH da fase móvel.....	52
4.2.4– Modo de eluição	52
4.2.5– Fase Estacionária	54
4.3– Seletividade.....	56
4.4– Linearidade e faixa dinâmica.....	59
4.5– Limite de detecção e limite de quantificação.....	65
4.6– Precisão	68
4.7– Exatidão	72
4.8– Estabilidade.....	74
4.9– Ocorrência dos interferentes endócrinos na bacia do Rio Cuiá	77
4.9.1– Primeira campanha amostral	77
4.9.2– Segunda campanha amostral.....	79
4.9.3– Terceira Campanha Amostral.....	81
5– Conclusões.....	87

5.1– Propostas Futuras	88
6– Referências.....	91

INTRODUÇÃO

1 - Introdução

1.1 – Justificativa e caracterização da problemática

Atualmente, no ramo da Química Ambiental, a qualidade da água tornou-se um dos temas mais relevantes. Isso porque, a água vem sendo cada vez mais contaminada por produtos químicos que são amplamente utilizados na sociedade moderna, sendo produzidos mundialmente em larga escala para as mais variadas aplicações. A estes produtos dá-se o nome de Contaminantes Emergentes (CE).

Os CE são contaminantes não regulamentados, que podem ter futuras regulamentações dependendo dos resultados dos estudos sobre a sua toxicidade e/ou efeito sobre o meio ambiente e na saúde humana e animal e de dados de monitorização relativos à sua ocorrência no meio ambiente. (GAFFNEY, 2014) Uma das desvantagens da produção e utilização dos CE está nos resíduos que são gerados, sejam eles derivados diretamente das atividades industriais ou produzidos após seu consumo pela sociedade, que podem impactar de forma negativa o meio ambiente. Em águas naturais, estes contaminantes surgem, principalmente, a partir do descarte de efluentes industriais e/ou domésticos e, mesmo em concentrações baixas (ng L^{-1} a pg L^{-1}), podem provocar efeitos nocivos em organismos vivos.

Segundo a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (USEPA, do inglês *United States Environmental Protection Agency*) os contaminantes emergentes podem ser definidos como: substâncias persistentes bioacumulativas e tóxicas; contaminantes orgânicos globais; produtos de higiene pessoal e produtos farmacêuticos; interferentes endócrinos e ainda, mais recentemente, foram incluídos as nanopartículas (USEPA, 2011).

Os Interferentes Endócrinos (IE) são aquelas substâncias que podem interferir no sistema endócrino de humanos e outros animais e, com isso, afetar a saúde, o crescimento e a reprodução. Nos seres humanos e animais a interferência endócrina é um mecanismo de efeito relacionado ao funcionamento do sistema endócrino. Atualmente, as maiores preocupações em relação à exposição aos IE são (BILA e DEZOTTI, 2007).

- a) Se essas substâncias podem produzir efeitos tóxicos mesmo em baixas concentrações;
- b) Quais substâncias estão associadas aos efeitos tóxicos mesmo em baixas concentrações;
- c) Se essas substâncias estão presentes em concentrações ambientalmente relevantes que possam ser uma ameaça à saúde de humanos e animais e;
- d) Se existe uma concentração limiar abaixo da qual essas substâncias químicas podem ser consideradas como seguras;

Existe uma diversidade de compostos que são classificados como IE, uma vez que sejam suspeitos de interferir no funcionamento do sistema endócrino. As sub-classes de compostos são plastificantes, ftalatos e bisfenol A, bifenilas policloradas, retardantes de chama bromada, pesticidas, os hormônios naturais e sintéticos e os fitormônios. Dentre estes, os hormônios naturais e fitormônios, têm sido os principais motivos de preocupação acerca da contaminação das fontes de água pelo fato de já terem sido detectados em ambientes aquáticos, e até mesmo em águas utilizadas para o consumo humano (SOUZA, 2011).

Devido à dificuldade de identificação dessas substâncias no meio ambiente, métodos analíticos foram desenvolvidos para detectá-las e quantificá-las em matrizes ambientais complexas, a exemplo de águas superficiais e subterrâneas, esgoto doméstico *in natura*, esgoto tratado, efluente de estação de tratamento de esgoto (ETE), sedimentos marinhos, solo e lodo biológico (BILA e DEZOTTI, 2007).

Técnicas de preparo de amostras (LANÇAS, 2009), tais como a extração em fase sólida (do inglês: *solid phase extraction – SPE*) e microextração em fase sólida (do inglês: *solid phase microextraction – SPME*), vêm sendo utilizadas em associação com as técnicas de cromatografia líquida (do inglês: *Liquid Chromatography – LC*), cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês: *High Performance Liquid Chromatography – HPLC*) e cromatografia a gás (do inglês: *Gas Chromatography – GC*), empregando diferentes detectores, como o detector com arranjo de diodos (do inglês: *Diode Array Detector – DAD*), de fluorescência (do inglês: *Fluorescence Detector – FLU*), e detector de massas (do inglês: *Mass spectrometry – MS*) (KAWAGUCHI *et al*, 2004; RIBEIRO *et al*, 2009; FARRE *et al*, 2008).

Diante do exposto, o presente trabalho de pesquisa visa estabelecer metodologias analíticas validadas, empregando técnicas de extração e cromatografia com detecção menos sofisticada, capazes de determinar estrógenos e fitoestrógenos em águas superficiais para serem adotadas em trabalhos de monitoramento ambiental.

1.2 – Objetivos

1.2.1 – Objetivo Geral

Desenvolver e validar duas metodologias analíticas, utilizando SPE e HPLC para identificação e quantificação de alguns estrógenos e fitoestrógenos em águas superficiais.

1.2.2 – Objetivos Específicos

- Desenvolver métodos de extração, pré-concentração e limpeza para todos os analitos provenientes de amostras de águas superficiais de rio;
- Desenvolver metodologias de análise por HPLC para separação e quantificação dos estrógenos e fitoestrógenos em águas superficiais do Rio Cuiá;
- Otimizar as condições cromatográficas das metodologias desenvolvidas
- Validar as metodologias desenvolvidas;
- Aplicar as metodologias desenvolvidas e validadas para a determinação dos estrógenos e fitoestrógenos em amostras de água do Rio Cuiá, situado na cidade de João Pessoa, Paraíba.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 – Fundamentação Teórica

2.1 – O Sistema Endócrino

O conjunto de glândulas localizadas em diversas áreas do corpo, como a tireóide, as gônadas e as glândulas supra-renais, e os hormônios por elas sintetizados, tais como a tiroxina, os estrogênios e progestagênios, a testosterona e a adrenalina, constituem o sistema endócrino (BIRKETT e LESTER, 2003; LINTELMANN *et al.*, 2003). O sistema endócrino humano está mostrado na Figura 2.1.

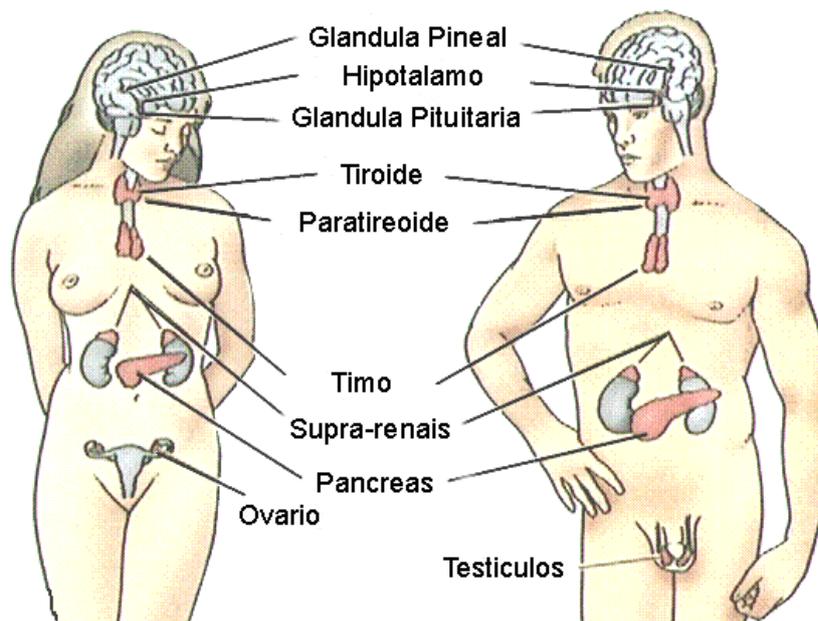


Figura 2.1 - Ilustração do sistema endócrino humano, masculino e feminino (fonte: Adaptado de Farabee, 2001).

O sistema endócrino é um mecanismo complexo que coordena e regula a comunicação entre as células e é responsável por funções biológicas importantes tais como reprodução, desenvolvimento embrionário, crescimento e metabolismo. O seu funcionamento se dá através da secreção de hormônios. Tais hormônios são mensageiros químicos e são responsáveis pela comunicação entre diferentes tipos de células, as quais identificam os hormônios através de receptores especializados em reconhecimento molecular. Depois desta comunicação (hormônio-receptor) ocorre uma série de reações bioquímicas, levando a respostas biológicas específicas (BIRKETT e LESTER, 2003; LINTELMANN *et al.*, 2003; SHIMADA, MITAMURA e HIGASHI, 2001; ALDA e BARCELÓ, 2001; GHISELLI e JARDIM, 2007).

Os hormônios sexuais são produzidos a partir do colesterol e podem ser classificados em três grupos principais: hormônios sexuais femininos ou estrógenos; hormônios sexuais masculinos ou andrógenos e hormônios da gravidez ou progestógenos. Dentre estes, os

estrógenos são os que vêm recebendo maior atenção e são alvo de diversos estudos pelo fato de serem extremamente ativos biologicamente e já estão sendo relacionados à etiologia de vários tipos de doenças. Relatos mostram que os estrógenos naturais (17 β -estradiol) e os sintéticos não afetam somente o sistema reprodutivo, mas também influenciam o sistema imunológico (AHMED, 2000).

2.2 – Interferentes Endócrinos

Interferentes endócrinos (IE) são substâncias exógenas ou progênios secundários que podem alterar fisiologicamente as funções de uma variedade de hormônios endógenos, como estrogênio, androgênio e glândula tireóide (BIRKETT e LESTER, 2003, *apud* GHISELLI e JARDIM, 2007), causando efeitos adversos à saúde de um organismo. Em outras palavras, interferem no sistema endócrino, mimetizando a ação de hormônios naturais, inibindo-os ou alterando as funções regulares normais dos sistemas imunológico e nervoso (BIRKETT e LESTER, 2003). Segundo a União Européia (European ED workshop, 2001), os IE podem danificar ou alterar diretamente um órgão ou função endócrina, interagir com um receptor de hormônios ou alterar o metabolismo de um hormônio em um órgão endócrino. A função hormonal mais afetada por estes agentes é o mecanismo de regulação dos esteroides, que determinam principalmente as características sexuais e comportamentais das espécies.

A origem da hipótese da ação adversa dos IE à saúde se deve a acontecimentos importantes, tais como: o aparecimento de câncer no sistema reprodutivo de filhas de mulheres que usaram dietilestilbestrol na gravidez, entre os anos de 1940 a 1970 (BIRKETT e LESTER, 2003); anomalias no sistema reprodutivo observadas em jacarés que habitavam um lago na Flórida contaminado com o pesticida DDT e seu metabólito DDE (GUILLETTE *et al.*, 1996) e um estudo na Dinamarca que relata o declínio da qualidade do sêmen de homens durante aproximadamente 50 anos, entre os anos de 1938 e 1990 (CARLSEN, *et al.*, 1992). A primeira hipótese sobre os efeitos dos IE foi levantada na década de 1980 (SETAC, 2000), com a observação de características femininas em machos de aves coloniais da região dos Grandes Lagos (EUA-Canadá) expostos a agrotóxicos. No entanto, somente na década de 90 a questão emergiu como sendo uma das principais no campo da pesquisa ambiental moderna (COLUCCI e TOPP, 2001), existindo uma intensa produção científica na área (LAI *et al.*, 2000) com tendência de crescimento ainda maior, devido à abrangência dos tópicos e desafios relacionados com o tema.

No caso da espécie humana, estudos existentes não fornecem evidência tão forte como aquela detectada para espécies animais, mas numerosos exemplos apontam para o mesmo efeito

(SANDERSON *et al.*, 2004; BIRKETT e LESTER, 2003; LINTELMANN *et al.*, 2003; SUMPTER, 1995). Deve-se notar ainda que a ação dos IE pode ser exercida mesmo quando está em concentrações tão pequenas quanto ng L^{-1} como é o caso dos estrogênios sintéticos e naturais.

As maiores preocupações em relação à exposição de humanos e outros animais aos IE são: se essas substâncias podem produzir efeitos tóxicos em baixas concentrações; quais substâncias estão associadas aos efeitos tóxicos a baixas concentrações; se essas substâncias estão presentes em concentrações ambientalmente relevantes que possam ser uma ameaça à saúde de humanos e animais; se existe uma concentração limiar abaixo da qual essas substâncias químicas podem ser consideradas como seguras; se os novos tipos de ensaios, usados para prever os efeitos causados em organismos expostos, podem realmente fornecer ferramentas para o entendimento do mecanismo de ação dessas substâncias e, se esses ensaios podem ser facilmente usados em larga escala para monitorar seus efeitos no meio ambiente. (BILA e DEZOTTI, 2007). A relação entre interferentes endócrinos e transtornos comportamentais em espécies animais é um fato mundialmente aceito.

Várias são as substâncias que possuem a capacidade de afetar o sistema endócrino. Dentre elas, são citadas aquelas de origem vegetal, a exemplo dos fitoestrógenos, estrogênios naturais, a exemplo dos hormônios produzidos pela mulher ou compostos químicos sintéticos como, por exemplo, hormônios sintéticos utilizados em medicamentos, dentre outros (BILA e DEZOTTI, 2007).

2.3 – Substâncias classificadas como interferentes endócrinos

As organizações mundiais (União Europeia (UE), Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), Organização Mundial de Saúde (OMS), Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) e a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE)) que tratam do tema “contaminantes emergentes” elaboraram uma lista extensa de substâncias químicas classificadas como interferentes endócrinos. A União Européia publicou um relatório (CEC, COM (2001) 262 final, 2001) contendo 118 substâncias suspeitas de interferir no sistema endócrino, tanto de seres humanos como de diferentes espécies animais. Das 118, 12 foram classificadas como sendo prioritárias para a condução de estudos mais detalhados (European Commission, 2002), as quais incluem a estrona, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol (BIRKETT e LESTER, 2003).

De uma forma mais genérica, pode-se classificar ou ordenar as substâncias que podem alterar o funcionamento do sistema endócrino em duas classes:

a) Os hormônios naturais que incluem estrogênio, progesterona, testosterona, presentes no corpo humano e nos animais, e os fitoestrogênios ou fitoestrógenos, substâncias contidas em algumas plantas, como nas sementes de soja, e que apresentam uma atividade semelhante aos esteroides hormonais quando ingeridas por um determinado organismo;

b) As substâncias sintéticas que incluem os hormônios sintéticos (hormônios idênticos aos naturais, fabricados pelo homem e utilizados como contraceptivos orais e/ou aditivos na alimentação animal), bem como os xenoestrogênios, substâncias produzidas para utilização nas indústrias, na agricultura e para os bens de consumo (GHISELLI e JARDIM, 2007).

2.3.1 – Estrógenos

Os estrógenos compreendem um grupo de substâncias, tais como os esteroides e seus precursores (AERNI *et al.*, 2004). São as principais substâncias que regulam e sustentam o desenvolvimento sexual feminino e funções reprodutivas de espécies animais, incluindo os seres humanos. Por esse motivo, seus derivados sintéticos são bastante empregados como hormônios inibidores do processo de ovulação (17 α -Etinilestradiol) e também são administrados no controle dos sintomas que envolvem a menopausa, distúrbios fisiológicos e no tratamento do câncer de próstata e de mama (mestranol).

Os estrógenos apresentam, em sua estrutura, dezenove átomos de carbono (C19), distribuídos em estruturas cíclicas, um grupo fenólico e em alguns casos um grupo hidroxílico alifático. Na Figura 2.4 são ilustradas as fórmulas estruturais de alguns estrógenos.

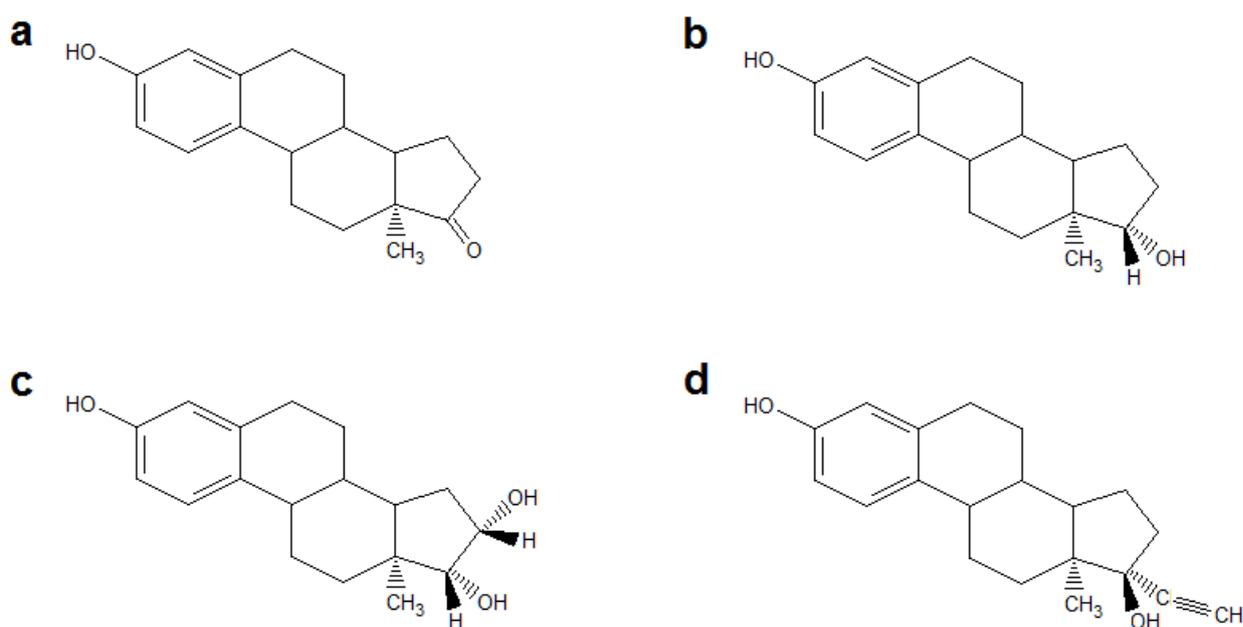


Figura 2. 2 - Fórmulas estruturais em bastão com representações tridimensionais dos estrógenos: (a) Estrona, (b) 17 β - estradiol, (c) Estriol e (d) 17 α - etinilestradiol (Fonte: elaborada pela autora).

Estrógenos, tanto naturais quanto sintéticos, são excretados principalmente pela urina, na forma biologicamente inativa, e em menor proporção pelas fezes (na forma livre), apresentando variações com relação à solubilidade em água, taxa de excreção e catabolismo biológico (BIRKETT e LESTER, 2003; LINTELMANN *et al.*, 2003; SHIMADA, MITAMURA e HIGASHI, 2001). No organismo, os estrógenos são rapidamente absorvidos e, em seguida, metabolizados no fígado. No ambiente são rapidamente hidrolisados, resultando em hormônios livres e seus metabólitos (BIRKETT e LESTER, 2003; LINTELMANN *et al.*, 2003, SHIMADA, MITAMURA e HIGASHI, 2001).

Os seres humanos excretam esteroides sexuais (hormônios) em diferentes quantidades que variam dependendo da idade, do estado de saúde, dieta ou gravidez. Como exemplo disto pode-se mencionar a quantidade de estrogênio excretada por uma mulher grávida, que pode ser de até mil vezes maior que a de uma mulher em atividade normal, dependendo do estágio da gravidez (JOHNSON, BELFROID e DI CORCIA, 2000). A Tabela 2.2 mostra a quantidade de hormônios excretados diariamente por humanos, em diferentes situações.

Tabela 2.1 - Excreção diária (μg) per capita de estrogênios por humanos.

Categoria	estrone	17 β-estradiol	estriol	17 α-etinilestradiol (sintético)
Homens	3,9	1,6	1,5	-
Mulheres menstruando	8	3,5	4,8	-
Mulheres na menopausa	4	2,3	1	-
Mulheres grávidas	600	259	6.000	-
Mulheres	-	-	-	35*

Fonte: JOHNSON, BELFROID e DI CORCIA, 2000.

*Mulheres que tomam algum contraceptivo contendo este composto.

Em relação aos estudos destas substâncias, as maiores preocupações estão voltadas para os estrógenos naturais Estriol, 17 β -Estradiol e Estrone e o hormônio sintético 17 α -Etinilestradiol. Tais preocupações se devem, principalmente, ao fato destes compostos apresentarem grande potencial no que diz respeito às alterações no sistema endócrino e também pelo fato de estarem sendo largamente e continuamente introduzidos no ambiente (HIRAI, MURATA e NISHIDA, 2003).

2.3.2 – Fitoestrógenos ou fitormônios

Fitoestrógenos (FE) ou fitormônios trata-se de uma classe variada de hormônios encontrados nas plantas. São conhecidas mais de 12.000 fitormônios encontrados em alimentos como grãos integrais, ervilhas, feijão, alguns vegetais, e a soja. Estudos indicam que essas substâncias atuam como constituintes das membranas celulares, como hormônios de crescimento, antioxidantes, fungicidas e algumas vezes como herbicidas.

As primeiras indicações de que as plantas teriam uma substância com características hormonais surgiram em 1927 quando os investigadores alemães [LOEWE et al., 1927](#), descobriram a presença de um hormônio sexual em algumas plantas. [WALZ et al., 1931](#), descreveram a soja como um alimento com um teor elevado de substâncias com ação estrogênica. Em 1946 na Austrália, descobriu-se que o composto Equol, presente na urina das ovelhas, era o responsável por elevados casos de esterilidade entre ovelhas que se alimentavam com o trevo vermelho (*Trifolium subterraneum*) nas pastagens ([UNDERWOOD, BENNETTS e SHIER, 1946](#)). Ambientalistas têm associado presença de estrógenos e fitoestrógenos em rios e lagos à existência de mutações e diminuição de população na biota aquática por interferências em funções hormonais ([SUMPTER, 1995](#); [SUMPTER e JOBLING, 1995](#)).

O aumento da produção de soja e seus derivados, cada vez mais presentes na dieta ocidental e oriental, sua associação com a maior incidência de câncer em mulheres ([HE e CHEN, 2013](#)) e a reconhecida excreção de isoflavonas pela urina humana ([TEKEL, DAESELEIRE, HEEREMANS e VAN PETEGHEM, 1999](#)) têm aumentado a preocupação com a presença desses fitoestrógenos em águas de superfície e esgoto doméstico ([LAGANÀ et al, 2005](#); [KUSTER et al, 2009](#); [COMBER, WILLIAMS e STEWART, 1993](#)).

Existe também o problema da remoção incompleta dos fitoestrógenos nos esgotos tratados por processos convencionais, acrescido do lançamento direto de esgotos não tratados, perpetuando a contaminação de águas superficiais e de abastecimento público. ([BACALONI et al, 2005](#)).

Os fitoestrógenos mais estudados são da classe dos liganos e das isoflavonas ([BIRKETT e LESTER, 2003](#); [LINTELMANN et al., 2003](#); [BAIRD, 2002](#)). Trabalhos desenvolvidos para a determinação quantitativa de isoflavonas têm sido aplicados à bebida café e produtos cafeinados ([ALVES et al, 2010](#)), porém o maior número de aplicações está relacionado à soja e seus derivados como leite e a carne de soja, suplementos nutricionais e formulações farmacêuticas a base de soja, por apresentarem maiores concentrações de fitoestrógenos ([CÉSAR et al, 2008](#); [TORO-FUNES et al, 2012](#); [YANAKA, TAKEBAYASH, MATSUMOTO e ISHIMI, 2012](#); [AUWERTER, WANCZINSKI e CHIANDOTTI, 2012](#)).

Estudos revelam que, após o consumo, as isoflavonas sofrem numerosas conversões metabólicas no intestino e tanto os metabólitos quanto os compostos precursores podem ser absorvidos pelo sangue para então serem excretados na urina (BUSTAMANTE-RANGEL *et al.*, 2012; DAI *et al.*, 2002). Dessa forma, a entrada destes contaminantes nas águas superficiais se dá, principalmente, através dos esgotos domésticos.

Na Figura 2.3 estão apresentadas as fórmulas estruturais dos fitoestrógenos estudados e classificados como fitormônios isoflavonas (ADLERCREUTZ e MAZUR, 1997; KAO *et al.*, 1998; VERDRENGH *et al.*, 2004). Daidizina, Genistina e Daidizeína, Genisteína, Formononetina e Biochanin-A formam dois específicos grupos de hormônios conhecidos por isoflavonas glucosídicas e agliconas, respectivamente (BUSTAMANTE-RANGEL *et al.*, 2012).

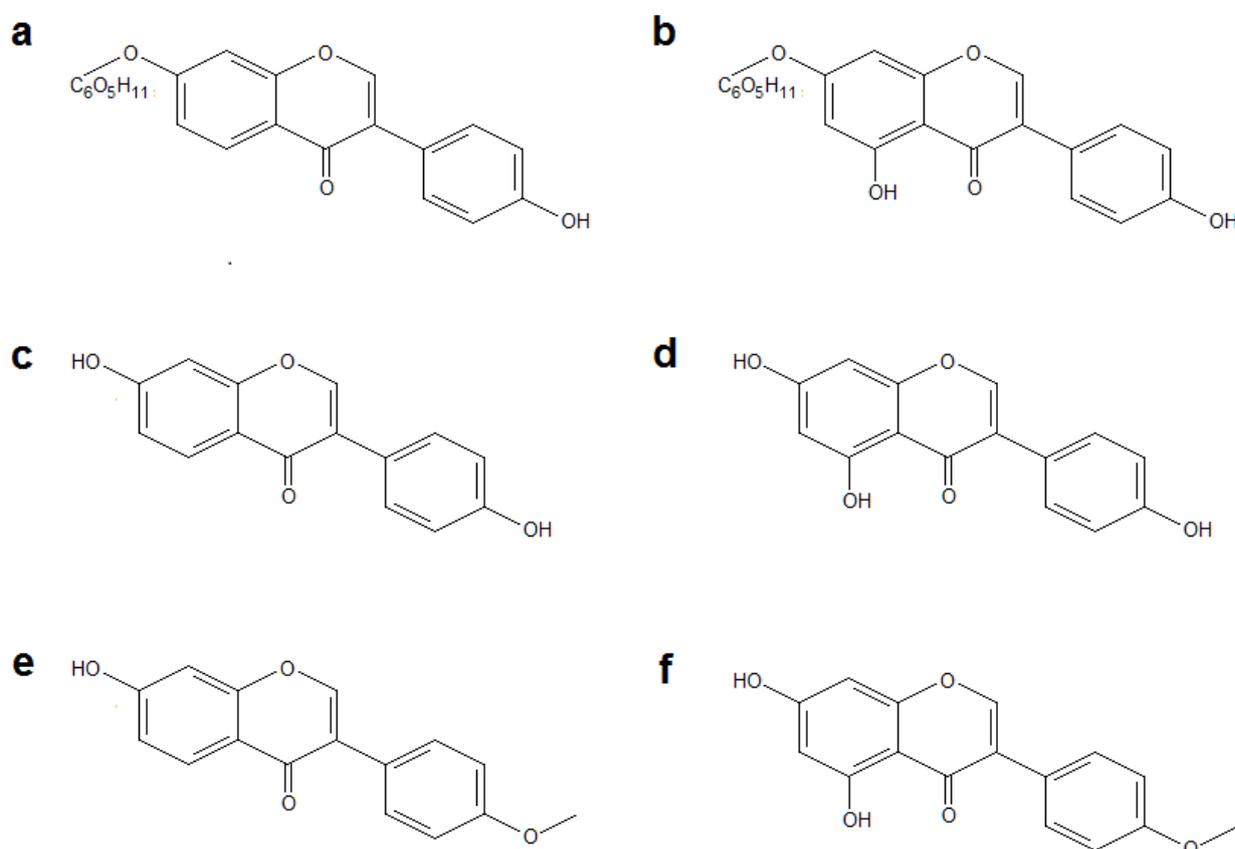


Figura 2.3 - Fórmulas estruturais em bastão com representações tridimensionais dos fitoestrógenos: (a) Daidizina; (b) Genistina; (c) Daidizeína; (d) Genisteína; (e) Formononetina e; (f) Biochanin A (Fonte: elaborada pela autora).

Analisando as estruturas moleculares das isoflavonas, nota-se evidente semelhança principalmente entre a Daidizina e a Daidizeína e também entre a Genistina e a Genisteína. Essa evidência corrobora a possibilidade da primeira estrutura (glucosídica) ser precursora da segunda (aglicona) quando, em condições propícias do meio, venham sofrer reações químicas no meio ambiente ou metabolização celular em organismos animal ou humano.

Mesmo que naturalmente produzidas por vegetais, as isoflavonas glucosídicas, provenientes principalmente da soja e leguminosas, possuem relativa bioatividade estrogênica em organismo animal depois que sofrem hidrólise enzimática no intestino delgado (glucosidases), resultando nas agliconas (CÉSAR *et al.*, 2008; ALVES *et al.*, 2010). O mesmo acontece com variantes estruturais, por isso as pesquisas de isoflavonas em soja não se limitam apenas às glucosídicas e agliconas, mas também às suas várias formas conjugadas (TORO-FUNES *et al.*, 2012; TAKEBAYASH, MATSUMOTO e ISHIMI, 2012).

A grande semelhança estrutural da molécula básica dos estrógenos (Figura 2.2 e Figura 2.3) permite que as isoflavonas se liguem quimicamente a específicos receptores estrógenos intracelulares e provoquem indiretamente variações dos sinais endócrinos em animais e no homem, caracterizando-as como fitoestrógenos (GUNTER *et al.* 2007; G. J. NATL. 2002).

2.4 – Forma de atuação dos interferentes endócrinos

A ação de um determinado hormônio inicia-se através da sua ligação a um receptor específico, no interior de uma célula. O complexo resultante liga-se a regiões específicas do DNA presente no núcleo da célula, o que determina a ação dos genes. Os hormônios após serem sintetizados são transportados pela corrente sanguínea até os órgãos, onde são utilizados. As células possuem um receptor de hormônio e ao ligar-se ao receptor, a resposta desejada é produzida. (BAIRD, 2002; BIRKETT e LESTER, 2003; LINTELMANN *et al.*, 2003; *Relatório Final COM(1999)706*).

O que ocorre na interferência endócrina é que os IE podem interagir com os receptores de hormônios, alterando a resposta padrão do sistema endócrino (BIRKETT e LESTER, 2003). Assim, dois processos distintos podem ser desencadeados:

a) A substância química pode se ligar ao receptor hormonal e produzir uma resposta, atuando então como um mimetizador, ou seja, imitando a ação de um determinado hormônio. A este processo dá-se o nome de efeito agonista.

b) A substância química pode se ligar ao receptor, mas nenhuma resposta ser produzida, neste caso ela estará agindo como um bloqueador, ou seja, estará impedindo a interação entre um hormônio natural e seu respectivo receptor. Este processo é denominado de efeito antagonista.

Na [Figura 2.2](#) são ilustrados os dois mecanismos de atuação dos interferentes endócrinos.

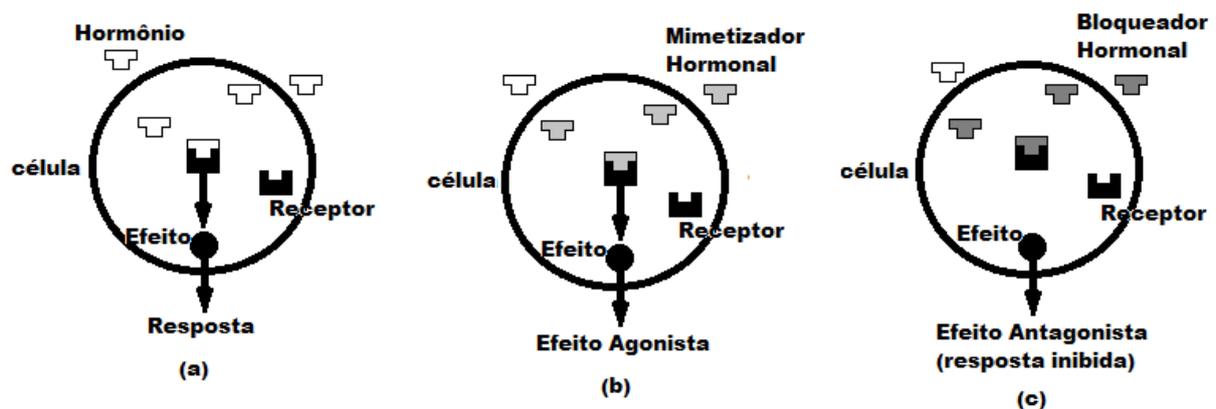


Figura 2. 4 - Mecanismo de atuação dos IE: a) resposta natural, (b) efeito agonista, (c) efeito antagonista. (GHISELLI e JARDIM, 2007).

Podem ocorrer outros efeitos como alterações na síntese e na remoção dos hormônios de seus respectivos receptores ou interações com sistemas multi-hormonais, no entanto esses não foram completamente elucidados. (LINTELMANN *et al.*, 2003). Na [Tabela 2.1](#) são apresentados alguns exemplos dos mecanismos de ação dos interferentes endócrinos.

Tabela 2. 2 - Diferentes mecanismos de ação dos interferentes endócrinos.

Mecanismo	Definição
Mimetizar	Um IE pode ligar-se ao receptor de um hormônio e enviar mensagem aos genes receptores. Mensagens enviadas no momento impróprio ou superprodução de mensagens têm efeitos adversos em funções biológicas.
Simular	Alguns IE são capazes de simular a formação de mais receptores de hormônios nas células, levando a amplificação de sinais.
Bloquear	Pela ocupação do receptor na célula, alguns IE são capazes de bloquear o hormônio natural impedindo que sua função seja exercida. Isso pode aumentar ou diminuir o efeito dependendo se o bloqueador é mais ou menos potente do que o hormônio que está sendo bloqueado.
Destruir	Podem destruir o hormônio ou a capacidade do hormônio de executar a sua função, alterando sua estrutura direta ou indiretamente, fazendo com que o hormônio não se encaixe no sítio receptor.

Fonte: [Birkett e Lester \(2003\)](#).

Um receptor hormonal possui elevada sensibilidade e afinidade por um hormônio específico, produzido no organismo. Isso explica o porquê de determinados IE presentes no organismo, mesmo em baixíssimas concentrações, serem capazes de gerar um efeito, provocando, conseqüentemente, uma resposta (GHISELLI e JARDIM, 2007).

2.5 – Ocorrência dos interferentes endócrinos no meio ambiente

Os interferentes endócrinos estão presentes no meio ambiente em concentrações baixíssimas ($\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1}) (BILA e DEZOTTI, 2007). Apesar de possuírem meia-vida curta, essas substâncias geralmente são persistentes no ambiente, pois são introduzidas continuamente em ambientes aquáticos e com isso se acumulam no solo e nos sedimentos. Suas fontes são as mais variadas possíveis, como por exemplo, as descargas de esgotos industriais e domésticos, atividades de mineração, práticas agrícolas e enchentes que direcionam todos os seus dejetos para os corpos d'água (BIRKETT e LESTER, 2003). O conhecimento do destino e dos processos de transporte desses poluentes no meio ambiente é essencial para avaliar seus impactos potenciais no meio ambiente.

Para o homem, a maior fonte de contaminação por IE ocorre pela ingestão da água potável contaminada. Desta forma, o uso de águas superficiais para o consumo humano ou até mesmo a transformação de mananciais em receptores de esgotos sanitários tem sido a maior preocupação acerca da contaminação das fontes de água, uma vez que os processos de tratamento de esgotos convencionais utilizados não conseguem remover totalmente muitas destas substâncias (BIRKETT e LESTER, 2003; LINTELMANN *et al.*, 2003; HALLING-SØRENSEN *et al.*, 1998).

Uma importante fonte de lançamento de substâncias estrogênicas no ambiente aquático são os efluentes de ETE. Essa informação é confirmada em estudos que revelaram que alguns estrógenos (17 β -estradiol, estrona e 17 α -etinilestradiol) são responsáveis pela maior parte da atividade estrogênica detectada em efluentes de ETE no Reino Unido (DESBROW *et al.*, 1998; JOBLING *et al.*, 1998). Na Figura 2.3 está ilustrado o fluxo de entrada dos contaminantes no meio ambiente.

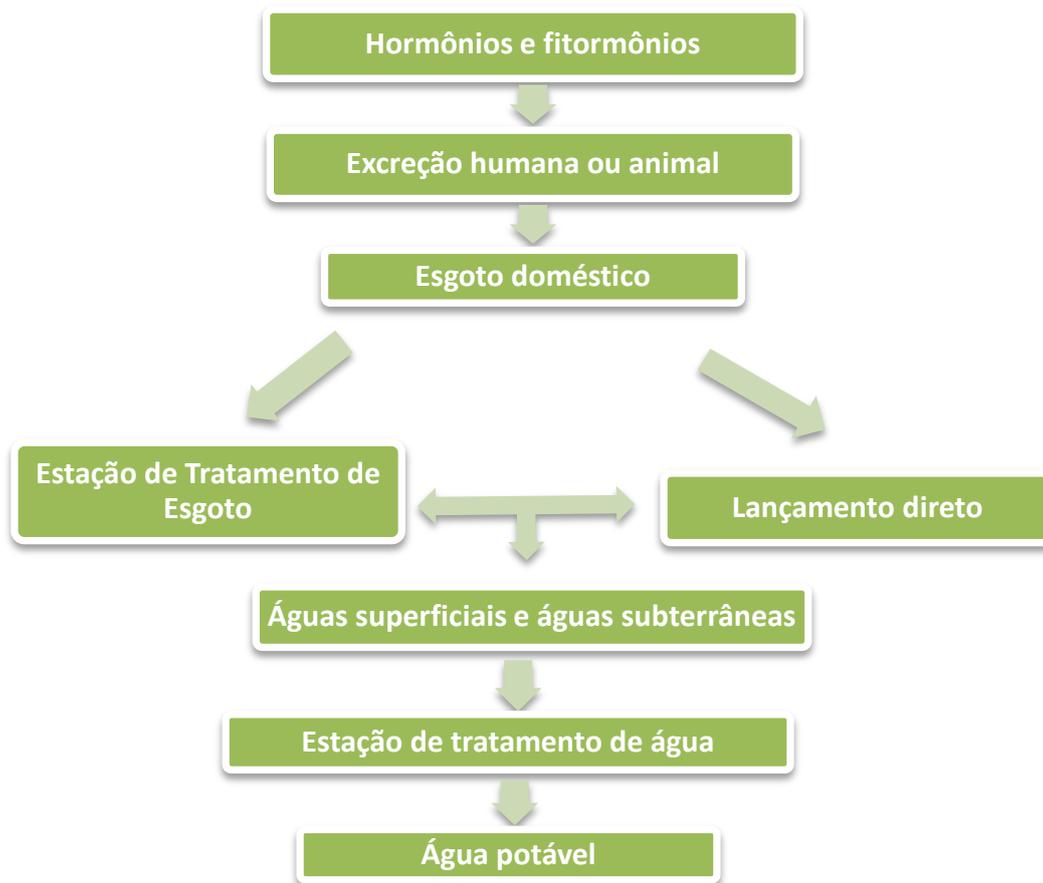


Figura 2. 5 - Esquema da contaminação das águas por hormônios e fitormônios (Adaptado de [TERNES et al., 1999](#)).

2.6 – Métodos de determinação de interferentes endócrinos

É um desafio cromatográfico, determinar por um mesmo método, diferentes substâncias e em variados níveis de concentração, utilizando a mesma fase móvel, a mesma coluna, o mesmo detector e, além disso, conquistar sensibilidade analítica e baixo custo operacional.

Caracteriza-se uma tarefa bastante difícil para os pesquisadores da área de Química Ambiental, desenvolver métodos analíticos que possam ser aplicados com eficácia no monitoramento e identificação de IE, que são substâncias encontradas em concentrações muito baixas, na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} . ([SANTANA-RODRÍGUEZ, 2014](#)). Além disso, as matrizes as quais se deseja identificar tais substâncias são complexas, como por exemplo, águas naturais, sedimentos, lodo biológico e efluente de ETE.

Um significativo progresso na determinação de diversos contaminantes emergentes ocorreu entre 2000 e 2010, onde foram desenvolvidas e publicadas várias metodologias analíticas, principalmente para a análise de estrógenos nestas matrizes complexas. Para os fitoestrógenos, muitas metodologias analíticas foram desenvolvidas para a determinação em

matrizes alimentares e fluidos biológicos, mas são poucas as informações encontradas na literatura a respeito da presença de fitoestrógenos em matrizes ambientais.

No trabalho de Alda e Barceló, 2000 foi descrito um procedimento desenvolvido para a determinação de vários hormônios (17β -estradiol, estriol, estrona, 17α -etinilestradiol, mestranol e dietilestilbestrol, progesterona, levonorgestrel, noretindrona e diacetato etinodiol). O processo inclui a SPE e a análise subsequente por cromatografia líquida com detecção de díodos e detecção por espectrometria de massas em série (LC-MS-DAD). O método foi aplicado em vários tipos de amostras aquosas, incluindo afluentes e efluentes de esgoto, águas superficiais e água potável.

Laganà e colaboradores, 2005 desenvolveram um método para investigar a presença de nove fitoestrógenos (daidizeína, $4',6,7$ -trihidroxiisoflavona, genisteína, formononetina, biochanin A, coumestrol, gliciteína, daidizina, genistina) em águas de rio e águas residuais. A metodologia faz uso de SPE, seguido por cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a espectrometria de massa em tandem usando fonte de ionização por eletronebulização (HPLC-ESI-MS / MS).

Wang e colaboradores, 2006 estabeleceram um método de pré-concentração dos analitos baseado na análise de ponto nuvem para determinar quatro tipos de estrógenos: estriol, 17β -estradiol, estrona, e progesterona em águas residuais. Para isso utilizaram a cromatografia líquida de alto desempenho com detecção por ultravioleta (HPLC-UV).

Em 2007, Stafiej, Pyrzyńska e Regan desenvolveram um método que utilizava cromatografia líquida com detecção UV para determinação de diversos compostos, dentre eles estriol, 17β -estradiol, estrona e 17α -etinilestradiol em amostras de água, que foram preparadas por extração em fase sólida.

Em 2008, Viglino e colaboradores desenvolveram um método em linha totalmente automatizado, o qual utilizava extração em fase sólida juntamente com a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem utilizando ionização à pressão atmosférica (LC-LC-APPI-MS/MS) para detectar hormônios naturais e sintéticos, inclusive estriol, 17β -estradiol, estrona e 17α -etinilestradiol, em amostras de águas de rios e águas residuais.

Rice e Hale, 2009 desenvolveram uma metodologia analítica para analisar, em matrizes aquosas, tais como água deionizada, água de lagoa e águas residuais, androgênios e estrogênios, dentre eles 17β -estradiol, estrona, 17α -etinilestradiol e estriol. Neste trabalho a metodologia foi desenvolvida utilizando extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas em série com fonte de ionização por eletronebulização (UHPLC-ESI-MS/MS).

Neste mesmo ano, Kuster e colaboradores, 2009 estudaram a ocorrência de fitoestrógenos em águas de rio e águas residuais de ETE no estado do Rio de Janeiro (Brasil). Para isso, desenvolveram uma metodologia baseada na extração em fase sólida, seguida de análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem

Chang e Huang, 2010, avaliaram os níveis de hormônios esteróides (E1, E2, EE2 e E3) em água de torneira e água de rio, utilizando um método desenvolvido por eles com base na microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante (DLLME-SFO) adotando cromatografia líquida de ultra eficiência com detecção por ultravioleta (UPLC-UV).

Em 2010 Matsumoto e colaboradores desenvolveram uma metodologia que usava cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica em 2D (HPLC-2ED) para determinar isoflavonas (daidizina, genistina, daidizeína e genisteína) com alta sensibilidade, em leite de soja.

No ano seguinte Lucci e colaboradores, 2011, também adotando cromatografia líquida de ultra eficiência, porém acoplado à espectrometria de massas com utilização de detector triplo quadrupolo (TSQ - QqQ), determinaram dienestrol (DIES) e dieilestilbestrol (DES) além dos estrógenos citados anteriormente, em amostras aquosas naturais e sintéticas. Nesse método os pesquisadores empregaram o polímero molecularmente impresso (MIP) como sorvente na etapa de extração em fase sólida (SPE).

Em 2013, Ciofi e colaboradores desenvolveram um método completamente automatizado de extração em fase sólida *on line* com detecção por cromatografia líquida e espectrometria de massas em tandem com ionização por eletronebulização para analisar amostras de águas superficiais e residuais contendo estrona (E1), 17 β -estradiol (E2), 17 α -etinilestradiol (EE2) e estriol (E3).

Também em 2013, Snow e colaboradores propuseram um método analítico para determinar vários esteróides naturais e sintéticos (testosterona, estriol, 17 α -etinilestradiol, 17 α -estradiol, 17 β -estradiol, acetato de melengestrol, entre outros), em água e também em amostras sólidas. O método foi desenvolvido utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem e fotoionização à pressão atmosférica no modo positivo (LC-APPI-MS/MS).

Lima e colaboradores, 2013 propuseram uma nova metodologia de baixo custo para a análise de estrógenos (E2 e EE2) em amostras de águas. O método é baseado na microextração líquido - líquido dispersiva seguida por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção fluorescente.

Ainda em 2013, Rocha e colaboradores desenvolveram e otimizaram um método baseado na cromatografia a gás com detecção por espectrometria de massas (GC-MS) para a determinação de 17 de desreguladores endócrinos (EDC) em amostras de águas costeiras. Dentre os EDC's estudados estão os estrógenos E1, E2 e E3 e os fitoestrógenos formononetina, biochanin A, daidizeína e genisteína.

2.6.1 – Técnicas de preparo de amostras

Numa análise típica de resíduos e contaminantes ambientais o processo de preparo da amostra é o último processo a anteceder a análise instrumental. A finalidade desse processo é adequar o analito às condições da técnica e do método analítico a serem utilizados (LANÇAS, 2009). Para tanto nesse processo, várias operações podem ser necessárias a depender da natureza da amostra, da matriz e da concentração natural do(s) analito(s) e do(s) interferente(s). Em análises cromatográficas as operações típicas de preparo da amostra estão limitadas a quatro grupos de técnicas particulares, conforme apresentado na Figura 2.6.

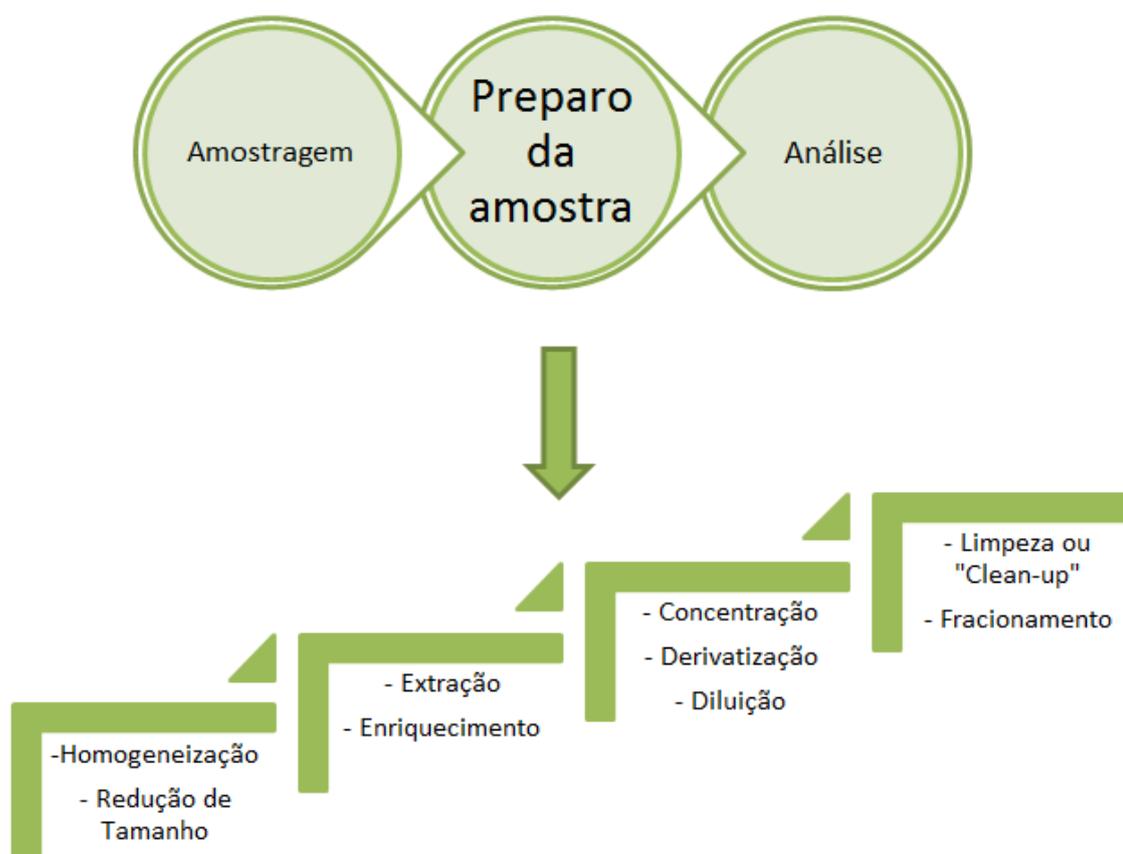


Figura 2.6 - Operações típicas de preparo de amostra para análises cromatográficas (Fonte: Adaptado de Lanças, 2009).

Em cromatografia líquida, normalmente o processo de preparo de amostra consome entre 60 e 80% do tempo total de análise (LANÇAS, 2009; ALMEIDA et al., 2008), isso porque cada operação possui complexidade suficiente para exigir cautela e muita perícia para garantir sua eficiência. Dentre as operações apresentadas na Figura 2.6, a extração é aquela que mais tem sido adotada nas duas últimas décadas (ALMEIDA et al.,2008).

Pode-se entender que a técnica de extração resume-se à remoção do analito na matriz original, empregando-se um solvente apropriado. Atualmente, existe um significativo número de técnicas de extração disponíveis para o preparo de amostras. Dentre as mais bem estabelecidas estão: extração líquido-líquido (do inglês: *Liquid-Liquid Extraction – LLE*); extração em fluido pressurizado; extração sólido-líquido (do inglês: *Liquid-Solid Extraction – LSE*) e; a extração miniaturizada. No entanto, com base nos fundamentos de cada uma dessas técnicas existem seus respectivos seguimentos, conforme apresentado na Figura 2.7.



Figura 2.7 - Organograma de classes das técnicas de extração. Extração com fluido supercrítico (do inglês: *Supercritical Fluid Extraction– SFE*), extração acelerada com solventes (do inglês: *Accelerated Solvent Extraction – ASE*) e a extração com fluido sub-crítico (do inglês: *Subcritical Fluid Extraction– Sub-SFE*); a extração em fase sólida (do inglês: *Solid Phase Extraction – SPE*); micro-extração em fase sólida (do inglês: *Solid Phase Micro-Extraction – SPME*), extração dinâmica em fase sólida (*Solid Phase Dynamic Extraction–SPDE*), micro-extração por solvente empacotado (do inglês: *Microextraction by Packed Sorbent – MEPS*) e extração sortiva em barra magnética (do inglês: *Stir Bar Sorptive Extraction – SBSE*). Extração ultra-sônica (do inglês: *Ultrasonic Extraction – UE*); Extração assistida por micro-ondas (do inglês: *Microwave-Assisted Solvent Extraction – MASE*). (Fonte: Adaptado de Lanças, 2009).

Até alguns anos era comum realizar a etapa de preparo de amostras utilizando extração líquido-líquido, mas percebeu-se que esse tipo de extração, além de ser uma técnica morosa, requer grandes volumes de solventes orgânicos, apresentando custo elevado (LANÇAS, 2009). Para eliminar esses e outros inconvenientes, passou-se a utilizar outra técnica, já bem estabelecida, denominada de extração em fase sólida. A sua grande similaridade com a

cromatografia líquida de coluna aberta, facilita e promove maior domínio técnico e operacional por parte do analista, tornando-a segura e prática.

2.6.1.1 – Extração em fase sólida

Nesse tipo de extração, enquanto a fase sólida é considerada uma fase estacionária, a fase líquida é amostra onde se encontra(m) o(s) constituinte(s) de interesse, que podem vir a ser o(s) analito(s) na análise cromatográfica, e também os interferentes naturais. Normalmente a fase sólida corresponde a enchimentos sólidos devidamente confinados em cartuchos.

O tipo de cartucho a ser empregado na SPE está relacionado aos mecanismos de retenção pretendidos, ou seja, a fase sólida extratora da qual é constituído. Existem, comercialmente, cartuchos com fase sólida apolar (octadecil, octil, fenil etc.), polar (cianopropil, diol etc.), de troca-iônica (trimetilaminopropil, carboximetil etc.), adsorção (sílica-gel, florisil®, carvão grafitizado etc.), covalentes (ác. Fenilborônico) e múltiplos (LISKA, 2000). Em todos esses cartuchos, o tamanho das partículas empregadas nos enchimentos pode variar entre 8 e 100 µm. Para o caso de volumes e quantidades de sorventes utilizados no empacotamento de cartuchos, estas variam de 100 a 1.000 mg de sorvente, sendo os mais utilizados os cartuchos contendo 200 e 500 mg.

A aplicação e a utilização dos cartuchos são fáceis de fazer, porém não são triviais, pois não se pode esquecer que em todas essas fases sólidas são encontradas moléculas orgânicas passíveis de protonação e/ou desprotonação, de ataques eletrofílicos de hidroxilas e de interação eletrostática com eletrólitos naturais da amostra. Logo, deve-se sempre estabelecer condições ótimas de pH e, se necessário, do uso de eletrólitos os quais estão intimamente relacionados à força iônica do meio. Os mecanismos de separação na SPE são basicamente os mesmos existentes em cromatografia líquida de baixa pressão. Dentre eles os principais são: adsorção; partição (fase normal e fase reversa); troca iônica e exclusão por tamanho. O modo genérico de operação em SPE segue um roteiro simples e de fácil execução, no entanto, existem modos operacionais específicos da SPE com finalidades diferentes, são eles (LANÇAS, 2009):

a) *Extração para concentração ou enriquecimento*: a finalidade dessa operação de SPE resume-se à retenção máxima do constituinte de interesse após passagem de grandes volumes de amostra deixando passar toda a matriz e interferentes. Em seguida elui-se o analito com um pequeno volume de solvente, de forma que o analito coletado estará mais concentrado que na amostra original.

b) *Extração para isolamento do analito*: esta operação possui a finalidade de apenas isolar o constituinte de interesse dos demais constituintes, tidos como interferentes da amostra,

segundo a técnica analítica adotada. Ambos, constituinte de interesse e interferentes são retidos na fase sólida e apenas os interferentes são eluídos, o que resulta numa limpeza da amostra.

c) *Extração para isolamento de matriz*: aqui se isola os outros constituintes do analito. Trata-se de uma operação contrária à descrita no item b) e que pode imprimir maior velocidade ao método de análise adotado. Tal vantagem justifica-se pelo fato do analito permear a fase sólida sem sofrer alterações, sendo recolhido e logo analisado, eliminando a etapa de redissolução.

d) *Extração para estocagem de amostra*: esta operação tem a finalidade de realizar a extração e retenção dos constituintes de interesse no próprio local de coleta da amostra ou no laboratório, possibilitando posterior análise das amostras. Nesse caso, os analitos permanecerão retidos na fase sólida dos cartuchos, que ficarão estocados a baixas temperaturas até a continuidade dos processos de eluição, limpeza e análise. A vantagem dessa operação é a comodidade de se transportar alguns cartuchos de SPE ao invés de recipientes com grandes volumes, principalmente, quando se têm compostos lábeis e/ou voláteis na amostra. No entanto, deve-se realizar um estudo de estabilidade do constituinte de interesse no cartucho adotado.

Em qualquer desses casos, são sempre realizadas as seguintes etapas:

- Escolha da fase sólida;
- Condicionamento do cartucho;
- Introdução da amostra;
- Lavagem e a secagem do cartucho e;
- Eluição.

Nessas etapas, a solução contendo o(s) analito(s) (amostra ou padrão) é inserida na entrada do cartucho e aspirada com pequeno vácuo ou pressionada levemente com uma seringa ou gás, de forma a penetrar no cartucho. Após toda a fase líquida ser drenada do cartucho, o analito retido é, em seguida, eluído com um pequeno volume de solvente apropriado, de forma a coletá-lo em uma concentração adequada para análise.

A SPE é uma técnica analítica muito poderosa, tanto do ponto de vista da seletividade, quanto do ponto de vista da sensibilidade, da precisão, da exatidão, da versatilidade, da recuperação significativa de analito e da facilidade de execução. No entanto, é uma técnica que também acumula algumas desvantagens, com destaque para o consumo elevado de solventes, a morosidade de cada etapa e a necessidade de intervenção direta do analista. Tais desvantagens podem ser minimizadas e outras eliminadas quando se adota a automatização das etapas de condicionamento, extração, limpeza e eluição. (SODRÉ, LOCATELLI e JARDIM, 2009).

2.6.2 – Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida é uma técnica muito antiga, mas foi partir dos anos 70 que teve um avanço considerável quando se tornou possível recheiar colunas com partículas de pequeno tamanho, necessárias para alta resolução e, também, adquirir equipamentos que funcionavam nas altas pressões necessárias para obter uma satisfatória velocidade na eluição (SNYDER, 1997). Nos últimos anos também ocorreu o desenvolvimento de vários detectores, bem como acoplamento com outras técnicas, como a espectrometria de massas (MCMASTER, 2005, NIESSEN, 2006, LANÇAS, 2009) tornando possível a detecção de compostos em níveis de traços, em amostras complexas (PERES, 2002; CHIARADIA, COLLINS e JARDIM, 2008; VÉKEY, 2001; NUNES, SANTOS e BARCELÓ, 2002).

HPLC é um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel, que é eluída sob altas pressões. Solventes líquidos (fase móvel) transportam os analitos através de uma coluna cromatográfica, onde ocorre a separação pelas diferenças de afinidade dos analitos com a fase estacionária. Em um único processo, pode-se separar uma mistura em seus componentes individuais e, simultaneamente, determinar a concentração de cada componente (SCOTT, 1995).

Entre os métodos modernos de análise de compostos, a HPLC ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (MOLDOVEANU e DAVID, 2012; COLLINS, BRAGA e BONATO, 1997). Por meio desta técnica pode-se detectar a maioria dos compostos e analisar traços de compostos em amostras complexas, tais como as amostras ambientais (COLLINS et al., 1997), seja por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise.

Um dos motivos pelo qual a HPLC apresenta vantagens em relação à cromatografia a gás, para análise de compostos em água, é que, compostos voláteis detectados por cromatografia a gás, representam uma pequena fração de compostos contidos em água e esgotos (GROB, 1983). Além disso, os analitos menos voláteis podem sofrer degradação quando submetidos às altas temperaturas da cromatografia a gás.

Para a detecção de contaminantes como estrógenos e fitoestrógenos, os pesquisadores têm utilizado diversos tipos de detectores usando a técnica de HPLC. Os principais detectores são eletroquímicos e espectroquímicos (SHIMADA, TANAKA, e NAMBARA, 1981; SHIMADA, NAGASHIMA, e NAMBARA, 1987; REID, STITZEL E HEAD, 1985; FERNÁNDEZ e GARCIA, 1993; GIESE, 2003), os de fluorescência (GATTI et al, 1998; GATTI, GIOIA, DI

PIETRA e CAVRINI, 1998; NOVAKOVI, TVRZICKÁ E PACÁKOVÁ, 1994; MATSUMOTO *et al*, 2002; DE BOER *et al*, 2004; MAO *et al*, 2004), os de DAD (ALDA e BARCELÓ, 2001), os de espectrômetro de massas (ALDA e BARCELÓ, 2003; INGRAND, HERRY, BEAUSSE e ROUBIN, 2003; GOMES, SCRIMSHAW e LESTER, 2003; GIESE, 2003), e os de DAD acoplados a espectrômetro de massas (BARCELÓ e ALDA, 2001; BARCELÓ e ALDA, 2003).

2.7 – Validação de métodos analíticos

A [Figura 2.8](#) mostra um esquema das etapas envolvidas no processo de seleção, desenvolvimento, validação e utilização de um método analítico (CASS e DEGANI, 2009). A validação de um método analítico pode ser definida como o processo de avaliação da eficiência de um método analítico novo ou adaptado de métodos conhecidos. O processo de validação fornece uma evidência documentada de que os métodos de ensaio executados conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade e aos propósitos pretendidos. Para validação dos métodos selecionados, desenvolvidos e utilizados neste trabalho, seguiu-se os critérios e recomendações do INMETRO (BRASIL. INMETRO, 2003) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL. ANVISA, 2003).

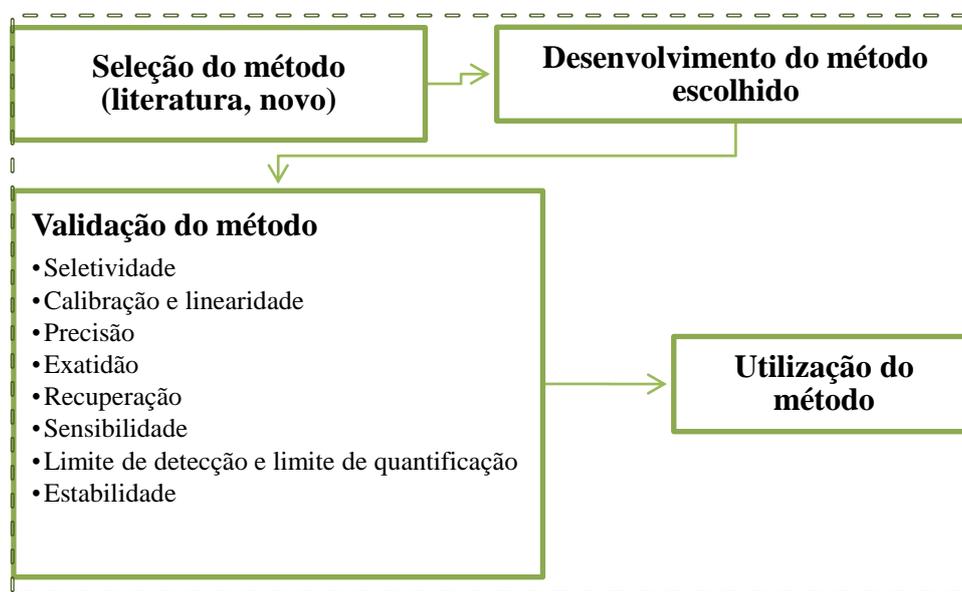


Figura 2.8 - Seleção, desenvolvimento, validação e utilização de um método analítico (adaptado de CASS e DEGANI, 2009).

2.7.1 – Seletividade

De acordo com a definição da ANVISA (BRASIL. ANVISA, 2003), seletividade é a capacidade do método de medir exatamente os compostos de interesse, mesmo em presença de

outros componentes, impurezas e produtos de degradação. Em outras palavras, seletividade é a capacidade que um método tem em determinar, de forma inequívoca, substâncias de interesse que estejam na presença de componentes que possam interferir na sua determinação, em uma amostra complexa.

Existem diferentes maneiras de se avaliar a seletividade de um método proposto. Uma delas é comparar 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, ou seja, este deve estar bem separado dos tempos de retenção dos demais compostos presentes na amostra (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION ON METHODS, 1995; ICH, 1995; SHABIR, 2003; SWARTZ e KRULL, 1998). A outra forma de avaliação da seletividade muito utilizada em HPLC-DAD é comparar o espectro do pico obtido na separação dos componentes das amostras, com o pico obtido por uma solução padrão (HUBER, 1998; JENKE, 1998; VESSMAN *et al*, 2001).

2.7.2 – Linearidade e faixa dinâmica

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração das substâncias de interesse, dentro de uma determinada faixa. (ICH, 1995; US PHARMACOPEIA, 1999; SWARTZ e KRULL, 1998). A linearidade expressa a faixa na qual o sinal analítico, denominado variável dependente y_i , é linearmente proporcional à sua concentração, denominada variável independente x_i , e a equação matemática que descreve esta dependência é conhecida como *curva analítica*. O ajuste de uma equação matemática, geralmente, é feito pelo método dos mínimos quadrados, no qual a melhor curva será aquela que fornecerá o menor valor para a soma quadrática dos resíduos (Q), obtidos entre o sinal analítico medido (y_i) e o sinal analítico predito (\hat{y}_i), para um conjunto de N pontos experimentais (Equação 2.1).

$$Q = \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad \text{Equação 2.1}$$

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado. No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição ou do comportamento físico-químico da espécie de interesse. Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade, esta faixa é denominada faixa de aplicação

ou faixa dinâmica (SWARTZ e KRULL, 1998). A ANVISA (BRASIL. ANVISA, 2003) recomenda que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 05 concentrações diferentes.

A adequação do ajuste da curva é fornecida pelo coeficiente de correlação, r , que é a razão da covariância entre a concentração, x , e o sinal analítico, y , $((1/(N-1)) \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}))$, com o produto dos desvios padrões de x $((\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x}) / (N - 1))^{1/2})$ e y $((\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}) / (N - 1))^{1/2})$, conforme descrito na Equação 2.2. O coeficiente de correlação apresenta uma faixa de magnitude entre $-1 \leq r \leq 1$, sendo que quanto mais próximo de 1 ou -1, menor será o erro em y e, portanto, melhor será o ajuste da função matemática escolhida à curva de calibração. Uma relação não linear entre x e y resultará em um valor relativamente pequeno.

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{(\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2)}} \quad \text{Equação 2.2}$$

No entanto, apenas o valor do coeficiente de correlação não é suficiente para garantir a adequação do ajuste linear à curva de calibração. Modelos de calibração com alto resíduo no sinal analítico ou pontos mal distribuídos ao longo da faixa de calibração poderão fornecer um bom coeficiente de correlação, mesmo que uma função linear não seja a melhor descrição para o comportamento entre as variáveis dependente e independente. Para evitar problemas de falta de ajuste durante a modelagem, faz-se necessária a análise cuidadosa do gráfico dos resíduos do sinal analítico e a aplicação de testes como, por exemplo, a análise de variância (ANOVA), para determinar a faixa na qual a curva de calibração apresenta um comportamento linear.

Na análise do gráfico dos resíduos, podem ser detectados problemas no ajuste da curva como, por exemplo, desvios da linearidade, presença de amostras atípicas, heteroscedasticidade e dependência entre os erros. Uma curva bem ajustada deverá apresentar erros com distribuição uniforme, média zero e variância constante (homoscedasticidade), e ausência de amostras atípicas (BARROS, PIMENTEL e ARAUJO, 2002).

A análise de variância (ANOVA) é uma ferramenta estatística importante para distinguir as diversas contribuições sobre a variância total observada. A ANOVA permite distinguir dentro da variabilidade total de diversos conjuntos de valores experimentais as contribuições puramente aleatórias e a contribuição sistemática entre amostras. Deste modo permite verificar se as amostras (ou fatores) exercem um efeito significativo fazendo com que estes se sobreponham à componente aleatória contribuindo para diferenças significativas entre si.

Em validação, a quantificação pode ser obtida através de diversas maneiras tais como, padronização externa, padronização interna, superposição de matriz e adição de padrão. Neste trabalho foi utilizado o método da padronização externa. Este método compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentrações preparadas a partir de um padrão. Preparam-se soluções da substância a ser quantificada em diversas concentrações e daí obtêm-se o cromatograma correspondente a cada uma destas soluções. Um gráfico é gerado relacionando as áreas obtidas com as concentrações e a curva resultante é utilizada para calcular a concentração desta substância na amostra (RIBANI *et al.*, 2004).

2.7.3 – Limite de detecção e limite de quantificação

A ANVISA define Limite de Detecção (LD) como sendo a menor quantidade de um analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas pelo método utilizado ou proposto. O LD é calculado por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável. Pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído e o método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004). No caso do cálculo baseado em parâmetros da curva analítica, utiliza-se a seguinte equação:

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad \text{Equação 2.3}$$

em que DP_a é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas, contendo concentrações do analito, próximas ao suposto limite de quantificação, e IC é a inclinação da curva analítica.

Para o Limite de Quantificação (LQ), a ANVISA (BRASIL. ANVISA, 2003) define como sendo a menor quantidade do analito em uma amostra, que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas para o método proposto. As formas de determinação para o LQ são idênticas ao LD, mencionadas acima, diferenciando apenas a equação utilizada.

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC} \quad \text{Equação 2.4}$$

2.7.4 – Precisão

A precisão reflete a concordância entre as análises de uma amostra ou solução padrão de um analito. Essa concordância deve considerar valores experimentais de ensaios repetidos e

independentes de amostras ou padrões, sob condições pré-definidas. Em cromatografia, a precisão é apresentada de três formas diferentes:

a) Como repetibilidade (ou precisão intra-dia): corresponde à concordância entre os resultados num mesmo dia, dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista, mesma instrumentação e mesmo laboratório.

b) Precisão intermediária (ou precisão inter-dia): corresponde à concordância entre os resultados obtidos em dias diferentes com intervalo de dois dias, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes, porém no mesmo laboratório (BRASIL. ANVISA, 2003; RIBANI *et al*, 2004).

c) Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes, como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica.

Em todos os três casos, a precisão é normalmente expressa como coeficiente de variação (CV). A fórmula utilizada é a seguinte:

$$C_v = 100 \times \frac{S}{\bar{X}} \quad \text{Equação 2.5}$$

em que, C_v é o coeficiente de variação, S é o desvio padrão e \bar{X} é a média dos resultados das análises.

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores de CV maiores de 20 % (BRASIL. INMETRO, 2003).

2.7.5 – Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. São vários os processos utilizados para avaliar a exatidão, como por exemplo, aqueles que usam materiais de referência, ensaios de recuperação, adição de padrão e comparação de métodos. A escolha de um destes métodos vai depender da natureza da amostra ou analito a ser analisado (RIBANI *et al*, 2004). No caso da avaliação da exatidão através de ensaios de recuperação, sabe-se que a recuperação está diretamente relacionada com a exatidão porque indica a quantidade de um ou mais analitos recuperados no processo, em relação à quantidade real contida na amostra.

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, da faixa dinâmica e da seletividade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 09 determinações contemplando a faixa dinâmica do procedimento, ou seja, três concentrações,

baixa, média e alta (BRASIL. ANVISA, 2003). A exatidão é expressa através da relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad \text{Equação 2.6}$$

A porcentagem de recuperação é calculada de acordo com a Equação 2.7.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{quantidade obtida (conc.ou massa)}}{\text{quantidade adicionada}} \times 100 \quad \text{Equação 2.7}$$

Para análise de compostos em concentrações-traço, os intervalos de recuperação aceitáveis estão entre 70 e 120 %, com precisão de até ± 20 % (RIBANI *et al*, 2004).

2.7.6 – Estabilidade

Estabilidade é o parâmetro que visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado, numa dada matriz, sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo. No caso da estabilidade, alguns parâmetros como exatidão, precisão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, especificidade, limite de variação e robustez devem ser previamente observados e validados. Uma vez determinada para um tipo de matriz, esta estabilidade não pode ser extrapolada para demais tipos de matriz (RIBANI *et al*, 2004).

Deve ser avaliada a estabilidade do analito durante a coleta e manuseio da amostra, após armazenagem de longa duração (congelamento) e curta duração (à temperatura ambiente), após ciclos de congelamento e descongelamento e nas condições de análise. Além disso, deve-se incluir também avaliação da estabilidade do analito nas soluções-padrão, preparadas com solvente apropriado em concentrações conhecidas. Estes resultados devem ser comparados e as amostras e padrões serão considerados estáveis quando não se observar desvio superior a 15% do valor obtido das amostras e soluções recém-preparadas. (BRASIL. ANVISA, 2003; RIBANI *et al*, 2004; BRASIL. INMETRO, 2003).

MATERIAIS E MÉTODOS

PRIMEIRA ETAPA: DESENVOLVIMENTO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS

3 - Materiais e Métodos

3.1 Materiais e reagentes

Os solventes acetonitrila, metanol e ácido acético, empregados nas técnicas de extração em fase sólida e cromatográfica, foram da marca J.T. Baker e de grau HPLC. A acetona, de pureza analítica (P.A.), utilizada na limpeza das vidrarias foi da marca Synth. O detergente usado para lavagem das vidrarias foi o Extran alcalino 8%, da Sigma-Aldrich. Os padrões analíticos dos estrógenos, 17 β -estradiol, estrona, 17 α -etinilestradiol e estriol e dos fitoestrógenos, biochanin A, daidizeína, genisteína, genistina, daidizina e formononetina, foram da Sigma-Aldrich e todos com 99% de pureza. Em todas as etapas de limpeza de vidrarias, extração e pré-concentração das amostras e corrida cromatográfica utilizou-se água deionizada em sistema Milli-Q da Milipore. Demais materiais utilizados na etapa de extração em fase sólida e na etapa de análise por HPLC serão descritos posteriormente.

3.2 – Limpeza das vidrarias

Todas as vidrarias utilizadas na coleta das amostras e demais procedimentos cromatográficos e de preparo de amostras foram lavadas inicialmente com detergente e água. Após essa lavagem inicial, foram deixadas submersas, por 24 horas, numa solução de limpeza, utilizando um detergente específico (alquil benzeno sulfonato de cadeia linear e com baixa concentração). Passado este tempo, as vidrarias foram enxaguadas com água deionizada e lavadas com acetona e aquelas que não eram volumétricas foram submetidas à alta temperatura (aproximadamente 200°C) por, aproximadamente, 6 horas (dependendo do tamanho da vidraria) em estufa para secagem e eliminação de possíveis resíduos orgânicos.

3.3 – Preparação das soluções

3.3.1 – *Preparação das soluções estoque e padrão*

A quantificação dos compostos de interesse nas amostras analisadas foi realizada por padronização externa. Para isso foram preparadas soluções estoque individuais de cada analito e em seguida preparou-se soluções padrão mistas, denominadas de MIX, contendo os quatro analitos de interesse, para o caso dos estrógenos, e os seis analitos de interesse para o caso dos fitoestrógenos, em concentrações variadas, a partir de sucessivas diluições das respectivas soluções mistas. As soluções estoque individuais foram obtidas medindo-se uma massa

conhecida do padrão puro em balança analítica, da marca Shimadzu e modelo AY 220, com precisão de $\pm 0,02$ mg, e dissolvida em solvente apropriado: acetonitrila para os estrógenos e metanol para os fitoestrógenos. As soluções estoque foram transferidas, individualmente, para frascos âmbar e armazenadas a aproximadamente -25 °C, para serem utilizadas posteriormente nas preparações das soluções padrão.

Algumas informações acerca das soluções dos quatro estrógenos e os seis fitoestrógenos estão listadas na [Tabela 3.1](#). As estruturas químicas dos onze analitos foram apresentadas nas [Figuras 2.4 e 2.5](#).

Tabela 3.1 - Informações sobre os quatro estrógenos e os seis fitoestrógenos utilizados.

Composto	Número CAS	Massa molar (g mol^{-1})	Fórmula empírica	Concentração da solução estoque (mg L^{-1})	pK _a	Log K _{ow}
Estrona	53-16-7	270,37	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	500	10,3	13
17 β -estradiol	50-28-2	272,38	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	100	10,4-10,7	13
17 α - etinilestradiol	57-63-6	296,40	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	100	2,9-3,67	4,8
Estriol	50-27-1	288,38	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	100	2,45-2,6	13-32
Daidizina	552-66-9	416,38	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	200	-	-
Genistina	529-59-9	432,37	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	200	-	-
Daidizeína	486-66-8	254,24	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	200	7,5	2,51
Genisteína	446-72-0	270,24	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	200	7,4	3,04
Formononetina	485-72-3	268,26	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	200	-	-
Biochanin A	491-80-5	284,26	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	100	-	-

3.3.2 – Preparação das soluções utilizadas como fase móvel

Todos os solventes utilizados como fase móvel foram filtrados, antes de serem utilizados no cromatógrafo, em um sistema de filtração a vácuo, utilizando membranas de fibra de vidro 0,45 μm (SARTORIOUS) e desgaseificados, durante 20 minutos, em um banho ultrassônico da marca UNIQUE, modelo USC 1800A.

3.4 – Desenvolvimento da etapa de extração em fase sólida

3.4.1 – Preparo das amostras

Inicialmente o preparo das amostras foram acidificadas com ácido acético até pH 3 no momento da coleta para disponibilizar o analito para a coluna d'água e também para aumentar a afinidade destes à fase estacionária.

Antes de ser realizada a etapa de extração e concentração das amostras pelo método de SPE, realizou-se a etapa de filtração de todas das amostras, imediatamente após a realização da coleta, para remoção de possíveis partículas sólidas. Para isso, foi utilizado um sistema de filtração da marca AGILENT TECHNOLOGIES, acoplado a uma bomba de vácuo da marca MARCONI, modelo MA 053, utilizando membranas de fibra de vidro com 0,45 µm de porosidade, da marca SARTORIOUS. Algumas vezes, dependendo do tipo de amostra (local em que foi coletada) era necessária mais de uma filtração. As amostras filtradas foram acondicionadas em frascos âmbar de 1.000 ml e mantidas refrigeradas até o momento da extração. O tempo que amostras ficavam condicionadas não ultrapassava 24 horas.

3.4.2 – Otimização das condições de extração em fase sólida

Existem vários métodos descritos na literatura ([VERBINNEM et al., 2010](#); [RIBEIRO et al., 2009](#); [LOPES et al., 2010](#)) para a extração e pré-concentração dos estrógenos e dos fitoestrógenos em amostras de água superficial. Entretanto não há um método oficial para tal finalidade. Com base nas pesquisas feitas na literatura optou-se por desenvolver um método SPE para o propósito pretendido.

- **Seleção da fase extratora**

A escolha da fase extratora na SPE depende única e exclusivamente da interação do recheio do cartucho com os analitos a serem retidos, e cuja finalidade é a pré-concentração e retenção dos analitos e da matriz na qual se encontram ([LANÇAS, 2009](#)). Com base nesta informação, definiu-se que os cartuchos utilizados para o desenvolvimento do método SPE para aprisionar substâncias bastante polares como estrógenos e fitoestrógenos e subsequente aplicação em amostras de água, seriam os cartuchos de extração em fase sólida Sampliq C18 (octadecilsilano), 6 mL e 500 mg da marca Agilent Technologies.

- **Condicionamento da fase sólida**

De acordo com as recomendações do fabricante (Agilent Technologies, 2015), o condicionamento da fase extratora do cartucho SPE foi efetuado utilizando-se metanol, seguido de água deionizada, com volume de 3 mL de cada solvente, para cada cartucho.

- **Volume de amostra para extração**

Após o condicionamento, passou-se pelos cartuchos a amostra de interesse. O fluxo de amostra foi fixado em aproximadamente 2 mL min^{-1} , sendo utilizado um sistema a vácuo nesta etapa. O volume de amostra utilizada para extração e pré-concentração dos analitos estudados foi otimizada fortificando 0,25, 500 e 1.000 mL de água deionizada com os padrões de estrógenos e fitoestrógenos, separadamente.

Para os estrógenos, a fortificação foi feita com concentração final de $25,0 \mu\text{g L}^{-1}$ dos padrões e para os fitoestrógenos, utilizou-se padrões na concentração de $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ para a fortificação. As amostras fortificadas foram submetidas ao cartucho de SPE e analisadas por HPLC.

- **Limpeza da fase sólida**

Posteriormente, o cartucho SPE foi lavado com 4 mL de uma solução de Acetonitrila (ACN)/Água (10:90 v/v), passados em alíquotas de 1 mL, e seco sob vácuo por 3 minutos. Após esta etapa, os cartuchos foram envolvidos em papel alumínio e mantidos no freezer a uma temperatura de -25°C aproximadamente, até o momento da próxima etapa de SPE. No dia seguinte os cartuchos foram descongelados até temperatura ambiente. Para isso apenas retirava-se os cartuchos do congelamento e mantinha-os sobre a bancada, ainda envoltos no papel alumínio. Retirava-se o papel alumínio ao atingir a temperatura ambiente e conectava-os novamente no sistema (*manifold*) apropriado para a extração por SPE.

- **Procedimento de eluição dos analitos**

A eluição dos analitos foi efetuada utilizando uma solução metanol/água (50:50 v/v) em 3 alíquotas de 3 mL. Por fim, os eluatos, recolhidos em frascos de vidro, eram secos com fluxo brando de nitrogênio (marca WHITE MARTINS – PRAXAIR, pureza de 99%) até a secura total. Após isso, os resíduos resultantes eram re-solubilizados em 350 μL de solvente apropriado: acetonitrila para os estrógenos e metanol para os fitoestrógenos.

Ao final da etapa de SPE, foi obtido fator de concentração de 2.857 vezes, que corresponde à tomada inicial de 1.000 mL de amostra e redissolução no final do extraído em 350 µL de um solvente apropriado. Todas as amostras foram extraídas em triplicata.

- **Preparo das amostras para análise por cromatografia líquida de alta eficiência**

Antes de submeter amostras à análise por HPLC, as soluções eram filtradas em filtros-seringa com 0,22 µm de porosidade para evitar qualquer obstrução na coluna cromatográfica, pré-coluna, ou até mesmo tubulações do cromatógrafo. Em seguida eram armazenadas em frascos âmbar para proteger da luz e evitar possíveis degradações dos analitos.

3.5 – Análises por cromatografia líquida de alta eficiência

Nas etapas de otimização e validação analítica foram criados dois métodos cromatográficos, sendo um para os estrógenos – definido como HPLC-FLU e outro para os fitoestrógenos – definido como HPLC-DAD. Nesta etapa foram estudadas as melhores condições químicas e físicas de análise cromatográficas, utilizada para os dois métodos propostos.

Para definir as condições cromatográficas, partiu-se de métodos já publicados na literatura científica (GIESE, 2003; GHISELLI, 2006; CÉSAR, 2008; VERBINNEN, 2010; ALVES 2010; CANAVER, 2012) e observações experimentais, até se chegar a métodos os quais possibilitassem a identificação e quantificação dos compostos de interesse deste trabalho. Procedeu-se desta forma, em busca de tal método, pelo fato de não existir um procedimento oficial padrão, para a análise de interferentes endócrinos em amostras de água superficial.

A determinação dos compostos foi realizada por um equipamento para HPLC, marca DIONEX, modelo *ultimate* 3000, equipado com bomba quaternária, modelo LPG-3400SD, um compartimento de coluna, modelo TCC – 3000SD o qual suporta temperaturas de até 50°C, e dois detectores, um fotômetro, modelo DAD – 3000, que opera com arranjo de fotodiodos e um fluorímetro DIONEX, modelo RF 2000, que trabalha com uma lâmpada de arco de xenônio. O injetor deste equipamento é manual, com uma válvula do tipo *six-way* e alça de amostragem fixa em 20 µL.

Para injeção manual dos padrões e amostras foi utilizada uma seringa apropriada, da marca HAMILTON.

3.5.1 – Otimização das condições cromatográficas

3.5.1.1 – Escolha do tipo de detector

Para a adequação do tipo de detecção por analito foi pesquisado na literatura alguns trabalhos (CÉSAR, 2008; RIBEIRO, 2009; ALVES, 2010; YATSU, 2014; NOGUEIRA 2015; WU, 2015, CANAVER, 2012) relacionados com a análise dos quatro estrógenos estudados: estrona, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, e estriol, e os seis fitoestrógenos: daidizina, genistina, daidizeína, genistéina, formononetina e biochanin A. O modo de detecção foi estabelecido avaliando a melhor resposta (intensidade) cromatográfica de cada analito.

No método HPLC-DAD, os comprimentos de onda de máxima absorção de cada fitoestrógeno foram estabelecidos a partir de varredura espectral na faixa de 190 a 800 nm utilizando o detector de arranjo de fotodiodos. Para o método HPLC-FLU, os comprimentos de onda excitação e emissão foram estabelecidos de acordo com informações da literatura correlata (CANAVER, 2012; LIZ, 2013; KUMAR, 2014).

3.5.1.2 – A fase móvel

A escolha da fase móvel na análise cromatográfica envolve alguns fatores, que são determinantes para uma resposta analítica adequada. A afinidade que a fase móvel apresenta com os analitos de interesse e, a compatibilidade da coluna com o solvente escolhido é alguns destes fatores. A fase móvel foi avaliada em relação ao tipo de solvente, na tentativa de se encontrar a fase móvel que apresentasse a melhor resposta para a maioria dos analitos, sendo avaliados, em ambos os métodos, duas combinações de solventes, água e metanol e água e acetonitrila.

Para o método HPLC-FLU, foi observada a separação cromatográfica dos analitos em uma mistura de quatro estrógenos com concentração de 0,10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para estriol, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol e 5,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ para estrona.

Para o método HPLC-DAD, foi observado a separação cromatográfica dos analitos em uma mistura dos seis fitoestrógenos na concentração de 20,0 mg L^{-1} .

3.5.1.3 – Vazão, temperatura e pH da fase móvel

As condições experimentais de vazão e temperatura eleitas para compor os procedimentos analíticos de ambos os métodos HPLC-FLU e HPLC-DAD foram estabelecidos em função das respostas intensidade, resolução, área e largura de pico cromatográfico.

Um planejamento fatorial completo 2^3 mais quatro pontos centrais foi utilizado para a escolha dos parâmetros cromatográficos. Na [Tabela 3.2](#) estão listados os dozes experimentos não codificados para os três parâmetros avaliados (vazão, temperatura e pH). O mesmo planejamento foi realizado tanto para a metodologia dos estrógenos como a dos fitoestrógenos, alterando as variáveis definidas para cada experimento.

Tabela 3.2 - Planejamento experimental realizado para definição dos parâmetros de análise cromatográfico: vazão, temperatura e pH da fase móvel.

Experimento	Vazão (mL min ⁻¹)	Temperatura (°C)	pH
1	0,8	27	3,0
2	1,2	27	3,0
3	0,8	33	3,0
4	1,2	33	3,0
5	0,8	27	não acidificado
6	1,2	27	não acidificado
7	0,8	33	não acidificado
8	1,2	33	não acidificado
9	1	30	3,0
10	1	30	3,0
11	1	30	não acidificado
12	1	30	não acidificado

A vazão da fase móvel variou de 0,8 a 1,2 mL min⁻¹, com o intuito de minimizar o tempo da corrida cromatográfica bem como o descarte de solventes orgânicos, sem comprometimento da resolução. Já a temperatura variou de 27 a 33 °C, no forno cromatográfico em ambos os métodos desenvolvidos.

Também se avaliou a necessidade de acidificação da fase móvel. Para tal, foi escolhido o ácido acético, mantendo na adição dos ácidos o pH ajustado em 3,0, conforme sugerido por outros autores ([GIROTTO et al, 2007](#); [MOREIRA, 2008](#)).

3.5.1.4 – Modo de eluição

Em seguida verificaram-se as condições de análise em relação ao modo da corrida, sendo avaliados vários modos de corrida tanto o modo gradiente como o modo isocrático. As composições das fases móveis e os diferentes modos de eluição para o método HPLC-FLU e HPCL-DAD estão listados nas Tabelas 3.3 e 3.4, respectivamente.

Tabela 3.3 - Diferentes programas de eluição testados para o método HLPC-FLU.

Fase Móvel	Vazão (mL min ⁻¹)	Tipo de eluição	Programa de eluição		
			Tempo (min)	ACN (%)	H ₂ O (%)
ACN/H ₂ O	1,0	Isocrático	25	30	70
ACN/H ₂ O	1,0	Isocrático	20	40	60
ACN/H ₂ O	1,0	Isocrático	15	50	50
ACN/H ₂ O	1,0	Gradiente	5	10	90
			15	50	50
			17	54	44
			18	100	0
			20	10	90
ACN/H ₂ O	1,0	Gradiente	9	10	90
			11	50	50
			19	60	40
			20	10	90

Tabela 3.4 - Diferentes programas de eluição testados para o método HLPC-DAD.

Fase Móvel	Vazão (ml/min)	Tipo de eluição	Programa de eluição		
			Tempo (min)	MeOH (%)	H ₂ O (%)
MeOH/ H ₂ O	1,0	Isocrático	35	30	70
MeOH/ H ₂ O	1,0	Isocrático	30	60	40
MeOH/ H ₂ O	1,0	Isocrático	25	50	50
MeOH/ H ₂ O	1,0	Gradiente	10	05	95
			15	65	35
			20	100	0
			25	05	95
MeOH/ H ₂ O	1,0	Gradiente	10	15	85
			15	20	80
			20	100	0
			25	15	85

3.5.1.5 – A fase estacionária

As fases estacionárias mais utilizadas na HPLC para separação de compostos orgânicos, como os interferentes endócrinos, são do tipo fase reversa com base de sílica (grupos C18). Com base nesta informação, definiu que a coluna utilizada no desenvolvimento dos métodos HPLC-FLU e HPLC-DAD seria uma coluna C18 de fase reversa. Foram testadas colunas nos comprimentos de 5, 10, 15 e 25 cm. Também foi utilizado uma coluna de guarda C18 de 4,0 mm de comprimento e 3,0 mm de diâmetro interno, da marca PHENOMENEX.

Para a aquisição de dados, foi utilizado o software do próprio equipamento, o Chromeleon versão 6.1 (DIONEX CA). Os cálculos e elaboração de curvas foram feitos utilizando o software Origin versão 8.0.

SEGUNDA ETAPA: VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS

3.6 – Validação dos métodos analíticos HPLC-FLU e HPLC-DAD

Na etapa de validação da metodologia analítica por HPLC foram avaliados os dois métodos cromatográficos, sendo um para os estrógenos – HPLC-FLU e outro para os fitoestrógenos – HPLC-DAD. Os parâmetros de desempenho analítico estimados para a validação foram os mesmos para ambos os métodos.

3.6.1 – Seletividade

Neste trabalho, a seletividade dos métodos foi avaliada pela comparação dos cromatogramas obtidos a partir da injeção de:

- 1) Amostra coletada no rio (testemunha);
- 2) Amostra coletada no rio e fortificada com estrógenos e fitoestrógenos separadamente, antes da extração (amostra fortificada);
- 3) Mistura dos compostos com a mesma concentração da amostra fortificada (MIX) tanto para os estrógenos, quanto para os fitoestrógenos;

Para o método HPLC-DAD, as amostras foram fortificadas com os seis fitoestrógenos nas concentrações de 20,0 mg mL⁻¹. Ainda como teste seletividade para o método HPLC-DAD, também foram comparados os espectros de absorção ultravioleta da testemunha, amostra fortificada e MIX.

3.6.2 – Linearidade e faixa de concentração

A linearidade dos métodos desenvolvidos foi avaliada através do método de padronização externa, conforme descrito na Seção 2.7.2. As concentrações das soluções de trabalho contendo os estrógenos, utilizadas para obtenção das curvas analíticas do método HPLC-FLU foram 3,12; 6,25; 12,5; 25,0; 50,0 e 100 µg L⁻¹ para 17 β-estradiol, 17 α-etinilestradiol e estriol e 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250 e 500 µg L⁻¹ para estrona. Para o método HPLC-DAD as concentrações foram 0,05; 0,25; 1,00; 5,00; 10,0 e 20,0 mg mL⁻¹ para os seis fitoestrógenos. Os ajustes das curvas/linearidade, tanto para o método HPLC-FLU como para o método HPLC-DAD foram avaliados com base nas curvas analíticas e os seus respectivos coeficientes de correlação linear (r). Um valor acima de 0,99 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (SHABIR, 2003; JENKE, 1998; GREEN, 1996; BRASIL. ANVISA, 2003)

recomenda como um critério mínimo aceitável um coeficiente igual a 0,99 e o INMETRO (BRASIL. INMETRO, 2003) um valor acima de 0,90.

3.6.3 – Limite de detecção e limite de quantificação

Neste trabalho, o LD e LQ dos métodos HPLC-FLU e HPLC-DAD propostos foram estimados com base nos parâmetros das curvas analíticas (BRASIL. ANVISA, 2003), como discutido no Capítulo 02 (Seção 2.7.3). É importante lembrar que nas estimativas de LD e LQ levou-se em conta os fatores de pré-concentração das amostras obtidos na etapa SPE.

3.6.4 – Precisão

Para avaliação da precisão foram realizados testes de repetibilidade para ambos os métodos propostos, HPLC-FLU e HPLC-DAD.

Para o método HPLC-FLU, a repetibilidade partiu de nove determinações sucessivas conforme descrito a seguir:

- a) Três determinações em solução de trabalho contendo os quatro estrógenos no nível de concentração baixo ($3,12 \mu\text{g L}^{-1}$ para 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e estriol e $0,15 \text{ mg L}^{-1}$ para estrona);
- b) Três determinações em solução de trabalho contendo os quatro estrógenos no nível de concentração intermediário ($25,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e estriol e $1,25 \text{ mg L}^{-1}$ para estrona) e;
- c) Três determinações em solução de trabalho contendo os quatro estrógenos no nível de concentração alto ($100 \mu\text{g L}^{-1}$ para 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e estriol e $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ para estrona).

Também para método HPLC-DAD, a avaliação da repetibilidade (BRASIL. ANVISA, 2003) baseou-se nos resultados de nove determinações sucessivas, as quais se referem a:

- a) Três determinações na concentração de $0,10 \text{ mg L}^{-1}$ (nível de concentração baixo) de todos os fitoestrógenos;
- b) Três determinações na concentração de $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ (nível de concentração intermediário) de todos os fitoestrógenos e;
- c) Três determinações na concentração de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ (nível de concentração alto) de todos os fitoestrógenos.

Todas as determinações foram realizadas por um mesmo analista, no mesmo instrumento, sob as mesmas condições de análise, mesmo local, em um curto intervalo de tempo.

A precisão intermediária, para ambos os métodos, foi avaliada da mesma maneira que a repetibilidade, sendo realizadas nove medidas sucessivas, pelo mesmo analista, sob as mesmas condições, no mesmo instrumento, entretanto em três dias diferentes.

3.6.5 – Exatidão

A exatidão foi avaliada através do ensaio de recuperação, conforme descrito na Seção 2.7.5. Os ensaios de recuperação foram feitos de acordo com o procedimento descrito na Seção 3.4, e em seguida as amostras foram analisadas por HPLC.

Para o método HPLC-FLU, as amostras de água foram fortificadas com soluções de trabalho (MIX) contendo os quatro estrógenos, em três níveis de concentração, sendo $3,12 \mu\text{g L}^{-1}$, $25,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (nível baixo, intermediário e alto, respectivamente) para 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol e estriol e $0,15 \text{ mg L}^{-1}$, $1,25 \text{ mg L}^{-1}$ e $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ (nível baixo, intermediário e alto, respectivamente) para a estrona.

Para o método HPLC-DAD, as amostras de água foram fortificadas com os seis fitoestrógenos, em três níveis de concentração de 0,10; 1,00 e $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ (baixo, intermediário e alto, respectivamente). Foram realizados ensaios em triplicata, nos três níveis de concentração, totalizando nove determinações.

3.6.6 – Estabilidade

A estabilidade de longa duração foi avaliada após ciclos de congelamento e descongelamento, utilizando três soluções padrão em nível baixo e três soluções padrão em nível alto concentração. Nestes ciclos, as soluções eram congeladas à -20°C (no mínimo) e mantidas por 24 horas, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Quando completamente descongeladas, eram novamente congeladas, por 12 a 24 horas e, assim sucessivamente, até contemplar os três ciclos. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos das análises das soluções recém-preparadas.

Para o caso da estabilidade de curta duração utilizou-se também três soluções padrão em nível baixo e três em nível alto de concentração, e cada uma delas foi mantida à temperatura ambiente entre 4 (quatro) a 24 (vinte e quatro) horas antes das análises. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise das soluções recém-preparadas.

TERCEIRA ETAPA: SELEÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO E APLICAÇÃO DOS MÉTODOS VALIDADOS COM AMOSTRAS REAIS

Após definição da área de estudo e dos pontos em que seriam coletadas as amostras de água, foram realizadas 03 campanhas amostrais a fim de se obter amostras de água superficial para que se fosse possível quantificar os contaminantes estudados, nestas amostras de água.

3.7 – Seleção da área de estudo

Ao longo do Rio Cuiá observa-se um acelerado processo de retirada da vegetação natural e, aumento de áreas com ocupação urbana. Esta ocupação iniciou-se para atividades socioeconômicas, referentes à pastagem e agricultura, a partir do estabelecimento de granjas e sítios e, posteriormente, surgiram os primeiros conjuntos habitacionais. A [Figura 3.1](#) apresenta um mapa da cidade de João Pessoa-PB sinalizando, dentre outros, os recursos hídricos da cidade com destaque para bacia do Rio Cuiá.



Figura 3.1 – Mapa da cidade de João Pessoa-PB, com destaques das áreas ambientais desde parques, zonas de preservação e recursos hídricos principalmente da bacia do Rio Cuiá. (Retirado e adaptado de <http://www.joaopessoahistorica.com/2011/05/croquis-de-joao-pessoa.html>).

Nesse trecho foram selecionados cinco pontos de coleta localizados tanto à montante e à jusante, quanto na zona de mistura do lançamento da Estação de Tratamento de Esgotos de Mangabeira (ETE-Mangabeira). Os pontos de coleta P1, P2, P3, P4 e P5 foram georreferenciados utilizando um aparelho GPS (do inglês: *Geographic Position Satelit - GPS*) conforme apresentado na [Tabela 3.5](#).

Tabela 3.5 - Localização, em coordenadas geográfica, dos pontos de coleta de amostras água superficial do Rio Cuiá em João Pessoa-PB.

Ponto	Localização	Coordenada Geográfica
P1	Ponto a 3,5 km montante do lançamento	7° 11' 34.88'' S e 34° 50' 49.03'' O
P2	Ponto a 1 km montante do lançamento	7° 11' 35.65'' S e 34° 50' 23.06 O
P3	Ponto de lançamento da ETE-Mangabeira (Zona de mistura)	7° 11' 32.04'' S e 34° 50' 12.62'' O
P4	Ponto a 1,5 km jusante do lançamento	7° 11' 30.14'' S e 34° 49' 46.16'' O
P5	Ponto a 3,5 km jusante do lançamento	7° 11' 57.56'' S e 34° 49' 27.40'' O

3.8 – Coleta e armazenamento das amostras

Foram realizadas três campanhas para a coleta das amostras, as quais estão especificadas na [Tabela 3.7](#). O plano amostral incluiu as coletas de amostras nos pontos citados na [Tabela 3.6](#), por um período de um ano, envolvendo períodos de seca e chuva, na região. As coletas foram realizadas sempre no início de cada mês e horário fixo de coleta entre 8 e 11 horas da manhã.

Tabela 3.6 - Informações das campanhas amostrais realizadas.

Campanhas	Data	Período de Chuva	Pontos de amostragem
1°	Abril/13	sim	P1 a P3 e P5
2°	Julho/13	sim	P1 a P5
3°	Dezembro/13	não	P1 a P3 e P5

Em cada ponto de coleta do Rio Cuiá eram coletados 12 litros de água, divididos em 3 (três) frascos âmbar de quatro litros, para a realização das medidas em triplicata. As amostras eram acidificadas a pH próximo de 3, no próprio local de coleta, com ácido acético glacial grau HPLC. Em seguida eram armazenadas em caixa de isopor, com gelo, até o momento da realização da etapa de filtração e extração em fase sólida. O período de armazenamento das amostras no isopor com gelo era de aproximadamente duas horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 – Resultados e Discussão

Para melhor compreensão, este capítulo está dividido em três seções: Desenvolvimento dos métodos analíticos; Validação dos métodos analíticos e; Aplicação dos métodos analíticos em amostras reais.

PRIMEIRA ETAPA: DESENVOLVIMENTO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS

4.1 – Otimização das condições para a fase extratora

- **Estudo de saturação da fase extratora**

Testes realizados para diferentes volumes de amostra (250, 500 e 1.000 mL) a ser utilizado no procedimento de extração/pré-concentração resultaram em recuperações dos analitos entre 90 e 114%, todos considerados satisfatórios. No entanto, visando alcançar menor valor de LD analítica, decidiu-se por utilizar o volume de 1.000 mL de amostra para os estudos subsequentes. O procedimento estabelecido para SPE está mostrado na [Figura 4.1](#).

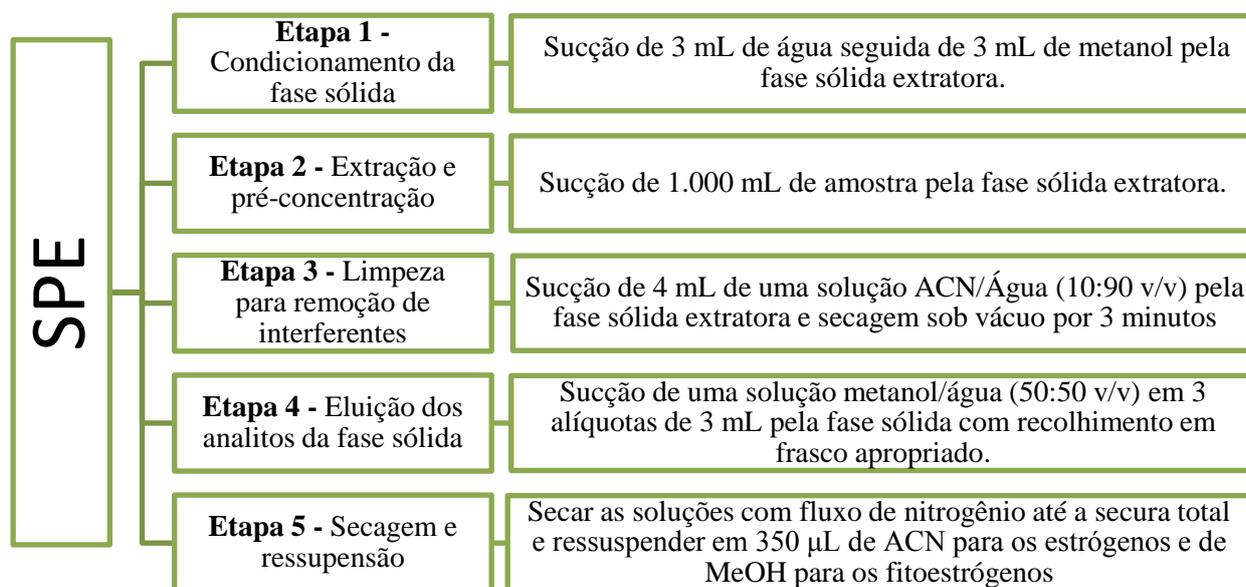


Figura 4.1- Esquema do procedimento experimental definido para SPE (Fonte: elaborada pela autora).

4.2 – Otimização das condições cromatográficas

4.2.1 – Escolha do tipo de detector

Para os estrógenos, verificou-se que, apenas o estriol apresentou resposta no detector de DAD, conforme observado no espectro em 3D de uma corrida cromatográfica utilizando um

padrão contendo os quatro estrógenos (Figura 4.2(a)). Por esse motivo optou-se em utilizar o detector FLU na determinação dos estrógenos. Sendo assim, os comprimentos de onda máximos de excitação e de emissão adotados com o método HPLC-FLU, ora desenvolvido, foram 230 e 306 nm, respectivamente. No final pode-se constatar a detecção fluorescente dos quatro estrógenos estudados (Figura 4.2(b)).

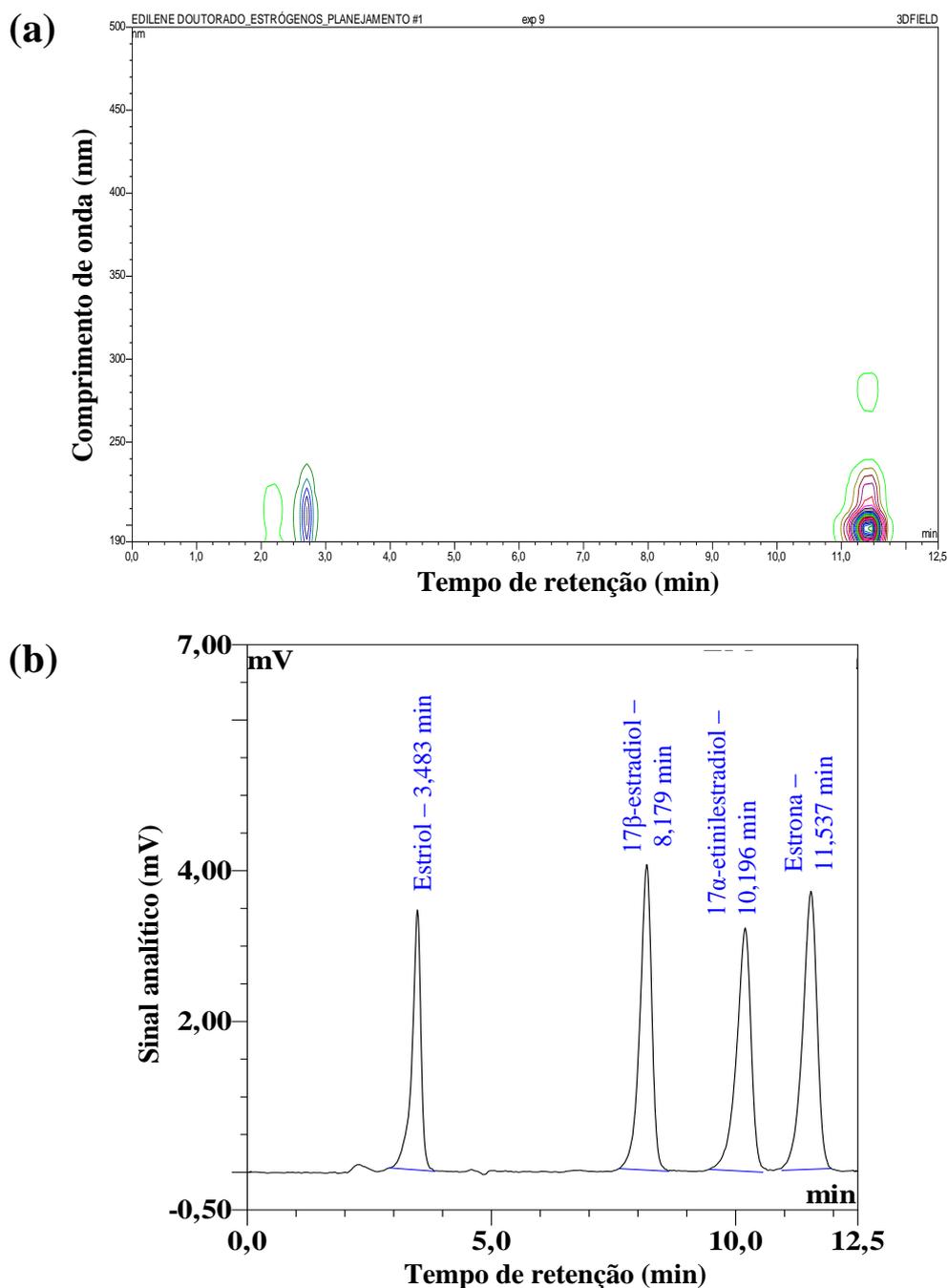


Figura 4. 2 - (a) Espectro em três dimensões registrado no detector de DAD de 190 a 500 nm e (b) cromatograma registrado com um fluorímetro com $\lambda_{\text{emissão}} = 306 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{excitação}} = 230 \text{ nm}$, ambos de uma solução de trabalho quatro estrógenos nas seguintes concentrações: estriol, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol = $0,10 \text{ mg L}^{-1}$ e estrona = $5,00 \text{ mg L}^{-1}$, empregando o método HPLC-FLU e as condições otimizadas apresentadas na Tabela 4.4 (Fonte: elaborada pela autora).

Quanto aos seis fitoestrógenos estudados, nenhum apresentou sinal fluorescente e, por este motivo, optou-se por analisá-los utilizando o detector DAD.

Os cromatogramas registrados em três dimensões para cada um dos seis fitoestrógenos estão apresentados nas Figuras A.1 a A.6, que se encontram no Apêndice A. Através destes cromatogramas foi possível definir os comprimentos de onda de máxima absorção para os seis fitoestrógenos, os quais estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - comprimentos de onda (λ) de máxima absorção para os seis fitoestrógenos.

Composto	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)
Daidizina	250,3
Genistina	260,8
Daidizeína	248,6
Genisteína	256,4
Formononetina	258,0
Biochanin A	260,1

Como se nota, são seis máximos de absorção que diferem pouco entre eles, mas que com exceção do 260 nm, apresentam linha de base instável e por isso este último foi eleito para registro dos cromatogramas no método HPLC-DAD.

4.2.2 – A fase móvel

Para o método HPLC-DAD, a combinação acetonitrila/água resultou ora em coeluição e ora em não eluição de dois dos seis fitoestrógenos estudados, conforme mostrado no cromatograma abaixo (Figura 4.3 (a)). Por isso optou-se em utilizar a combinação metanol/água, a qual revelou a separação satisfatória dos seis analitos detectados pelo método HPLC-DAD, conforme ilustrado no cromatograma da Figura 4.3 (b).

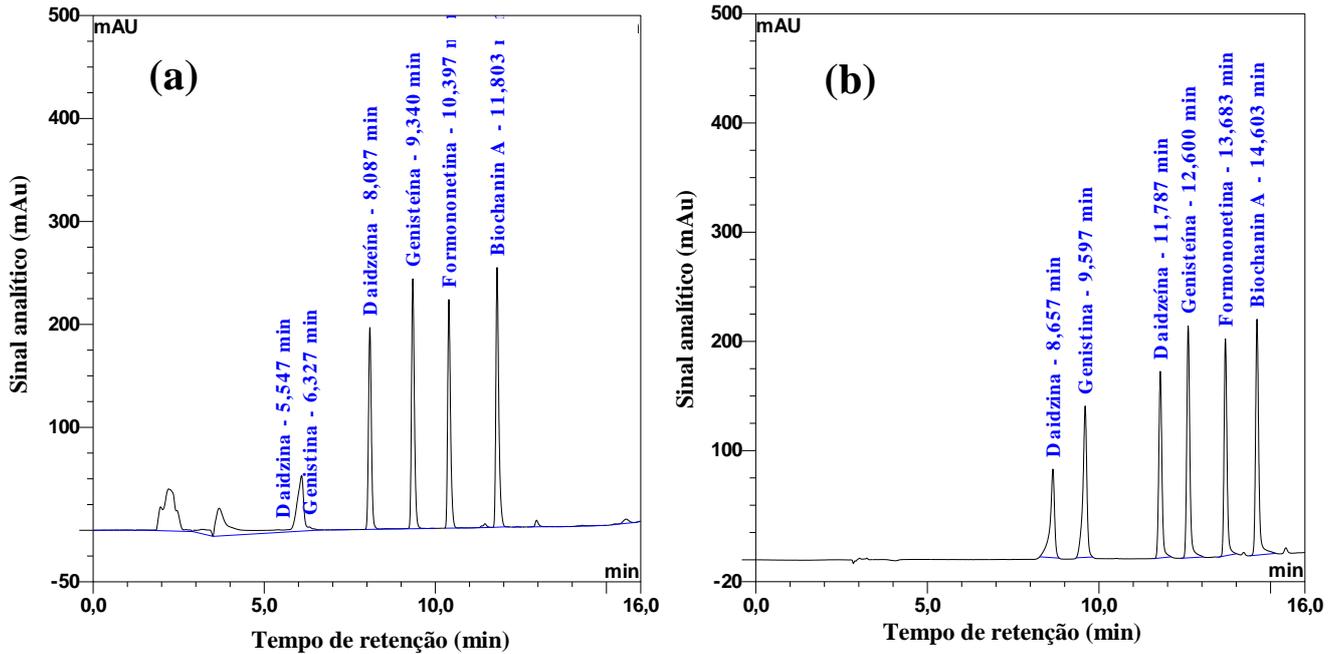


Figura 4.3 - Cromatogramas de uma solução de trabalho contendo os fitoestrógenos daidizina, genistina, daidizeína, genisteína, formononetina e biochanin A na concentração de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ obtidos pelo método HPLC-DAD com (a) fase móvel ACN/H₂O e (b) MeOH/H₂O (Fonte: elaborada pela autora).

No método HPLC-FLU, a combinação metanol/água não foi eficiente para a separação, pois ocorreu coeluição de todos os quatro estrógenos estudados pelo método proposto, como pode se observar no cromatograma da [Figura 4.4\(a\)](#). A combinação água/acetonitrila foi a que apresentou as melhores condições de respostas cromatográficas para estes analitos.

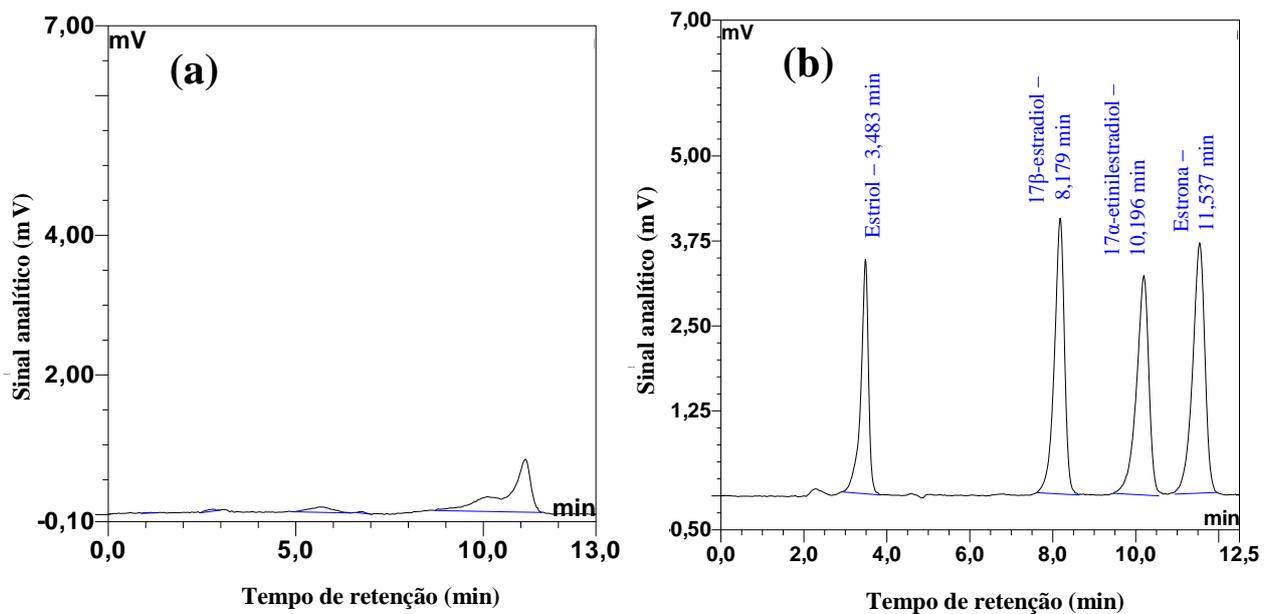


Figura 4.4 - Cromatogramas de uma solução de trabalho contendo os estrógenos nas seguintes concentrações: estriol, 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol = $0,10 \text{ mg L}^{-1}$ e estrona = $5,00 \text{ mg L}^{-1}$, registrados com o método HPLC-FLU com (a) fase móvel MeOH/H₂O e (b) ACN/H₂O (Fonte: elaborada pela autora).

4.2.3 – Vazão, temperatura e pH da fase móvel

Para avaliar os efeitos do pH, da temperatura e da vazão na amostragem dos estrógenos e fitoestrógenos, foram estudados os cromatogramas individualmente de ambos métodos HPLC-DAD e HPLC-FLU, comparando área de pico, resolução e tempo de corrida. Os resultados dos experimentos estabelecidos no planejamento fatorial 2^3 da [Tabela 3.2](#), são apresentados nos cromatogramas das [Figuras B.1 e B.2](#), no [Apêndice B](#). Nos resultados, de ambos os métodos, foi observado que:

- 1º) Os cromatogramas obtidos sem adição de ácidos apresentaram tempo de corrida cromatográfica menor, quando comparados àqueles obtidos com a fase móvel acidificada. Por outro lado, apresentaram picos com áreas menores e resolução menor e por esse motivo definiu-se então acidificar a fase móvel em pH 3.
- 2º) As vazões abaixo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ resultaram em picos mais alargados, enquanto que vazões igual ou superior $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ não apresentaram cromatogramas significativamente diferentes, dessa forma, por questões de economia de eluentes, optou-se em estabelecer a vazão em $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.
- 3º) Em relação à temperatura utilizada nas amostragens em ambos métodos, ocorreu variação na resolução e no tempo de corrida cromatográfica entre as temperaturas estudadas, porém foram variações discretas (abaixo de 3%). Dessa forma, foi estabelecida a amostragem a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, por essa ser uma temperatura similar à média encontrada nas águas superficiais estudadas.

4.2.4 – Modo de eluição

A partir da ausência ou presença de coeluição de analitos, os testes revelaram que a eluição isocrática mostrou-se eficiente para a separação dos estrógenos, não havendo necessidade de elaboração de um programa de gradiente para separá-los. O programa de eluição definido para o método HPLC-FLU está descrito na [Tabela 4.2](#).

Tabela 4.2 - Programa de eluição definido para o método HPLC-FLU.

Fase Móvel	Vazão (ml min^{-1})	Modo de eluição	Programa de eluição		
			Tempo (min)	ACN (%)	H ₂ O (%)
ACN/H ₂ O	1,0	Isocrático	15	50	50

No entanto para os fitoestrógenos do método HPLC-DAD, o modo isocrático não foi eficiente, pois neste caso ocorrem coeluições de picos conforme demonstrado no cromatograma da [Figura 4.5](#). Dessa forma, diferentes programas em modo gradiente foram testados resultando no programa de eluição descrito na [Tabela 4.3](#) que passou a ser adotado no método HPLC-DAD.

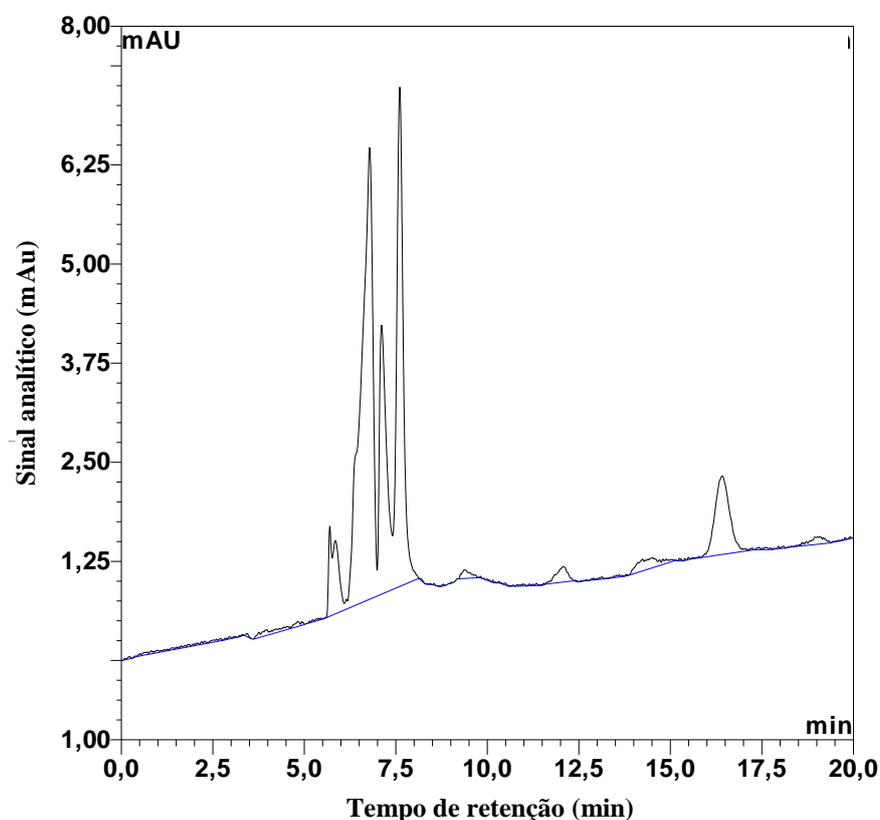


Figura 4.5 - Cromatograma de uma solução de trabalho contendo os fitoestrógenos daidizina, genistina, daidizeína, genisteína, formononetina e biochanin A, na concentração de $20,0 \text{ mg L}^{-1}$, obtido empregando uma corrida isocrática (Fonte: elaborada pela autora).

Tabela 4.3 - Programa de eluição definido para o método HPLC-DAD.

Fase Móvel	Vazão (ml min^{-1})	Tipo de eluição	Programa de eluição		
			Tempo (min)	MeOH (%)	H ₂ O (%)
MeOH/ H ₂ O	1,0	Gradiente	10	15	85
			15	20	80
			20	100	0
			25	15	85

4.2.5 – Fase Estacionária

As colunas de 10, 7,5 e 5,0 cm não apresentaram boa eficiência na separação dos analitos estudados, pois apresentaram sobreposição de picos cromatográficos. No entanto com a coluna de 25 cm (ou 250 mm) de comprimento, foi possível perceber a separação dos analitos de interesse. Dessa forma, tanto para método HPLC-FLU, quanto para o método HPLC-DAD, foi adotada a coluna de 250 mm comprimento, constituída internamente de partículas de 5 μ m e diâmetro de 4,6 mm.

O volume de injeção manteve-se constante e igual a 20 μ L em todas as medidas, pois a alça de amostragem do equipamento é fabricada neste volume.

As melhores condições cromatográficas de separação e quantificação de estrógenos e fitoestrógenos, usando os métodos HPLC-DAD e HPLC-FLU, estão apresentadas de forma resumida na [Tabela 4.4](#).

Tabela 4.4 - Resumo das condições otimizadas dos métodos HPLC-FLU e HPLC-DAD

Condições Cromatográficas	Método HPLC-FLU	Método HPLC-DAD
Tipo de detector	FLU	DAD
Comprimento de onda de excitação e emissão	230 e 306 nm	-
Comprimento de onda de detecção	-	260 nm
Fase móvel	ACN/H ₂ O	MeOH/ H ₂ O
Vazão	1,0 mL.min ⁻¹ para ambos	
Modo de eluição	Isocrático	Gradiente
Temperatura	30 °C para ambos	
Coluna	C18: 250 mm x 4,6 mm x 5 μ m	
Volume de injeção	20 μ L para ambos	

Na [Figura 4.6](#) é apresentado um cromatograma de uma solução de trabalho contendo os quatro estrógenos (MIX) nas seguintes concentrações: estriol, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol = 0,10 mg mL⁻¹ e estrona = 5,00 mg mL⁻¹, empregando o método HPLC-FLU e as condições otimizadas apresentadas na [Tabela 4.4](#). Nesse mesmo cromatograma é possível observar a separação dos quatro estrógenos em um tempo total de corrida cromatográfica de 12,5 minutos.

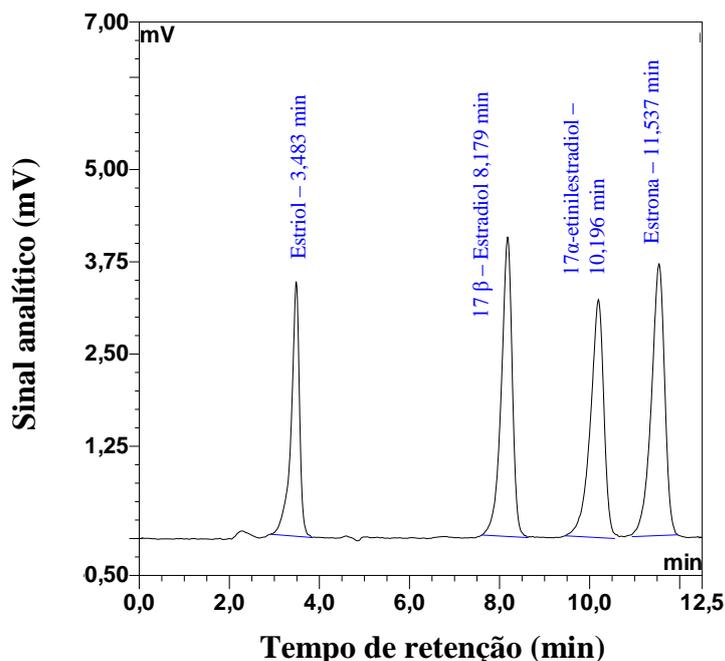


Figura 4. 6 - Cromatograma de uma solução de trabalho quatro estrógenos nas seguintes concentrações: estriol, 17 β -estradiol e 17 α -etiilestradiol = 0,10 mg L⁻¹ e estrona = 5,00 mg L⁻¹, obtido empregando o método HPLC-FLU e as condições otimizadas. Tempos de retenção são indicados em cada pico. (Fonte: elaborada pela autora).

Na [Figura 4.7](#) é apresentado um cromatograma de uma solução de trabalho contendo os seis fitoestrógenos na concentração de 20,0 mg mL⁻¹, empregando o método HPLC-DAD e as condições otimizadas apresentadas na [Tabela 4.4](#). Nesse mesmo cromatograma é possível observar a separação dos seis fitoestrógenos, sem sobreposições dos picos. Além disso, a resolução foi de 3,84 a 9,85 para uma corrida cromatográfica de 20 minutos.

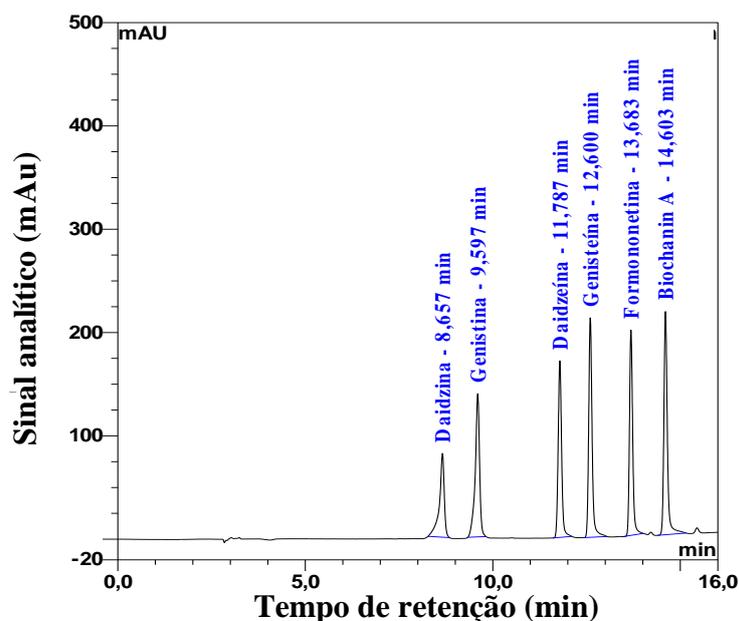


Figura 4. 7- Cromatograma de uma solução de trabalho contendo os fitoestrógenos daidzina, genistina, daidzeína, genisteína, formononetina e biochanin A na concentração de 20,0 mg L⁻¹, obtido empregando o método HPLC-DAD e as condições otimizadas. Tempos de retenção são indicados em cada pico. (Fonte: elaborada pela autora).

SEGUNDA ETAPA: VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS

A validação analítica, que foi adotada no presente estudo, baseou-se nos parâmetros analíticos mencionados e detalhados na seção 2.7.2. Nesta seção os resultados da validação dos métodos HPLC-FLU para os estrógenos e HPLC-DAD para os fitoestrógenos serão apresentados simultaneamente.

4.3 – Seletividade

Os resultados dos testes de seletividade do método HPLC-FLU estão apresentados nos cromatogramas da [Figura 4.8](#) e do método HPLC-DAD estão apresentados [Figura 4.9](#).

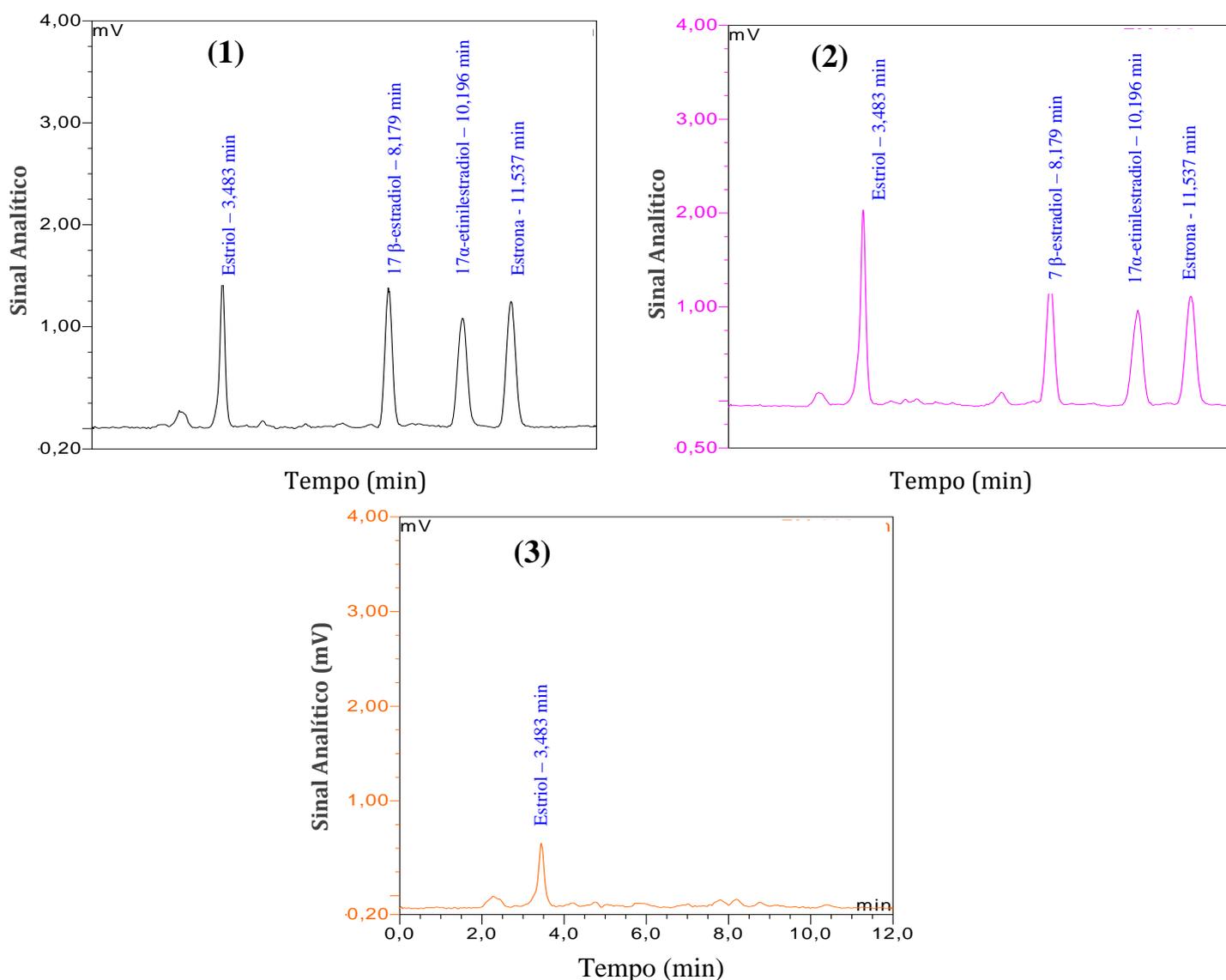


Figura 4.8 - Cromatogramas de: (1) mistura padrão de concentração intermediária dos quatro estrógenos ($25,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para estriol, 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol e $1,25 \text{ mg L}^{-1}$ para estrona), (2) de uma amostra testemunha, coletada no ponto P1 e fortificada no nível de concentração intermediária ($25,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para estriol, 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol e $1,25 \text{ mg L}^{-1}$ para estrona) e (3) uma amostra testemunha, coletada no ponto P1 sem fortificação. Todos os cromatogramas foram registrados por HPLC-FLU (Fonte: elaborada pela autora).

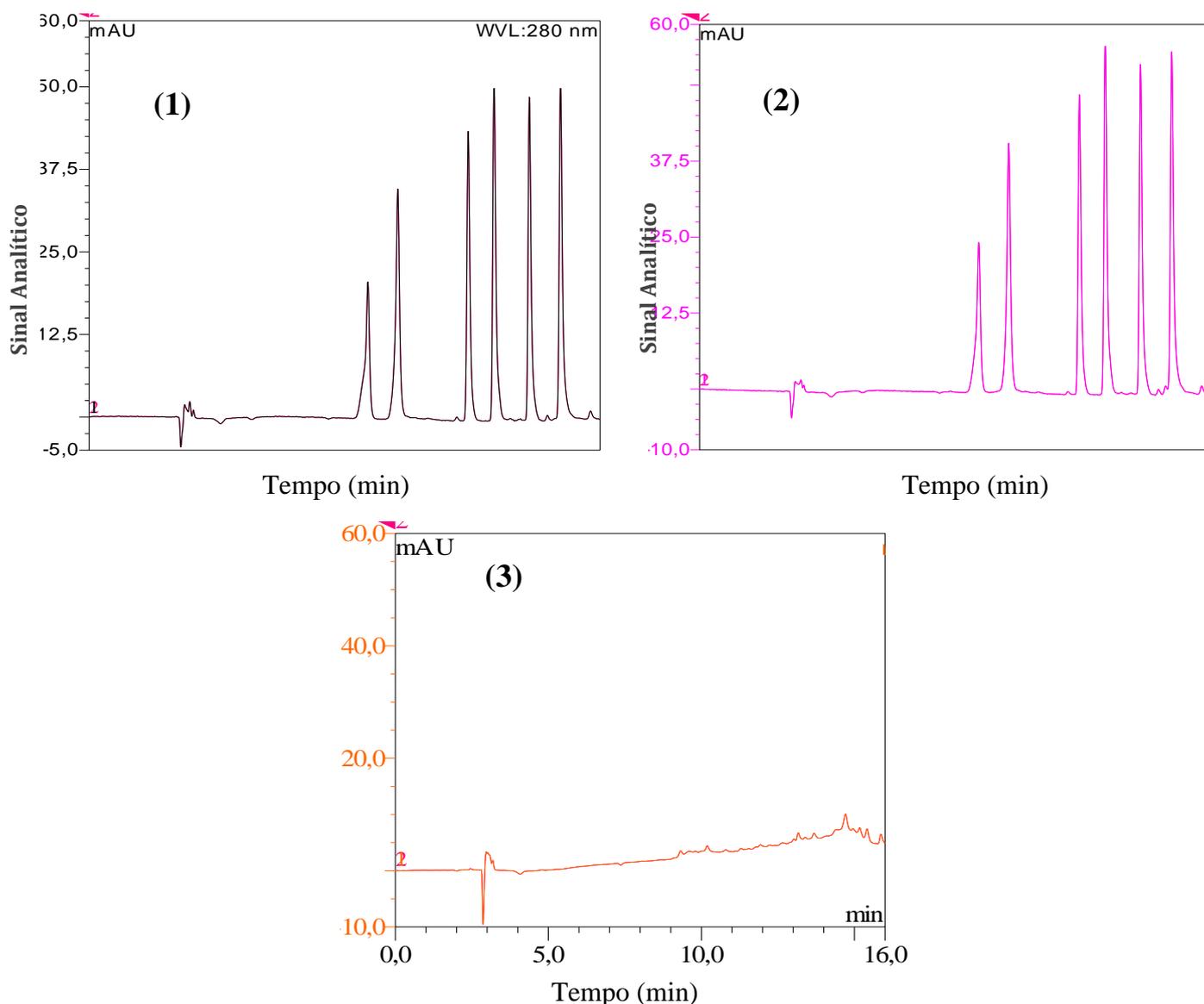


Figura 4.9 - Cromatogramas de: (1) mistura padrão dos fitoestrógenos daidizina, genistina, daidizeína, genisteína, formononetina e biochanin A, de concentração intermediária ($1,00 \text{ mg L}^{-1}$), (2) de uma amostra testemunha, coletada no ponto P1 e fortificada no nível de concentração intermediária ($1,00 \text{ mg L}^{-1}$) e; (3) de uma amostra testemunha, coletada no ponto P1 sem ser fortificada. Todos os cromatogramas foram registrados por HPLC-DAD (Fonte: elaborada pela autora).

Observando os cromatogramas da [Figura 4.8](#) e relacionando os valores das áreas e os tempos de retenção, pode-se dizer que não há evidências de substâncias interferentes junto aos picos dos quatro estrógenos. Isso pode ser atribuído à seletividade da técnica de detecção fluorescente que explora a pouca possibilidade de mais de uma molécula se excitar com o mesmo comprimento de onda de excitação e fluorescer no mesmo comprimento de onda de emissão ([HOLLER et al., 2009](#)). Resultados são similares àqueles obtidos por outros trabalhos ([DALLEGRAVE, 2012](#)) também envolvendo amostras de águas superficiais e efluente urbanos utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Com isso, tem-se a

indicação de suficiente seletividade do método HPLC-FLU, para distinguir os analitos dos componentes interferentes da matriz.

A análise dos cromatogramas mostrados na Figura 4.9, também demonstrou elevada seletividade do método HPLC-DAD para os seis fitoestrógenos frente a possíveis interferentes. Para comprovar essa seletividade, foi obtido e examinado um espectro de absorção molecular entre 120 e 400 nm para cada um dos seis fitoestrógenos numa corrida cromatográfica. Tais espectros de absorção são apresentados na Figura 4.10 e na Figura 4.11 onde se constata a similaridade entre as bandas de absorção de um fitoestrógeno, tanto numa solução padrão (linha rosa), quanto numa testemunha fortificada (linha azul).

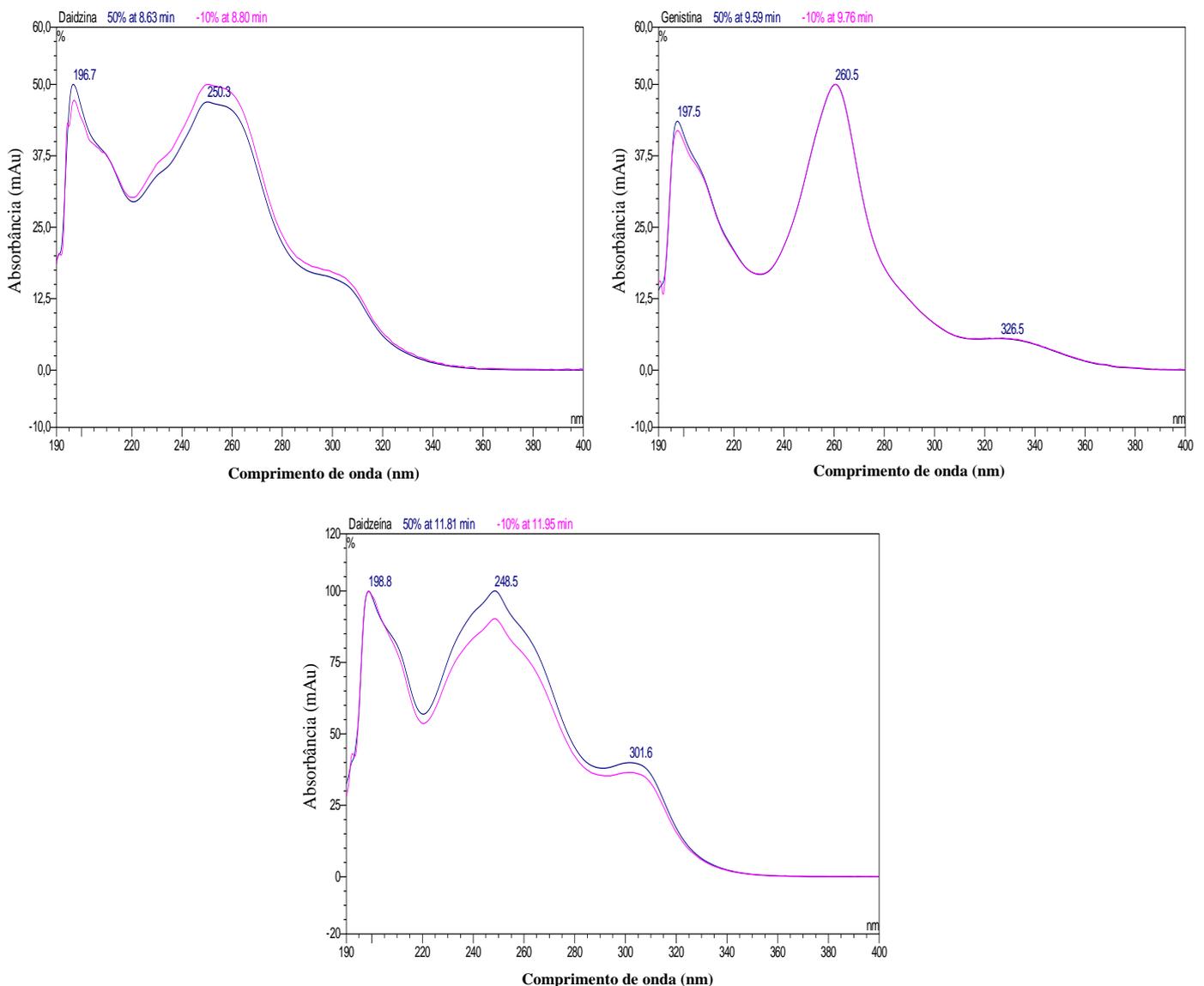


Figura 4. 10 - Espectros de absorção molecular UV-Vis obtidos em corrida cromatográfica de: (1) daidizina; (2) genistina e; (3) daidzeína em (—) padrão de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ e em (—) amostra testemunha fortificada a $10,0 \text{ mg L}^{-1}$. (Fonte: elaborada pela autora).

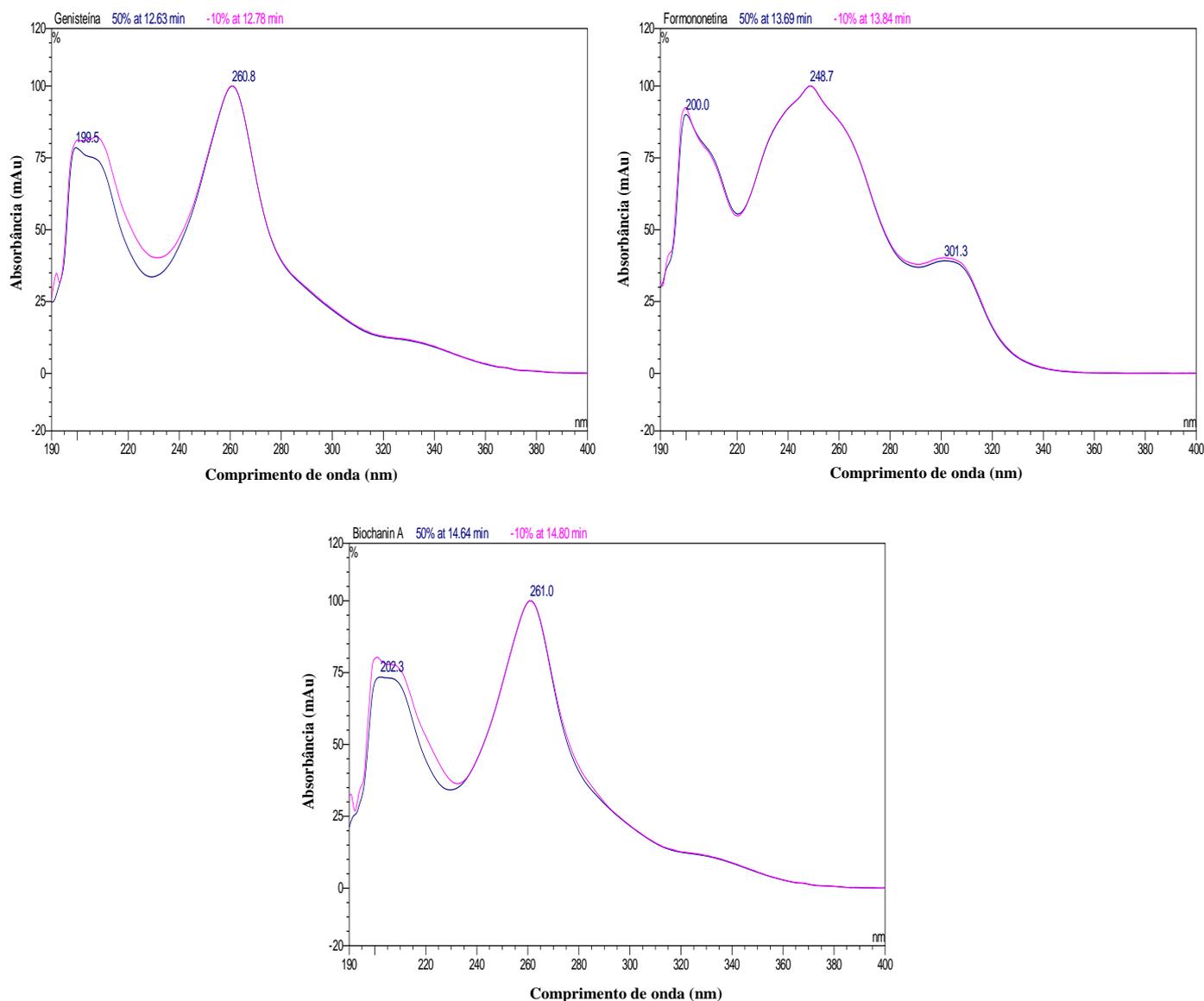


Figura 4.11 - Espectros de absorção molecular UV-Vis obtidos em corrida cromatográfica de: (1) genisteína; (2) formononetina e; (3) biochanin A em (—) padrão de 10,0 mg L⁻¹ e em (—) amostra testemunha fortificada a 10,0 mg L⁻¹. (Fonte: elaborada pela autora).

Note-se também que para cada um dos seis espectros, a seletividade do método HPLC-DAD também resulta da clara ausência de bandas de absorção interferentes.

4.4 – Linearidade e faixa dinâmica

As curvas analíticas dos quatro estrógenos (estriol, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e estrona) e dos seis fitoestrógenos (daidizeína, genisteína, daidizina, genistina, formononetina e biochanin A), foram obtidas a partir de modelos de calibração relacionando a concentração dos

compostos estudados e as áreas dos picos cromatográficos. Tais curvas analíticas estão apresentadas nas Figuras 4.12 e 4.13, respectivamente.

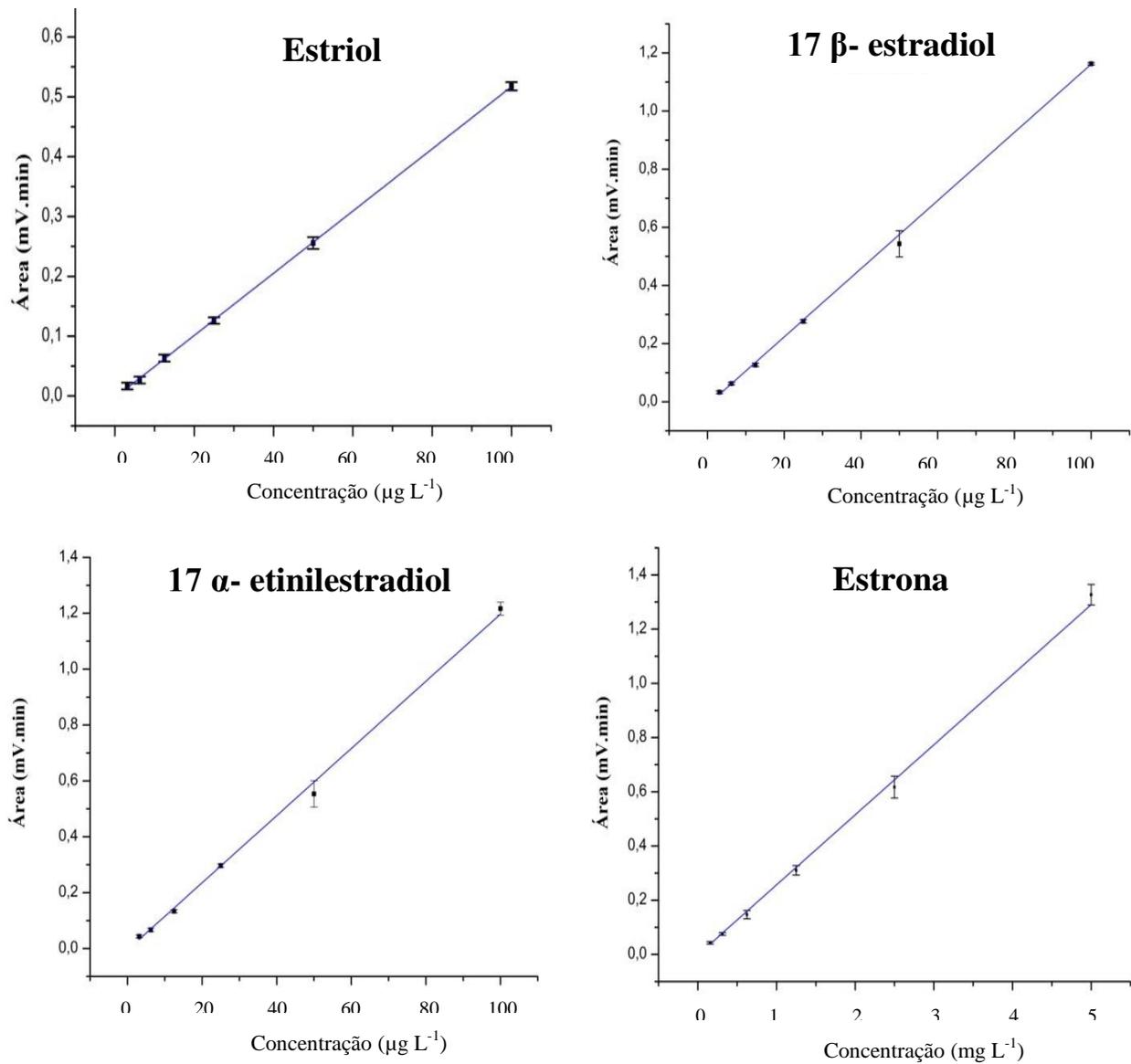


Figura 4. 12 - Curvas analíticas obtidas para os quatro estrógenos na faixa de concentração de 3,12 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e estrona e 15,6 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para estriol (Fonte: elaborada pela autora).

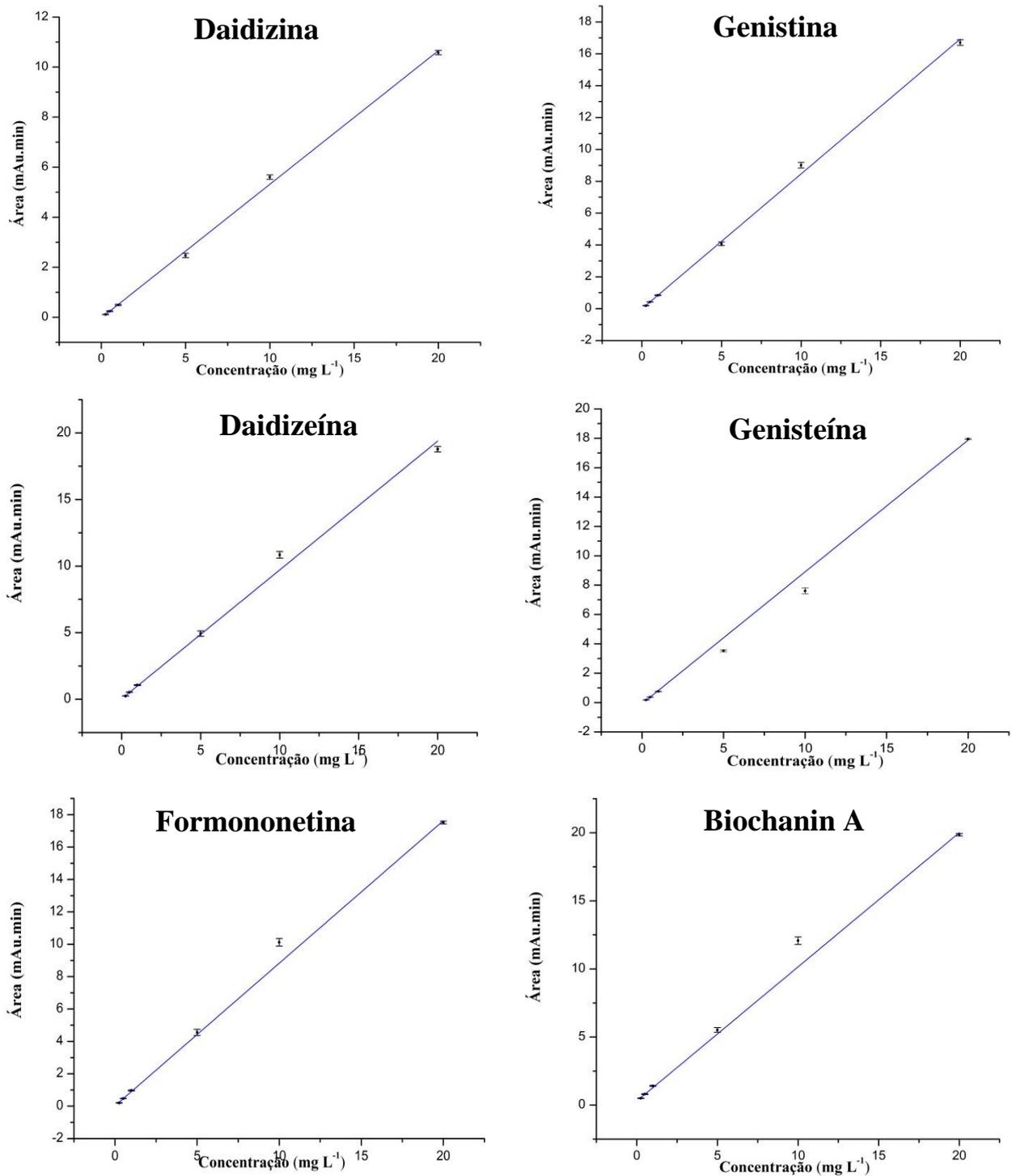


Figura 4. 13 - Curvas analíticas obtidas para os seis fitoestrógenos daidizina, genistina, daidzeína, genisteína, formononetina e biochanin A na faixa de concentração de 0,25 a 20,0 mg L⁻¹ (Fonte: elaborada pela autora).

Os modelos lineares de calibração foram obtidos por regressão linear pelo modelo dos mínimos quadrados, usando medidas em triplicatas em cada nível de concentração (mencionadas na Seção 3.6.2). As equações das retas ($y = ax + b$), a faixa linear dinâmica e os coeficientes de

correlação linear das curvas analíticas dos quatro estrógenos e dos seis fitoestrógenos são apresentados nas Tabelas 4.5 e 4.6, respectivamente.

Tabela 4.5 - Equações das retas ($y = ax + b$), faixa linear dinâmica e coeficientes de correlação linear das curvas analíticas dos quatro estrógenos.

Estrógeno	Faixa linear dinâmica ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação	R^2	Número de pontos
Estrona	15,6 a 500	$y = -0,0028+0,0052*x$	0,9979	6
17 β -estradiol	3,12 a 100	$y = -0,0113+0,0117*x$	0,9998	6
17 α -etinilestradiol	3,12 a 100	$y = -0,0052+0,0120*x$	0,9963	6
Estriol	3,12 a 100	$y = -0,0020+0,2584*x$	0,9969	6

Tabela 4.6 - Equações das retas ($y = ax + b$), faixa linear dinâmica e coeficientes de correlação linear das curvas analíticas dos seis fitoestrógenos.

Fitoestrógeno	Faixa linear dinâmica (mg L^{-1})	Equação	R^2	Número de pontos
Daidizina	0,25 a 20,0	$y = -0,0217+0,5339*x$	0,9990	6
Genistina	0,25 a 20,0	$y = 0,0049+0,8466*x$	0,9984	6
Daidizeína	0,25 a 20,0	$y = 0,0272+0,9681*x$	0,9951	6
Genisteína	0,25 a 20,0	$y = -0,0774+0,8978*x$	0,9989	6
Formononetina	0,25 a 20,0	$y = 0,0222+0,8805*x$	0,9987	6
Biochanin A	0,25 a 20,0	$y = 0,2948+0,9854*x$	0,9981	6

Como observado nas curvas analíticas dos estrógenos e fitoestrógenos, são encontrados resultados de linearidade satisfatórios. Tal afirmativa foi corroborada com os valores de coeficiente de correlação que foram superiores a 0,995, em concordância com o preconizado pela ANVISA (BRASIL. ANVISA, 2003).

A linearidade das curvas analíticas foi confirmada pela análise gráfica dos resíduos gerados pelos modelos de calibração. Tal análise partiu dos gráficos apresentados nas Figuras 4.14 e 4.15 que comprovam não haver pontos atípicos (*outliers*) na calibração, que poderiam influenciar os modelos. Em nenhum desses gráficos houve ocorrência de resíduos maiores que 2 ou menores que -2. Os gráficos não apresentam tendência que demonstre a falta de ajuste dos modelos, confirmando sua adequação às respostas obtidas.

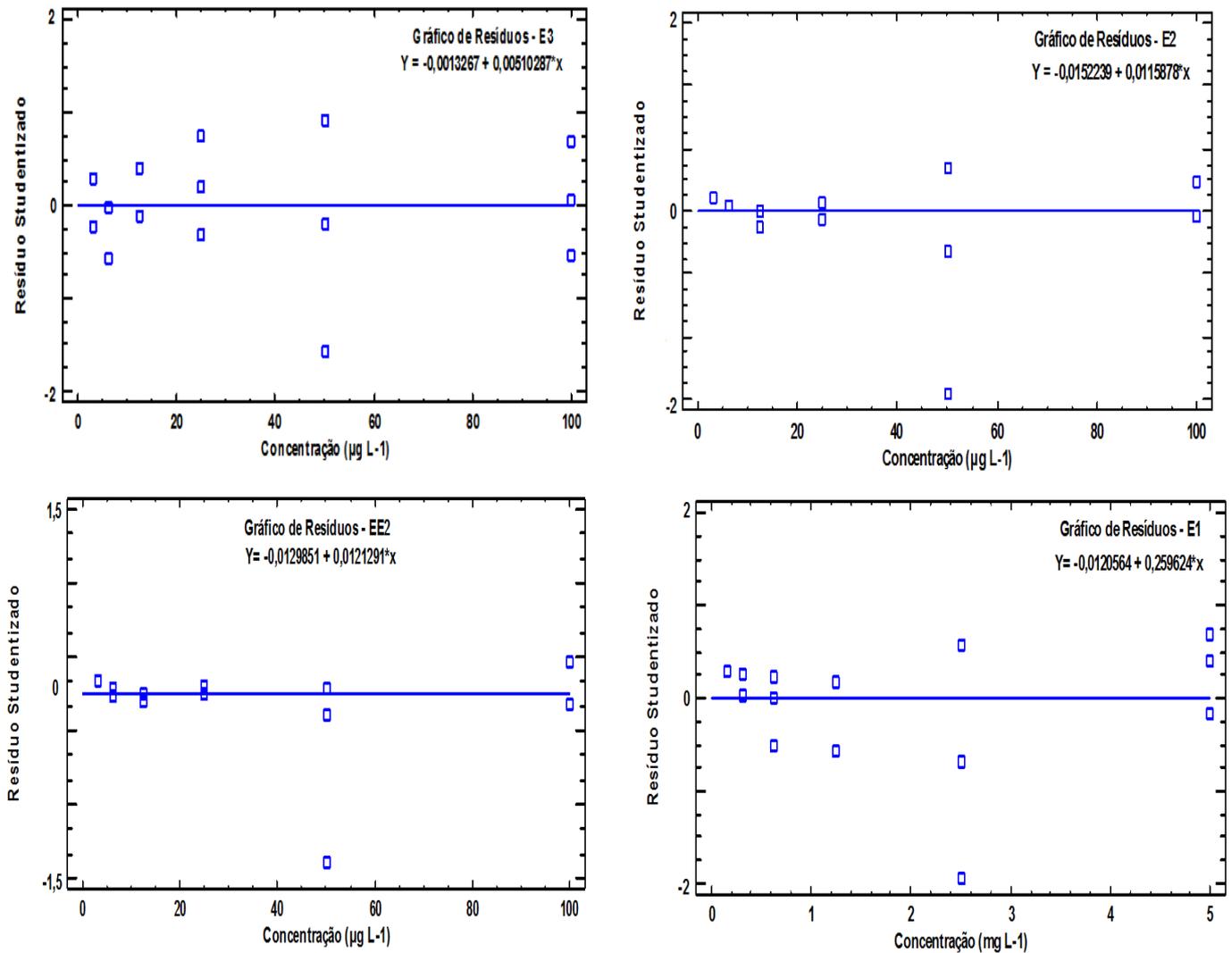


Figura 4.14 - Gráficos dos resíduos das curvas analíticas dos estrógenos estriol (E3), 17 β -estradiol (E2), 17 α -etinilestradiol (EE2) e estrona (E1) (Fonte: elaborada pela autora).

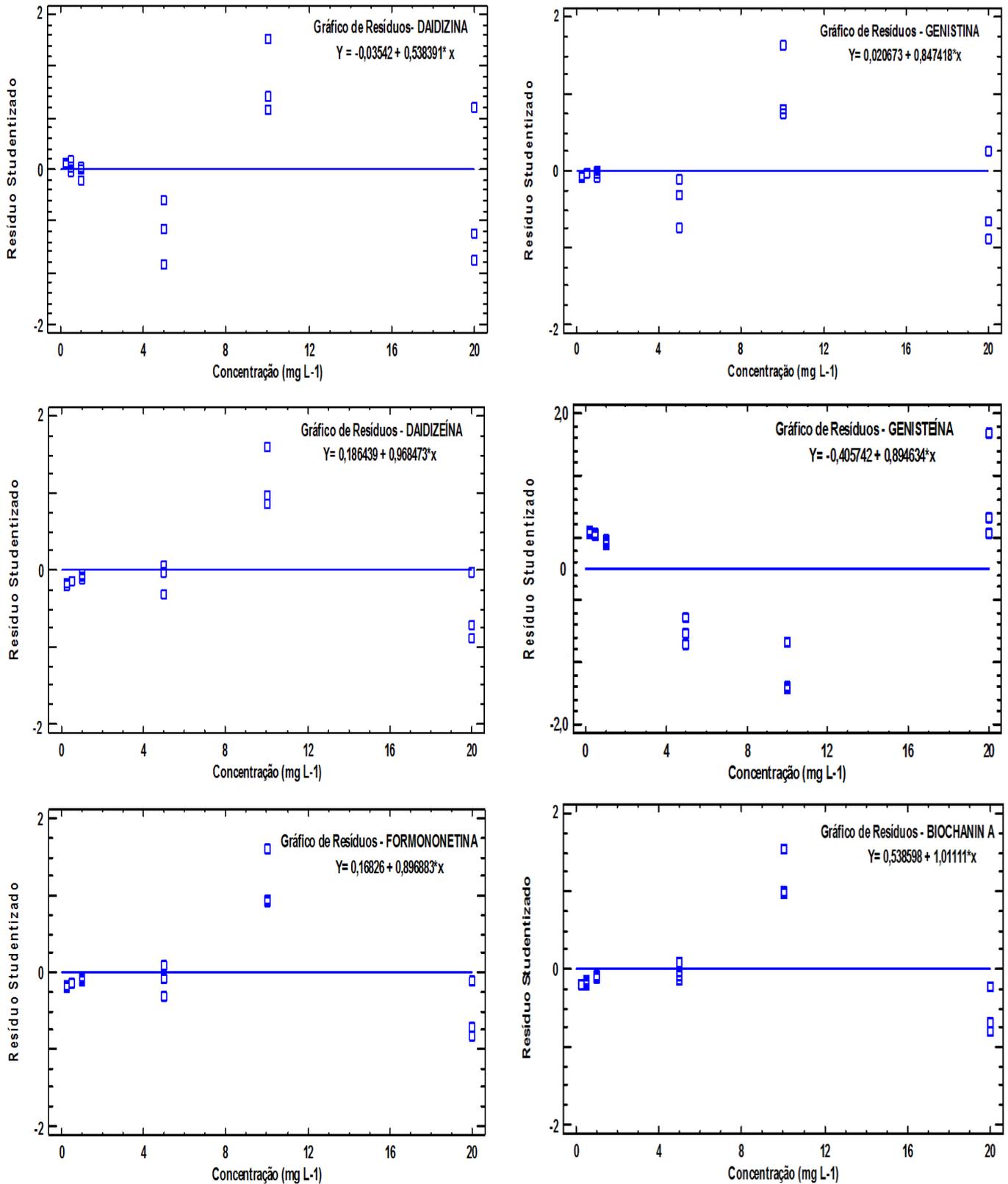


Figura 4. 15 - Gráficos dos resíduos das curvas analíticas dos fitoestrógenos daidizina, genistina, daidzeína, genisteína, formononetina e biochanin A (Fonte: elaborada pela autora).

Para corroborar na validação dos modelos de calibração, foi aplicada a ANOVA que resultou nas Tabelas C.1 a C.9, do apêndice C. Uma tabela resumida dos resultados da ANOVA é apresentada a seguir para os quatro estrógenos e seis fitoestrógenos (Tabela 4.7).

Tabela 4.7 - Dados obtidos na aplicação da ANOVA aos modelos de calibração dos dez analitos estudados.

Analito	Significância de R MQ_R/MQ_r	Falta de Ajuste MQ_{faj}/MQ_{ep}
Daidizina	9513,4	2,7058
Genisteína	1892,50	2,5390
Genistina	7727,11	2,6872
Daidizeína	3283,12	2,0886
Formononetina	2813,29	1,3727
Biochanin A	1767,34	2,1124
Estriol	7994,26	1,2849
17 β -estradiol	6958,6	1,2738
17 α -etinilestradiol	3921,12	2,6811
Estrona	5540,87	0,3208

Para examinar as significâncias da regressão linear (MQ_R/MQ_r) e da falta de ajuste (MQ_{faj}/MQ_{ep}) apresentadas na Tabela 4.7 utilizou-se, respectivamente, $F_{\text{tabelado}}=F_{4,12}$ (ponto de distribuição F para 4 e 12 graus de liberdade ao nível de confiança de 95%) igual a 3,26 e $F_{\text{tabelado}}=F_{1,16}$ (ponto de distribuição F para 1 e 16 graus de liberdade ao nível de confiança de 95%) igual a 4,49. Com isso, se constata que todos os modelos apresentam regressão linear significativamente elevada. E que também não se evidencia falta de ajuste em nenhum dos modelos.

Pode-se afirmar com 95% de confiança que os modelos utilizados são lineares em todas as suas faixas de concentração aplicadas.

4.5 – Limite de detecção e limite de quantificação

Os valores dos limites de detecção e quantificação dos dois métodos desenvolvidos foram determinados com base nos parâmetros das curvas analíticas (BRASIL. ANVISA, 2003), de acordo com as equações 2.3 e 2.4 citadas na seção 2.7.3.

Os valores de LD e LQ são apresentados na [Tabela 4.8](#) e [Tabela 4.9](#).

No cálculo dos valores de LD e LQ foi considerado o fator de pré-concentração das amostras, obtidos durante a etapa de SPE, que foi de 2.857 vezes.

Tabela 4.8 - Limites de detecção e quantificação obtidos para os estrógenos pelo método HPLC-FLU.

Analito	LD (ng L ⁻¹)	LQ (ng L ⁻¹)	Desvio padrão do LD (s)
Estriol	1,33	3,13	0,00395
17 β-estradiol	1,25	2,93	0,00921
17 α-etinilestradiol	1,36	3,19	0,00995
Estrona	51,6	121	0,00757

Tabela 4.9 - Limites de detecção e quantificação obtidos para os fitoestrógenos pelo método HPLC-DAD.

Analito	LD (µg L ⁻¹)	LQ (µg L ⁻¹)	Desvio padrão do LD (s)
Daidizina	0,61	1,62	0,124
Genistina	0,70	1,86	0,225
Daidizeína	0,46	1,31	0,456
Genisteína	1,87	4,83	0,593
Formononetina	1,43	3,69	0,462
Biochanin A	0,64	1,67	0,674

Os valores de LD e LQ aqui encontrados foram comparados com valores apresentados em outros trabalhos da literatura, em que foram estudados os mesmos analitos e que são listados nas [Tabelas 4.10](#) e [4.11](#).

Algumas informações pertinentes, relativas às condições de análises também são apresentadas.

Tabela 4. 10 - Trabalhos publicados na literatura que analisaram amostras contendo estrógenos.

Estrógenos	Tipo de amostra	Técnica de Extração	Método de detecção	Rec. (%)	LD (ng L ⁻¹)	LQ (ng L ⁻¹)	Ref.
Estriol, 17 β-estradiol, 17 α-etinilestradiol e estrona	Água de rio	SPE	LC-UV	78-101	240-510	-	Stafiej, <i>et al.</i> , 2007
Estriol, 17 β-estradiol e estrona	Água de ETE	SPE	HPLC-DAD-MS	56-93	25-500	-	Alda <i>et al.</i> , 2000
Estriol, 17 β-estradiol, 17 α-etinilestradiol e estrona e dietilestilbestrol	Água de torneira e de rio	MIP-SPE	UHPLC-TSQ-QqQ	>82	4,5-9,8	14,9-32,6	Lucci <i>et al.</i> , 2011
Estriol, 17 β-estradiol, 17 α-etinilestradiol e dietilestilbestrol	Água de rio e água de ETE	SPE	RRLC-ESI-MS/MS	73-123	0,10-1,44	-	Liuet. <i>al.</i> , 2011
Estriol, 17 β-estradiol e estrona	Água de rio e de estuário	SPE automat.	LC-APPI-MS/MS	74-107	0,4-12	-	Ciofi <i>et al.</i> , 2013
Estriol, 17 β-estradiol, 17 α-etinilestradiol e estrona	Água de rio	SPE	HPLC-FLU	81-106	1,33-51,6	3,13-121	Presente trabalho

Numa análise comparativa, é possível perceber que no trabalho de Stafiej e colaboradores em 2007, utilizando a mesma técnica de extração que a do presente trabalho (SPE) e técnica de análise similar (LC-UV) para estrógenos em água de rio, foi encontrado LD de 10 a 180 vezes maior que os encontrados nesse trabalho.

Em um trabalho de Alda e colaboradores em 2000, utilizando a mesma técnica de extração que a deste trabalho (SPE), porém um detector mais sofisticado (espectrômetro de massas) foi encontrado LD de 10 a 19 vezes mais alto dos que os encontrados neste trabalho, porém no citado trabalho foi analisada água de efluentes e afluentes de ETE's.

Os demais trabalhos, que analisaram amostras contendo estrógenos, obtiveram valores de LD comparáveis aos do trabalho aqui desenvolvido.

Tabela 4. 11- Trabalhos publicados na literatura que analisaram amostras contendo fitoestrógenos.

Fitoestrógenos	Tipo de amostra	Técnica de Extração	Método de detecção	Rec. (%)	LD (ng L ⁻¹)	LQ (ng L ⁻¹)	Ref.
Daidizina, genistina, daidizeína, genisteína, formononetina e biochanin A	Água de rio	SPE	LC-ESI-MS/MS	83-97	0,2-5,0	-	Laganà <i>et. al.</i> , 2005
Daidizeína, genisteína e biochanin A	Água de rio e de ETE	SPE	LC-MS/MS	97-102	0,2-4,3	-	Laganà <i>et. al.</i> , 2004
Daidizeína, genisteína, formononetina e biochanin A	Águas costeiras	SPE	CG-MS	75-120	0,60- 5,5	1,98-18,0	Rocha <i>et. al.</i> , 2013
Daidizeína, genisteína e biochanin A	Águas de rio e residuais	SPE	HPLC-MS/MS	94-138	0,95-2,46	-	Kuster <i>et. al.</i> , 2009
Daidizina, genistina, daidizeína, genisteína, formononetina e biochanin A	Água de rio	SPE	HPLC-DAD	73-113	460-1.870	1.310-4.830	Presente trabalho

Para o caso dos fitoestrógenos, os limites de detecção encontrados no presente trabalho foram muito mais altos que os de outros trabalhos da literatura. Isso pode ser atribuído ao fato dos outros trabalhos utilizarem detectores mais sofisticados, como por exemplo, o detector espectrométrico de massas, em relação ao detector espectrofotométrico de DAD utilizado neste trabalho.

Contudo os limites de detecção dos fitoestrógenos obtidos podem ser considerados satisfatórios para o tipo de matriz avaliada e tipo de detector empregado.

Considerando todos os valores de LD e LQ das tabelas acima, observa-se que o desempenho apresentado pelos métodos HPLC-FLU e HPLC-DAD são comparáveis ao de outros trabalhos relatados na literatura científica recente.

4.6 – Precisão

Os resultados para avaliação repetibilidade dos métodos HPLC-FLU e HPLC-DAD, expressa em termos do coeficiente de variação (CV), em três níveis de concentração (baixo, intermediário e alto) são mostrados nas Tabelas 4.12 e 4.13.

Tabela 4. 12 - CV (%) obtidos na avaliação da precisão (repetibilidade intradia) do método HPLC-FLU para os estrógenos, nos três níveis de concentração.

Analito	Nível de concentração	CV (%)
Estriol	baixo	8,06
	intermediário	13,3
	alto	2,80
17 β-estradiol	baixo	12,4
	intermediário	7,51
	alto	10,1
17 α-etinilestradiol	baixo	7,16
	intermediário	10,8
	alto	4,13
Estrona	baixo	10,8
	intermediário	12,5
	alto	7,78

Tabela 4. 13 - CV (%) obtidos na avaliação da precisão (repetibilidade intradia) do método HPLC-DAD para os fitoestrógenos, nos três níveis de concentração.

Analito	Nível de concentração	CV (%)
Daidizina	baixo	1,11
	intermediário	1,19
	alto	1,99
Genistina	baixo	5,59
	intermediário	2,53
	alto	1,29
Daidizeína	baixo	4,41
	intermediário	1,21
	alto	0,82
Genisteína	baixo	0,58
	intermediário	0,83
	alto	2,69
Formononetina	baixo	1,29
	intermediário	0,58
	alto	6,81
Biochanin A	baixo	2,69
	intermediário	4,03
	alto	2,84

Os cromatogramas apresentados na [Figura 4.16](#) e [Figura 4.17](#) referem-se às corridas cromatográficas realizadas pelos métodos HPLC-FLU e HPLC-DAD, respectivamente, para avaliação da precisão destes métodos.

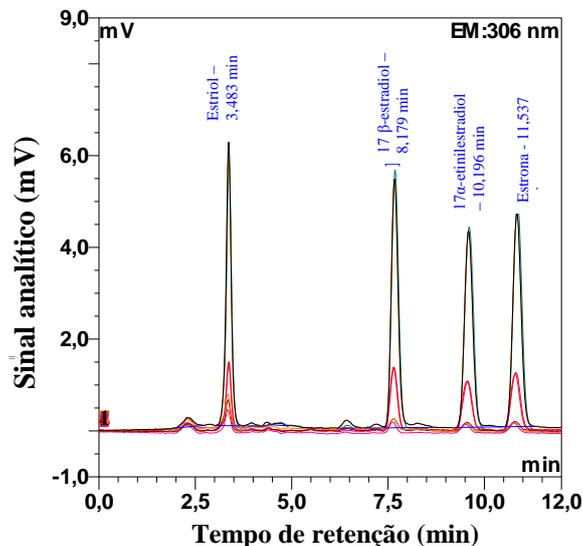


Figura 4.16 - Cromatogramas referentes aos ensaios de repetibilidade, realizados para validação do método HPLC-FLU que quantifica os quatro estrógenos.

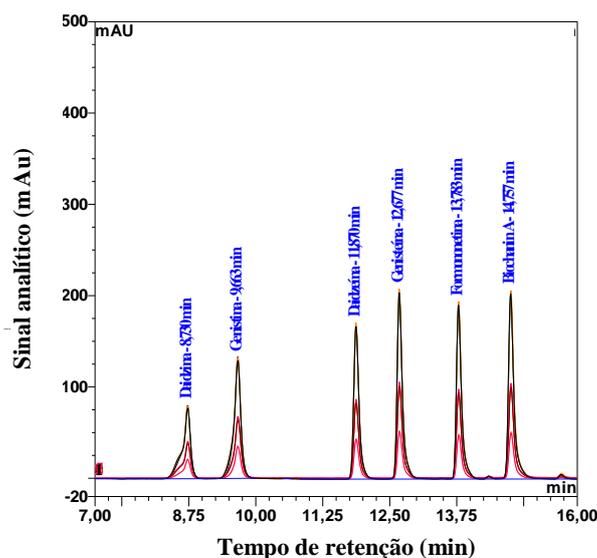


Figura 4.17 - Cromatogramas referentes aos ensaios de repetibilidade, realizados para validação do método HPLC-DAD que quantifica os seis fitoestrógenos.

A precisão intermediária, para ambos os métodos, foi avaliada da mesma maneira que a repetibilidade intradia, sendo realizadas nove medidas sucessivas, pelo mesmo analista, sob as mesmas condições, no mesmo instrumento, entretanto em três dias diferentes, e os resultados são mostrados nas [Tabelas 4.14](#) e [4.15](#), para os dois métodos, respectivamente.

Tabela 4. 14 - Coeficientes de variação (CV) das análises obtidos em três dias diferentes para a avaliação da repetibilidade interdia do método HPLC-FLU, para os quatro estrógenos em três níveis de concentração.

Analito	Nível de concentração	CV (%) Dia 01	CV (%) Dia 02	CV (%) Dia 03	CV interdias
Estriol	baixo	8,06	10,6	7,05	1,85
	intermediário	13,3	11,3	11,3	1,17
	alto	8,21	7,90	1,73	3,66
17 β-estradiol	baixo	2,94	5,59	8,25	2,66
	intermediário	7,51	3,26	8,66	2,85
	alto	2,88	4,29	3,16	0,75
17 α-etinilestradiol	baixo	7,16	8,70	2,84	3,04
	intermediário	10,8	5,63	4,25	3,43
	alto	4,13	2,36	4,21	1,05
Estrona	baixo	10,8	2,84	13,5	5,54
	intermediário	12,5	7,50	8,12	2,72
	alto	7,78	4,82	5,77	1,51

Tabela 4. 15- Desvios padrão relativo obtidos na avaliação da precisão intermediária do método HPLC-DAD, para os seis fitoestrógenos nos três níveis de concentração.

Analito	Nível de concentração	CV (%) Dia 01	CV (%) Dia 02	CV (%) Dia 03	CV interdias
Daidizina	Baixo	11,1	5,97	8,96	2,58
	intermediário	1,19	2,39	3,46	1,14
	Alto	1,99	2,21	3,21	0,65
Genistina	Baixo	6,19	5,97	14,7	4,97
	intermediário	2,53	1,85	4,42	1,33
	Alto	1,29	2,31	8,07	3,66
Daidizeína	Baixo	4,33	4,56	7,69	1,88
	intermediário	1,21	3,16	2,08	0,98
	Alto	0,82	2,14	1,34	0,66
Genisteína	Baixo	5,41	5,59	5,59	0,10
	intermediário	0,83	1,63	3,71	1,49
	Alto	2,69	9,55	9,15	3,85
Formononetina	Baixo	6,19	5,97	9,32	1,87
	intermediário	0,58	6,19	1,47	3,02
	Alto	6,81	3,55	7,46	2,10
Biochanin A	Baixo	4,41	1,63	1,62	1,61
	intermediário	4,03	8,66	7,87	2,48
	Alto	2,84	1,79	6,33	2,38

Normalmente, em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos CV de até 15% (BRASIL. ANVISA, 2003), dependendo da complexidade da amostra. Uma vez que a legislação não estabelece níveis específicos para estes contaminantes, em água superficial, admitem-se então, os níveis estabelecidos pela ANVISA.

De acordo com resultados apresentados nas Tabelas 4.12 a 4.15, pode-se dizer que os métodos HPLC-FLU e HPLC-DAD são considerados precisos, pois todos os compostos estudados apresentaram, nos testes de repetibilidade intradia e precisão intermediária, coeficientes de variação menores que 14%. Além disso, os valores aqui apresentados estão de acordo com os de outros trabalhos científicos que desenvolveram métodos para analisar os mesmos analitos (LUCCI *et. al.*, 2011, LIU *et. al.*, 2011, CIOFI *et al.*, 2013, LAGANÀ, *et. al.*, 2004, LAGANÀ *et. al.*, 2005, ROCHA *et. al.*, 2013, KUSTER *et. al.*, 2009).

4.7 – Exatidão

A exatidão dos métodos desenvolvidos foi avaliada através dos ensaios de recuperação, conforme descrito na Seção 2.7.5.

As determinações foram realizadas em triplicata. Os valores de recuperação obtidos para os métodos HPLC-DAD e HPLC-FLU, em cada nível de concentração, estão apresentados na Tabela 4.16 e Tabela 4.17, respectivamente.

Observando os resultados apresentados na Tabela 4.16 e na Tabela 4.17 acima, percebe-se uma excelente recuperação para os quatro estrógenos e seis fitoestrógenos, nos três níveis de fortificação avaliados (baixo, intermediário e alto). Todos os valores de recuperação (%) ficaram no intervalo de 72,9 e 113%, que está dentro dos limites exigidos pela ANVISA (BRASIL. ANVISA, 2003) e pelo INMETRO (BRASIL. INMETRO, 2010).

Os valores obtidos nos ensaios de exatidão foram similares aos valores encontrados por Bezerra, 2014 que investigou a ocorrência de estrógenos em água e material particulado em suspensão (SPM) em mananciais de São Paulo, utilizando métodos de extração em fase sólida (SPE) para água, extração sólido-líquido para material suspenso particulado e QuEChERS para sedimentos.

Tabela 4. 16 - Valores de recuperação (%) obtidos para os ensaios da avaliação da exatidão, com seus respectivos coeficientes de variação (CV), para os seis fitoestrógenos nos três níveis de concentração.

Analito	Nível de concentração	Recuperação (%)
Daidizina	baixo	79,4
	intermediário	90,3
	alto	105
Genistina	baixo	72,9
	intermediário	107
	alto	84,8
Daidizeína	baixo	93,7
	intermediário	98,6
	alto	97,6
Genisteína	baixo	102
	intermediário	102
	alto	98,2
Formononetina	baixo	92,4
	intermediário	97,7
	alto	96,1
Biochanin A	baixo	85,5
	intermediário	113
	alto	109

Tabela 4. 17 - Valores de recuperação (%) obtidos para os ensaios da avaliação da exatidão, nos três níveis de concentração, dos quatro estrógenos.

Analito	Nível de concentração	Recuperação (%)
Estriol	baixo	81,9
	Intermediário	93,3
	Alto	106
17 β-estradiol	Baixo	107
	Intermediário	98,5
	Alto	102
17 α-etinilestradiol	Baixo	87,9
	Intermediário	88,9
	Alto	93,6
Estrona	Baixo	97,2
	Intermediário	104
	Alto	85,1

4.8 – Estabilidade

Para o método HPLC-FLU, os padrões submetidos aos testes de estabilidade foram àqueles com concentrações de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, para estriol, 17α -etinilestradiol e 17β -estradiol e de $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ para a estrona. Para o método HPLC-DAD utilizou-se padrões na concentração de $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ para os seis fitoestrógenos.

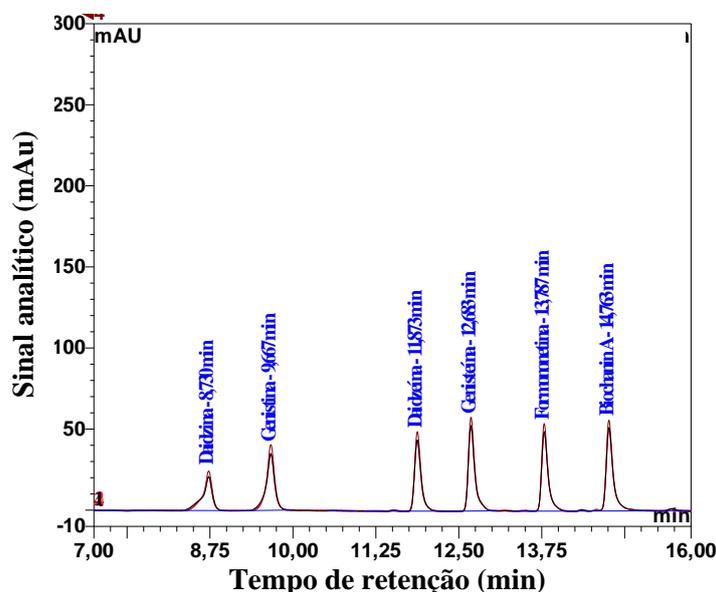


Figura 4. 18 - Cromatogramas sobrepostos resultantes de três momentos distintos de análise da mistura padrão fitoestrógenos (daidizina, genistina, daidizeína, genisteína, formononetina e biochanin A) de concentração alta, registrados pelo método HPLC-DAD.

Ao avaliar os cromatogramas apresentados na [Figura 4.18](#), visualmente não se observa variações significativas nos cromatogramas obtidos nos três diferentes momentos, então avaliaram-se valores de área de cada pico cromatográfico, mostrados na [Tabela 4.18](#), nos três diferentes momentos registrados.

Tabela 4. 18-Valores de área dos cromatogramas registrados, três momentos diferentes, pelo método HPLC-DAD, para avaliação da estabilidade das soluções padrão de fitoestrógenos.

Analito	Área (mAu.min)			CV (%)
	Mesmo dia	24 horas	1 mês	
Daidizina	3,49	3,59	4,04	0,29
Genistina	5,10	5,27	5,88	0,41
Daidizeína	4,91	5,10	5,67	0,39
Genisteína	5,96	6,19	6,79	0,42
Formononetina	5,43	5,64	6,25	0,42
Biochanin A	7,02	6,43	6,23	0,41

Para todos os fitoestrógenos percebeu-se há um aumento de área, tanto da solução analisada após 24 horas em cima da bancada, à temperatura ambiente, quanto daquela analisada após ser mantida refrigerada, por um mês, a -25°C .

O que se percebe, é que, provavelmente, não houve degradação dos analitos, mas sim uma concentração dos mesmos, pelo fato de uma possível evaporação do solvente em que a solução foi preparada.

Apesar desta variação, conclui-se que, os padrões aqui utilizados, possuem estabilidade suficiente em um dia sem refrigeração e também em 30 dias, sob refrigeração, pois observando os valores de CV das áreas, percebe-se que suas variações nas soluções padrão não eram significativas.

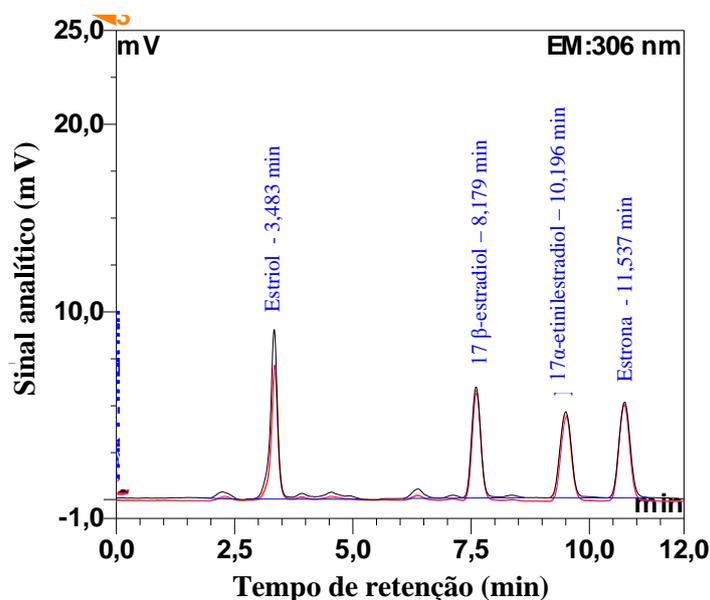


Figura 4.19 - Cromatogramas sobrepostos resultantes de três momentos distintos de análise da mistura padrão dos quatro estrógenos (estriol, 17 β-estradiol, 17 α-etinilestradiol, estrona) em alta concentração, registrados com método HPLC-FLU.

Para avaliação da estabilidade das soluções de estrógenos, observou-se comportamento semelhante aos resultados das soluções de fitoestrógenos.

Observando os cromatogramas apresentados na [Figura 4.19](#), não se percebe variações significativas obtidos nos três diferentes momentos avaliados.

Tabela 4. 19- Valores de área dos cromatogramas registrados, três momentos diferentes, pelo método HPLC-FLU, para avaliação da estabilidade das soluções padrão de estrógenos.

Analito	Área (mV min ⁻¹)			CV (%)
	Mesmo dia	24 horas	1 mês	
Estriol	1,16	1,22	1,65	0,26
17 β-estradiol	1,26	1,31	1,33	0,03
17 α-etinilestradiol	1,25	1,26	1,30	0,02
Estrona	1,37	1,39	1,42	0,02

Ao avaliar os valores de área de cada pico cromatográfico, mostrados na [Tabela 4.19](#), as variações das áreas das soluções padrão dos estrógenos não foram significativas. Então se conclui que os padrões possuem estabilidade suficiente em um dia sem refrigeração e também em 30 dias, sob refrigeração.

TERCEIRA ETAPA: APLICAÇÃO DOS MÉTODOS EM AMOSTRAS REAIS

4.9 – Ocorrência dos interferentes endócrinos na bacia do Rio Cuiá

Após a validação dos métodos HPLC-FLU e HPLC-DAD, estes foram aplicados às amostras de água do rio, coletadas conforme descrito na [Seção 3.8](#). As concentrações dos contaminantes estudados, nas águas Rio Cuiá, foram determinadas utilizando curvas analíticas obtidas para cada campanha. Deve-se enfatizar que foi considerado nos cálculos das concentrações o fator de pré-concentração obtido durante a etapa de extração em fase sólida. Os resultados obtidos estão mostrados separadamente, por campanha amostral.

4.9.1 – Primeira campanha amostral

A primeira campanha amostral foi realizada em julho de 2012, cujo período se caracterizou por não apresentar chuvas regulares, porém foi precedido de longo período de chuvas fortes. A partir dos métodos validados HPLC-FLU e HPLC-DAD, os gráficos apresentados na [Figura 4.20 \(a\) e \(b\)](#) mostram as concentrações encontradas dos analitos de interesse em quatro dos cinco pontos de coletas num trecho de 5km do Rio Cuiá, referente à primeira campanha amostral. Em um dos pontos não foi coletada amostra pela dificuldade de acesso, por se encontrar dentro de uma propriedade particular. Os valores das concentrações utilizados na construção dos gráficos encontram-se em [D.1, Apêndice D](#).

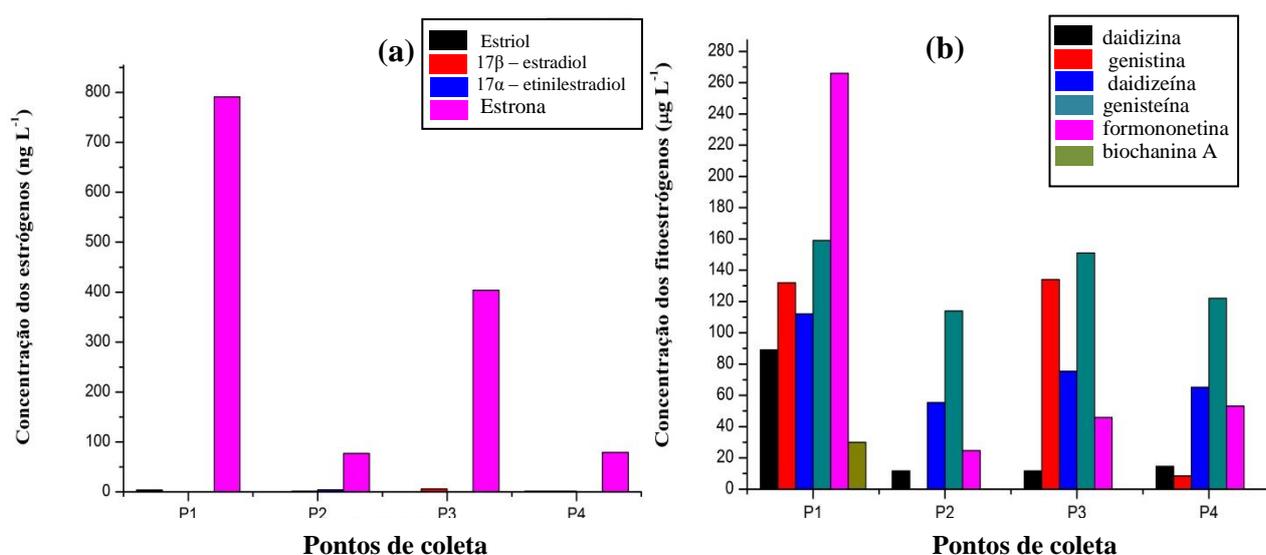


Figura 4. 20 - Gráfico de barras das concentrações dos (a) estrógenos e (b) fitoestrógenos nos quatro pontos de coleta, na primeira campanha amostral.

Examinando os gráficos apresentados, nota-se que os estrógenos não foram representativos em todos os pontos de coleta. Mas que mesmo abaixo do LQ, a Estrona se destacou por apresentar concentrações relevantes antes e dentro da zona de mistura de lançamento da ETE (P3). Enquanto que o Estriol manteve-se no LD ou abaixo do LD do método HPLC-FLU. Mesmo com pouca representatividade da Daidizina, os fitormônios revelaram-se mais presentes que os estrógenos nas águas do Rio Cuiá. Os resultados do ponto P1 sugere sua proximidade com a maior fonte de contaminação dos fitormônios, seguido do ponto de lançamento da ETE (P3). É relevante registrar que, nessa campanha amostral, a Daidizeína e a Genisteína (isoflavonas agliconas) estiveram sempre mais presentes que suas precursoras Daidizina e Genistina (isoflavonas glicosídicas). Nesse caso, conforme descrito na [Seção 2.3.2](#), uma maior presença de isoflavonas agliconas pode indicar não apenas a contaminação do ambiente, mas também que as mesmas foram excretadas por organismo animal ou organismo humano após ingestão e metabolização das duas isoflavonas glicosídicas.

Esses resultados são corroborados pelos cromatogramas de amostras de água coletadas no Rio Cuiá e registrados com os métodos HPLC-FLU e HPLC-DAD, respectivamente, exemplificados nas [Figuras 4.21 e 4.22](#). Assim como nos cromatogramas das amostras dos outros pontos, nota-se não somente a presença dos picos característicos dos seis estrógenos, mas também de várias outras substâncias.

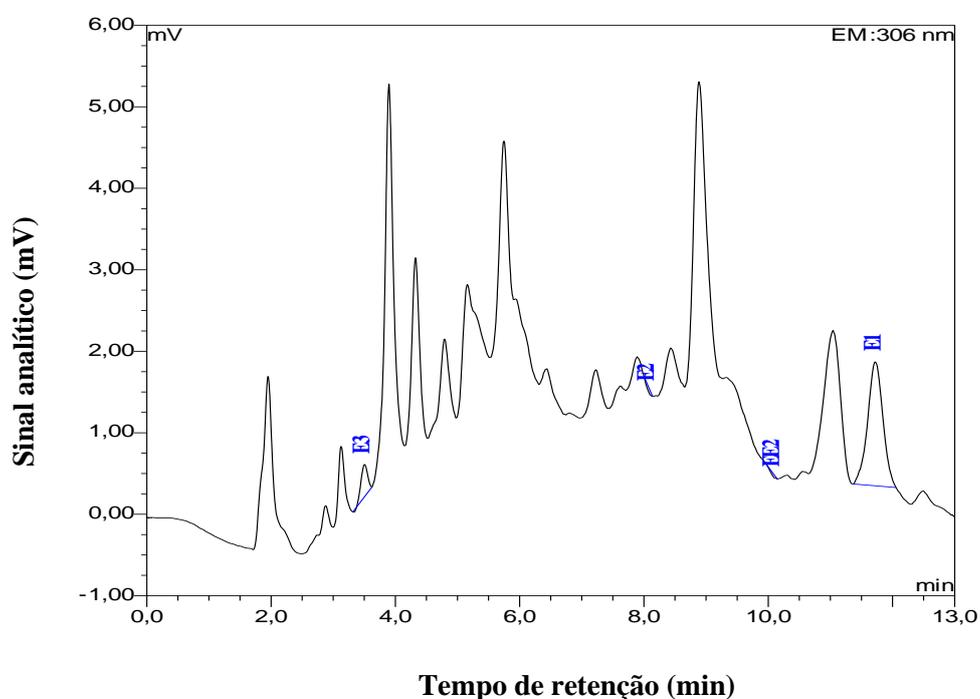


Figura 4. 21 - Cromatograma obtido com o método HPLC-FLU para quantificar os estrógenos E3 (estriol), E2 (17 β -estradiol), EE2 (17 α -etinilestradiol) e E1 (estrona), em uma amostra de água do Rio Cuiá, coletada no ponto P1, em julho de 2012 (Primeira campanha amostral).

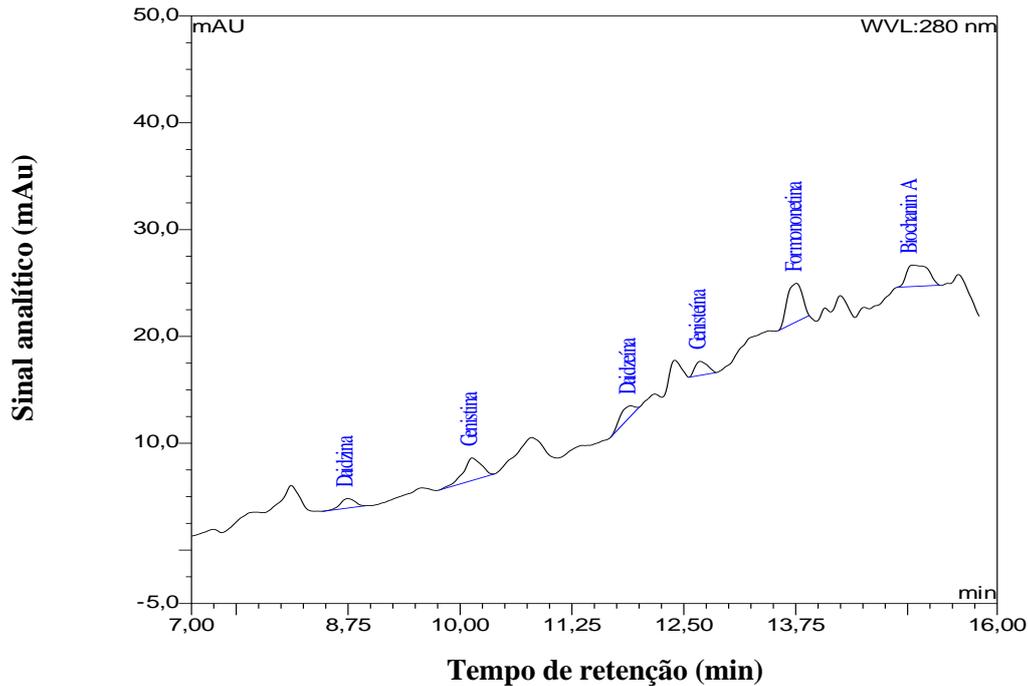


Figura 4. 22 - Cromatograma obtido com o método HPLC-DAD para quantificar os seis fitoestrógenos em uma amostra de água do Rio Cuiá, coletada no ponto P1, em julho de 2012 (Primeira campanha amostral).

4.9.2 – Segunda campanha amostral

A segunda campanha amostral foi realizada em dezembro de 2012, o qual compreendeu um período de estiagem. Os gráficos apresentados na [Figura 4.23 \(a\)](#) e [\(b\)](#) mostram as concentrações encontradas nesta campanha, utilizando os métodos validados, HPLC-FLU e HPLC-DAD, dos analitos de interesse, em cinco pontos de coletas, ao longo do Rio Cuiá.

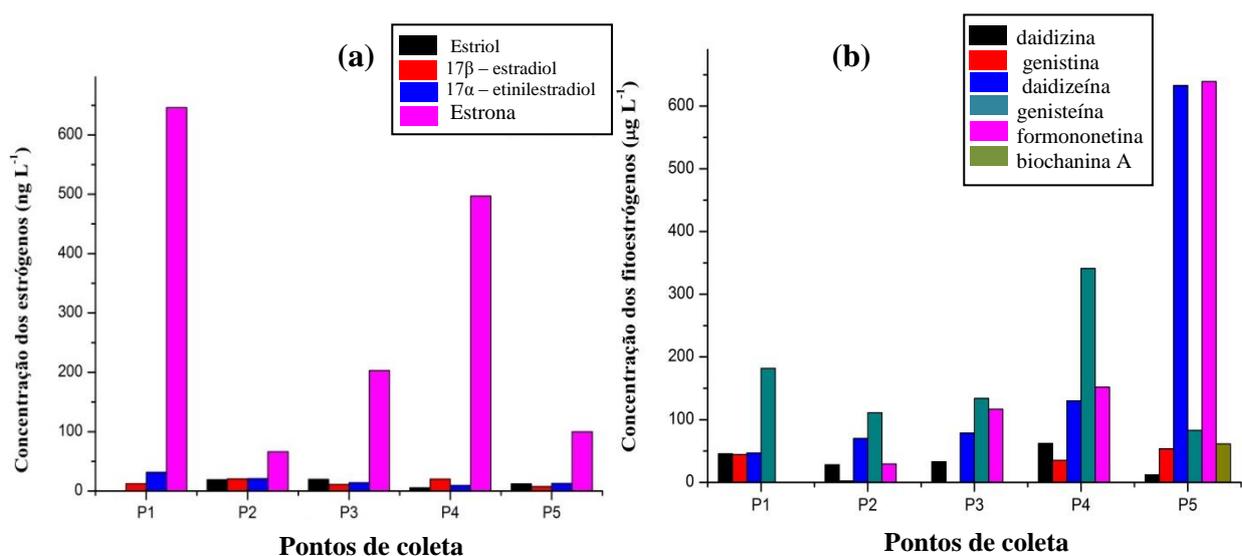


Figura 4. 23 - Gráfico de barras das concentrações dos (a) estrógenos e (b) fitoestrógenos nos cinco pontos, coletados na segunda campanha amostral.

Observa-se nos gráficos apresentados, que diferente da primeira campanha, nesta campanha amostral foi possível detectar os quatro estrógenos de interesse, em concentrações que variaram de 5,61 a 646 ng L⁻¹, sendo novamente a Estrona aquela que apresentou as maiores concentrações. O Estriol novamente foi o estrógeno com menor representatividade de contaminação.

Os fitoestrógenos variaram numa concentração de 12,1 a 791 ng L⁻¹, sendo a Genistéina o analito que apresentou as maiores concentrações. Dentre os seis fitoestrógenos, apenas a Biochanin-A e a genistina não foram detectados (ou tiveram concentrações abaixo do limite de detecção do método), nos cinco pontos de coleta. É relevante registrar que, também nessa campanha amostral, a Daidizeína e a Genistéina estiveram sempre mais presentes que as suas precursoras Daidizina e Genistina.

Os valores das concentrações utilizados na construção dos gráficos encontram-se na [Tabela D.2](#), no [Apêndice D](#).

No cromatograma da [Figura 4.24](#), obtido através do método HPLC-FLU, de uma amostra de água coletada no ponto P1, observa-se a maior concentração de estrona.

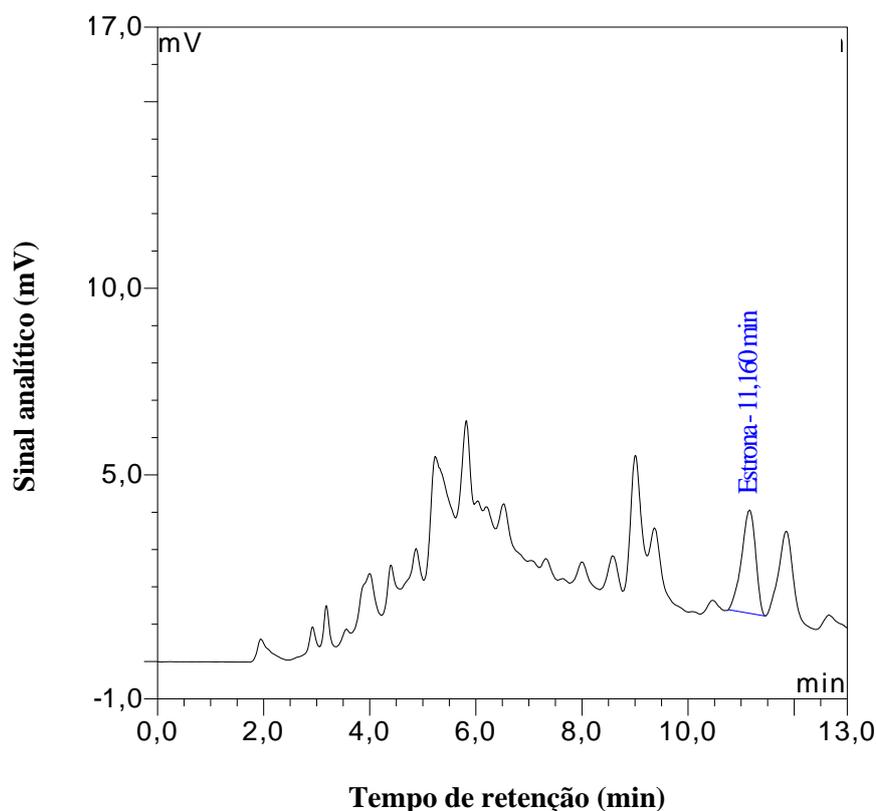


Figura 4. 24 - Cromatograma obtido com o método HPLC-FLU para quantificar os estrógenos estriol, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e estrona, em uma amostra de água do Rio Cuiá, coletada no ponto P1, em dezembro de 2012 (Segunda campanha amostral).

No cromatograma da [Figura 4.25](#) de uma amostra coletada no ponto P5, obtido através do método HPLC-DAD, observa-se a ocorrência das maiores concentrações de Daidizeína e Formononetina.

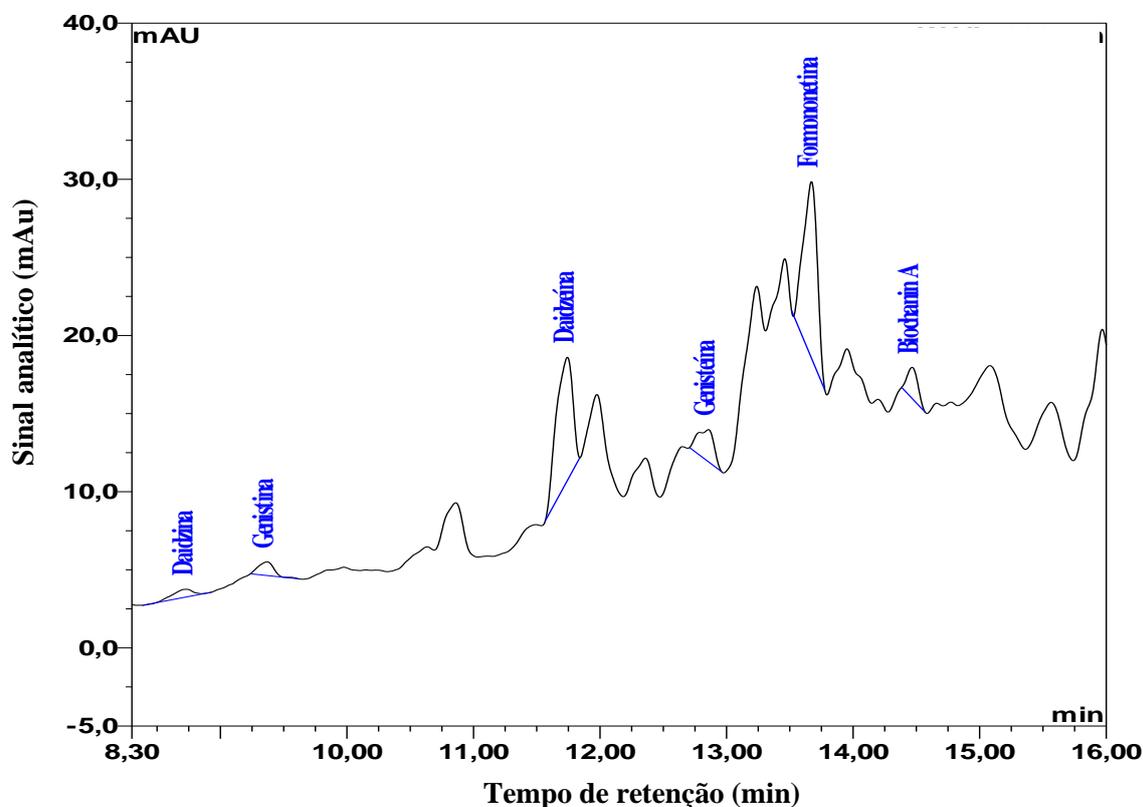


Figura 4. 25 - Cromatograma obtido com o método HPLC-DAD para quantificar os seis fitoestrógenos em uma amostra de água do Rio Cuiá, coletada no ponto P1, em dezembro de 2012 (Segunda campanha amostral).

Da mesma forma que na campanha anterior, assim como nos cromatograma das amostras dos outros pontos, nota-se não somente a presença dos picos característicos dos quatro estrógenos e seis estrógenos, mas também de várias outras substâncias.

4.9.3 – Terceira Campanha Amostral

A terceira campanha amostral foi realizada em maio de 2013, a qual compreendia um período bastante chuvoso. Nesta campanha foram coletadas amostras em quatro pontos amostrais.

O gráfico de barras das [Figuras 4.26 \(a\) e \(b\)](#) ilustram os valores referentes às concentrações dos estrógenos e fitoestrógenos, respectivamente, encontrados nesta campanha.

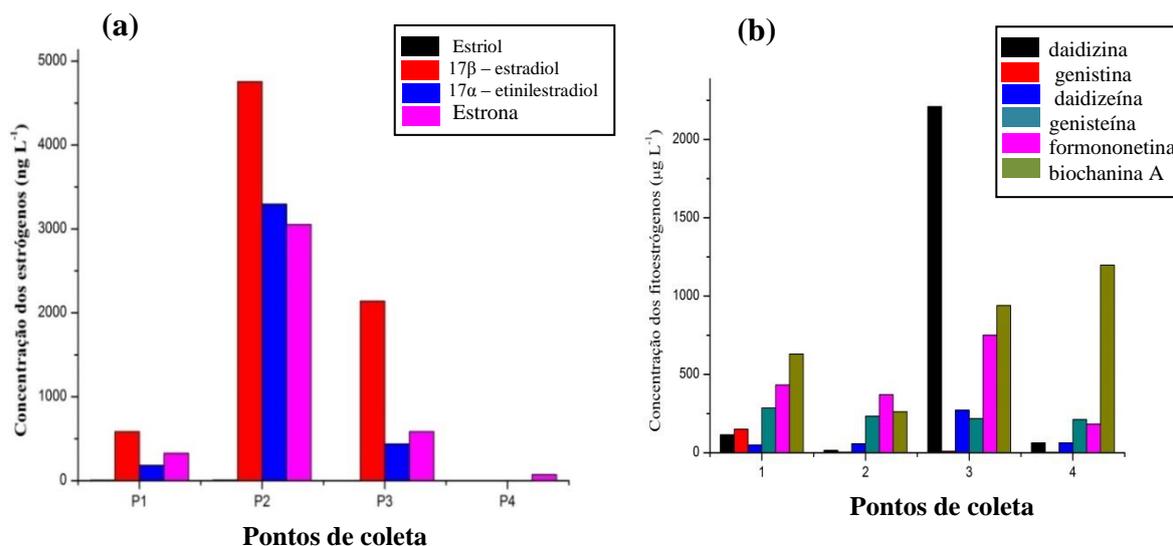


Figura 4. 26 - Gráfico de barras das concentrações dos (a) estrógenos e (b) fitoestrógenos nos quatro pontos, coletados na terceira campanha amostral.

Os resultados das concentrações estão na [Tabela D.3](#), no [Apêndice D](#).

Observa-se nos gráficos que novamente os estrógenos foram encontrados em todos os pontos de coleta e em concentrações que variaram de 3,11 a 4.754 ng L⁻¹.

O Estriol continuou com as menores concentrações de contaminação, enquanto que o 17 β-Estradiol ultrapassou a elevada contaminação da Estrona nas duas campanhas anteriores. O ponto P2 apresentou as maiores concentrações dos estrógenos, com exceção do estriol. No ponto P4 apenas a estrona foi encontrada, numa concentração de 72,7 ng L⁻¹ e os demais estrógenos tiveram concentração abaixo do limite de detecção do método HPLC-FLU ou não foram encontrados.

Mais uma vez, todos os seis fitoestrógenos foram detectados nos quatro pontos de coleta e tiveram uma grande variação na concentração, que foi de 3,58 a 2.210 μg L⁻¹. Nesta campanha amostral a Daidizina se destacou muito pela elevada concentração no ponto P3, na zona de mistura do rio com o lançamento da ETE.

Para corroborar com esta informação, um cromatograma de uma amostra coletada neste ponto e analisada pelo método HPLC-FLU é apresentado na [Figura 4.27](#).

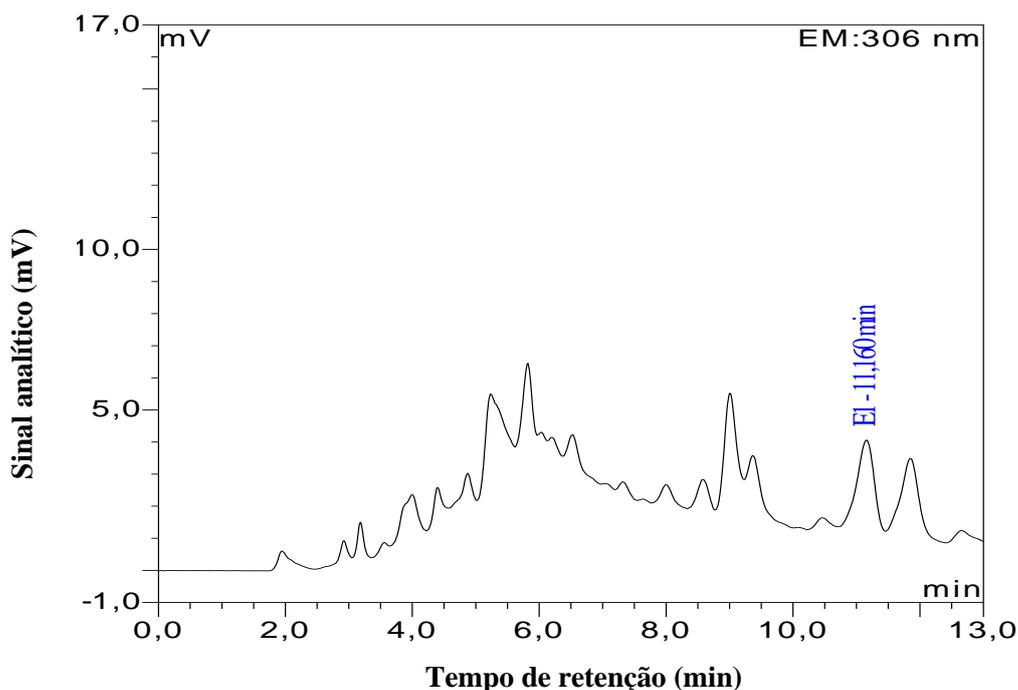


Figura 4. 27- Cromatograma obtido com o método HPLC-FLU para quantificar os estrógenos E3 (estriol), E2 (17 β -estradiol), EE2 (17 α -etinilestradiol) e E1 (estrona), em uma amostra de água do Rio Cuiá, coletada no ponto P2, em maio de 2013 (terceira campanha amostral).

O cromatograma ilustrado na [Figura 4.28](#) corresponde às determinações de fitoestrógenos, pelo método HPLC-DAD, de uma amostra coletada no ponto P3, a qual mostra que a maior concentração é de Daidizina.

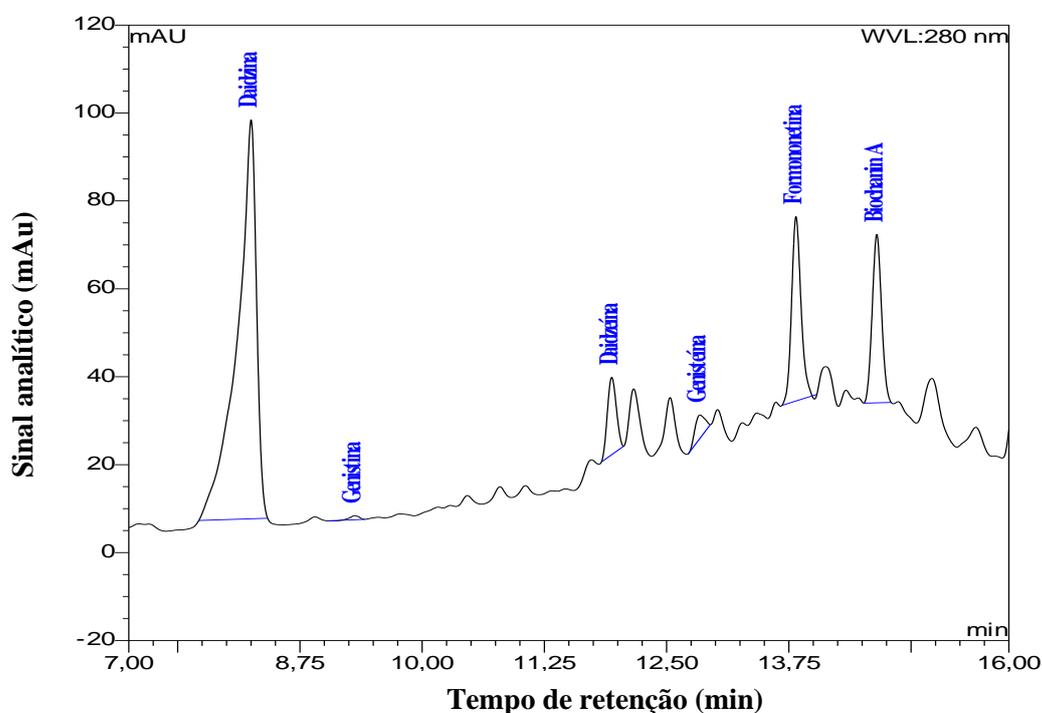


Figura 4. 28 - Cromatograma obtido com o método HPLC-DAD para quantificar os seis fitoestrógenos em uma amostra de água do Rio Cuiá, coletada no ponto P2, em maio de 2013 (terceira campanha amostral).

Novamente, da mesma forma que nas duas campanhas anteriores, assim como nos cromatogramas das amostras dos outros pontos, nota-se não somente a presença dos picos característicos dos quatro estrógenos e seis estrógenos, mas também de várias outras substâncias.

Na [Tabela 4.20](#) estão apresentados os valores das concentrações de estrógenos e fitoestrógenos encontrados no presente trabalho nas águas do Rio Cuiá, bem como os encontrados por outros trabalhos que também estudaram estes analitos em outros ambientes aquáticos.

Tabela 4.20 - Valores de concentração de estrógenos e fitoestrógenos encontrados em diversos trabalhos.

Estrógenos ou fitoestrógenos	Tipo de amostra	Técnica de extração	Método de detecção	Concentrações encontradas	Ref.
Estriol, 17 β -estradiol e 17 α - etinilestradiol	Água de rio	SPE	LC-UV	0,09-0,63 mg L ⁻¹	Stafiej <i>et al.</i> , 2007
Estriol, 17 β -estradiol e estrona	Água de ETE	SPE	HPLC-DAD-MS	50-100 ng L ⁻¹	Alda <i>et al.</i> , 2000
Estriol, 17 β -estradiol, 17 α - etinilestradiol e dietilestilbestrol	Água de rio e água de ETE	SPE	RRLC-ESI-MS/MS	8,5 - 40,6 ng L ⁻¹	Liu <i>et al.</i> , 2011
Estriol, 17 β -estradiol e estrona	Água de rio e de estuário	SPE automat.	LC-APPI-MS/MS	0,15 - 0,95 ng L ⁻¹	Ciofi <i>et al.</i> , 2013
17 β -estradiol e 17 α - etinilestradiol	Água de rio e água residual	DLLME	HPLC-FLU	11 - 32 ng L ⁻¹	Lima <i>et al.</i> , 2013
Estriol, 17 β -estradiol, 17 α - etinilestradiol e estrona	Água de rio	SPE	HPLC-FLU	1,40 – 4.754 ng L ⁻¹	Presente trabalho
Daidizina, genistina, daidizeína, genisteína, formononetina e biochanin-A	Água de rio	SPE	LC-ESI-MS/MS	1 - 454 ng L ⁻¹	Laganà <i>et al.</i> , 2005
Daidizeína, genisteína e biochanin-A	Água de rio e afluente e efluente de ETE	SPE	LC-MS/MS	2 - 7 ng L ⁻¹ (água de rio) 4 - 58 ng L ⁻¹ (efluente) 15 -298 ng L ⁻¹ (aflluente)	Laganà, <i>et al.</i> , 2004
daidizeína, genisteína, formononetina e biochanin-A	Águas costeiras	SPE	CG-MS	2,47 – 1.439 ng L ⁻¹	Rocha <i>et al.</i> , 2013
Daidizeína, genisteína e biochanin-A	Águas de rio e residuais	SPE	HPLC-MS/MS	97,6 - 156 ng L ⁻¹	Kuster <i>et al.</i> , 2009
Daidizina, genistina, daidizeína, genisteína, formononetina e biochanin-A	Água de rio	SPE	HPLC-DAD	2,34 – 1.198 μ g L ⁻¹	Presente Trabalho

Comparando os valores supra tabelados, observa-se que a ocorrência dos contaminantes das classes de estrógenos e fitoestrógenos podem ser constatadas em diferentes águas superficiais e em concentrações variadas. E que a ocorrência desses interferentes endócrinos em

grande parte do Rio Cuiá se mostra em concentrações superiores aos valores apresentados nesses outros trabalhos, sugerindo que há uma relevante contaminação deste rio, por parte dos estrógenos e fitoestrógenos. No entanto, apesar dos pontos de coletas terem sido escolhidos próximos a lançamentos clandestinos de esgoto doméstico *in natura*, propriedades agropastoris que despejam dejetos animais e próximos ao lançamento de efluente da ETE, não foi possível relacionar os valores de concentração dos interferentes endócrinos estudados aos pontos de coleta, tamanha variabilidade encontrada nas três campanhas amostrais.

CONCLUSÕES

5 – Conclusões

Neste trabalho de pesquisa foram desenvolvidos e validados dois métodos analíticos adotando extração em fase sólida e cromatografia líquida de alta eficiência para detectar dez interferentes endócrinos em águas superficiais, quais são:

- Método HPLC-FLU para a identificação e quantificação dos estrógenos 17 β -estradiol, estrona, 17 α -etinilestradiol e estriol e;
- Método HPLC-DAD para quantificação dos fitoestrógenos daidizina, genistina, daidizeína, genisteína, formononetina e biochanin A.

Foi desenvolvido um método de preparo de amostras, constituído por etapas de extração, pré-concentração e limpeza, que alcançou recuperações muito próximas à totalidade, além de um elevado fator de pré-concentração (2.857 vezes).

A partir da validação dos dois métodos analíticos, HPLC-FLU e HPLC-DAD, pode-se concluir que:

- Ambos os métodos são seletivos, devido à ausência de picos interferentes tanto para estrógenos quanto para fitoestrógenos;
- As curvas analíticas apresentaram-se linearmente satisfatórias segundo a ANOVA aplicada e com coeficientes de correlação superiores aos exigidos pela ANVISA;
- O método HPLC-FLU revelou sensibilidade superior a de outros trabalhos que relataram os mesmos estrógenos detectados;
- O método HPLC-DAD, mesmo com sensibilidade muito inferior a de outros trabalhos que relataram fitoestrógenos, ainda revelou sensibilidade satisfatória considerando o tipo de matriz avaliada e o tipo de detector;
- Com coeficientes de variação baixos, a repetibilidade é notória em ambos os métodos;
- Ambos os métodos desenvolvidos e validados possuem exatidão analítica satisfatória e;
- Na avaliação da estabilidade, as soluções padrão permaneceram estáveis por um período de até 30 dias, sendo os estrógenos ainda mais estáveis que os fitoestrógenos;

Dessa forma, o método HPLC-FLU está validado para quantificar estrona, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, estriol e o método HPLC-DAD está validado para quantificar daidizina, genistina, daidizeína, genisteína, formononetina e biochanin A em amostras de águas superficiais.

A aplicação dos métodos HPLC-FLU e HPLC-DAD revelou a presença de todos os dez interferentes endócrinos estudados em águas do Rio Cuiá, situado na zona urbana de João

Pessoa-PB. Principalmente nos períodos chuvosos e pós-chuvosos, as concentrações de estrógenos e fitoestrógenos no Rio Cuiá foram muito mais elevadas que as encontradas em águas superficiais de outros países em outros trabalhos, com destaque para Estrona, Biochanina A e Formononetina.

Mesmo sabendo que os dados das análises não são suficientes para uma análise ambiental criteriosa, principalmente da contaminação por estrógenos e fitoestrógenos, as metodologias desenvolvidas e validadas nesse trabalho são capazes de oferecer uma valiosa ferramenta de diagnóstico. Como é o caso de se poder inferir que: A marcante presença dos IE no Rio Cuiá está relacionada à lixiviação do solo contaminado por tais IE; As atividades agropastoris existentes na margem do rio são potenciais fontes de contaminação e; As evidências, em todas as campanhas amostrais, da Daidizeína e a Genisteína (agliconas) estarem sempre mais presentes que suas precursoras (formas naturais) indicam contaminação recente e contínua de Daidizina e Genistina (glicosídicas). Além disso, a maior presença dessas duas isoflavonas agliconas pode indicar não apenas a contaminação do ambiente, mas também que as mesmas foram excretadas por organismo animal ou organismo humano após ingestão e metabolização das duas isoflavonas glicosídicas.

Contudo, é notória a possibilidade de empregar os métodos HPLC-FLU e HPLC-DAD em estudos ambientais de monitoramento das concentrações aquáticas de estrona, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, estriol, daidizina, genistina, daidizeína, genisteína, formononetina e biochanin A. Além disso, poderão servir como alternativa metodológica para o desenvolvimento de outros métodos HPLC, empregados para a determinação analítica de outros interferentes endócrinos.

5.1 – Propostas Futuras

Considerando o desenvolvido deste trabalho até o momento, sugere-se como continuidade de pesquisa as seguintes propostas:

- Desenvolver um método único e capaz de determinar e quantificar simultaneamente, os quatro estrógenos e os seis fitoestrógenos;
- Desenvolver um sistema automatizado de extração em fase sólida, visando reduzir o tempo de preparação da amostra e consumo de solventes, além de elevar a precisão e a exatidão das análises;
- Elevar o número de campanhas amostrais e de pontos de coleta no sentido de verificar a sazonalidade anual dos mesmos dez interferentes endócrinos no Rio Cuiá;

- Estender a detecção dos métodos desenvolvidos para outros contaminantes emergentes com grandes possibilidades de serem encontrados no Rio Cuiá;
- Apresentar os métodos desenvolvidos como ferramenta de qualidade ao órgão responsável pelo tratamento dos esgotos urbanos na cidade de João Pessoa-PB;
- Avaliar a presença de contaminantes em águas tratadas e potáveis a fim de se monitorar os níveis de exposição da população abastecida aos interferentes endócrinos;

REFERÊNCIAS

6 – Referências

- ADLERCREUTZ, H.; MAZUR, W.; Phytoestrogens and western disease. **Ann. Med.**, 29 (2) (1997) 95-120.
- AERNI, H. R.; KOBLER, B.; RUTISHAUSER, B. V.; WETTSTEIN, F. E.; FISCHER, R.; GIGER, W.; HUNGERBÜHLER, A.; MARAZUELA, M.D.; PETER, A.; SCHÖNENBERGER, R.; VÖGELI, A.C.; SUTER, M.J.F.; EGGEN, R. I. L., Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. **Anal. Bioanal. Chem.**, 378 (3) (2004) 688-696.
- Agilent Thecnologies, <http://www.chem.agilent.com/Library/technicaloverviews/Public/5989-9326EN.pdf>. Acesso disponível em 23/01/2015.
- AHMED, S. A., The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disrupters): a new emerging field. **Toxicology**, 150 (1-3) (2000) 191-206.
- ALDA, L., M. J.; BARCELÓ, D., Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 892 (1-2) (2000) 391-406.
- ALDA, M. J.; BARCELÓ, D.; Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters. **Fresenius J. Anal. Chem.**, 371 (4) (2001) 437-447.
- ALMEIDA, C.; ROSÁRIO, P.; SERÔDIO, P.; NOGUEIRA, J. M. F.; **Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica**, 69-77, 2008.
- ALVES, R.C.; ALMEIDA, I.M.C.; CASAL, S.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; Method development and validation for isoflavones quantification in coffee. **Food Chemistry**, 122 (2010) 914-919.
- AUWERTER, L. C. C.; WANCZINSKI, A. E.; CHIANDOTTI, R. S.; Development of an analytical method to quantify total isoflavones in phytotherapeutic capsules using high-performance liquid chromatography. **Rev. Bras. Farmacogn.**, 22(6) (2012) 1344-1348.
- BACALONI, A., CAVALIERE, C., FABERI, A., FOGLIA, P., SAMPERI, R., LAGANÀ, A; Determination of isoflavones and coumestrol in river water and domestic wastewater sewage treatment plants. **Analytica. Chimica. Acta** 531 (2005), 229-237.
- BAIRD, C.; **Química Ambiental**, 2a ed., Bookman: Porto Alegre, 2002, cap. 6 e 7.
- BALSIGER, H. A.; TORRE, R.; LEE, W.-Y.; COX, M. B., A four-hour yeast bioassay for the direct measure of estrogenic activity in wastewater without sample extraction, concentration, or sterilization. **Sci. Total Environ**, 408 (2010) 1422-9.
- BARCELÓ, D.; ALDA, M. J. L.; DÍAZ-CRUZ, S., Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. **J. Chromatogr. A**, 1000 (1-2) (2003) 503-26.

- BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica - Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Quim.Nova**, 25(5), 856-865, **2002**.
- BENNETTS, H. W.; UNDERWOOD, E. J.; SHIER, F.L., A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. **Aust. Vet.J.**, 22 (**1946**) 2-12.
- BEZERRA, D. S. S., Estrógenos na bacia hidrográfica Tietê-Jacaré: ocorrência e avaliação do impacto ambiental, tese de doutorado, 201p, Araraquara, 2014.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M.; Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, 30 (3) (**2007**) 651-666.
- BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N.; Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes, 1st ed., IWA Publishing, Lewis Publishers CRC Press LLC: USA, **2003**.
- BOYD, G. R.; REEMTSMA, H.; GRIMM, D. A.; MITRA, S., Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. **Sci. Total Environ.**, 311(1-3) (**2003**) 135-49.
- BRASIL, ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução RE nº 899, de 29/05/2003. (Acesso disponível em 20/11/2014.)
- BRASIL. INMETRO – INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Brasília, DF, 2010. 35 p.. (Acesso disponível em 30/11/2014.)
- BUSTAMANTE-RANGEL, M.; DELGADO-ZAMARREÑO, CARABIAS-MARTÍNEZ, M.M.; DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ, R. J.; Analysis of isoflavones in soy drink by capillary zone electrophoresis coupled with electrospray ionization mass spectrometry with electrospray ionization mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 709 (**2012**) 113–119.
- CARLSEN, E.; GIWERCMAN, A.; KEIDING, N.; SKAKKEBAEK, N., Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. **British Medical J.**, 305 (6854) (**1992**) 609-613.
- CAVASSANI, Thiago Bernardo. Avaliação da ocorrência de fitoestrógenos de soja em efluentes de estação de tratamento de esgoto, água superficial e subterrânea da cidade de Araraquara. Araraquara: [s.n], **2010**.
- CEC - Commission of the European communities. On the implementation of the Community strategy for endocrine disrupters - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. Communication from the commission to the council and the European parliament, Brussels, COM(2001) 262 final, **2001**.
- CÉSAR, I. da C.; BRAGA, F. C.; VIANNA-SOARES, C. D.; NUNAN, E. de A.; PIANETTI, G. A.; MOREIRA-CAMPOS, L. M., Quantitation of genistein and genistin in soy dry extracts by UV-Visible spectrophotometric method. **Quim. Nova**, 31 (8) (**2008**) 1933-1936.

CHANG, C.-C., HUANG, S.-D., Determination of the steroid hormone levels in water samples by dispersive liquid–liquid microextraction with solidification of a floating organic drop followed by high-performance liquid chromatography, **Anal. Chim. Acta** 662 (2010) 39–43.

CHIARADIA, M. C., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F.; O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à Espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Quim. Nova**, 31 (3), (2008) 623-636.

CIOFI, D., FIBBI, U., CHIUMINATTO, E., COPPINI, L.; Fully-automated on-line solid phase extraction coupled to high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric analysis at sub-ng/L levels of selected estrogens in surface water and wastewater, **J. Chromatogr. A**. 1283 (2013) 53–61.

Codex Alimentarius Commission on Methods of Analysis and Sampling; Criteria for Evaluating Acceptable Methods of Analysis for Codex Purposes, CX/MAS 95/3, 1995.

COLLINS, C.H; BRAGA, G.L.; BONATO, P.L. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7.ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1997. 279p.

COLUCCI, M. S.; TOPP, E.; Persistence of estrogenic hormones in agricultural soils: I. 17 β -estradiol and estrona. **J. Environ. Qual.**, 30 (2001) 2070-2080.

CORDEIRO, D., Uso de bioindicador de efeito endócrino e validação do método para determinação de hormônios na água da Represa Municipal de São José do Rio Preto, SP, dissertação de mestrado, São Carlos, 2009.

DAI Q, FRANKE A A, JIN F, SHU X O, HEBERT J R, CUSTER L J, CHENG J R, GAO Y T, ZHENG W., Urinary Excretion of Phytoestrogens and Risk of Breast Cancer among Chinese Women in Shanghai. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, 11 (2002) 815–821.

DALLEGRAVE, A., Determinação de hormônios estrógenos e progestágenos em amostras ambientais por GC-MS, dissertação de mestrado, 112p., Porto Alegre, 2012.

DE 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 estrogen receptor subtypes alpha and beta. **J. Pharmacol. Biomed. Anal.** 34 (2004) 671-679.

DESBROW, C.; ROUTLEDGE, E. J.; BRIGHTY, G. C.; SUMPTER, J. P.; WALDOCK, M.; Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. **Environ. Sci. Technol.** 32(11) (1998) 1549-1558.

European Workshop on Endocrine Disrupters, European ED workshop, Aronsborg (Balsa) Sweden, 2001.

FARABEE, M. J., (2001), The endocrine system. Disponível em www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/biobk/BioBookENDOCR.html.

FARRÉ, M.; GROS, M.; HERNANDEZ, B.; PETROVIC, M.; HANCOCK, P.; BARCELO, D., Analysis of biologically active compounds in water by ultra-performance liquid chromatography

- quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** 22 (1) (2008), 41–51.
- FERNÁNDEZ, N. J.J.; GARCÍA, M. J.; DIEZ, M. T., Rapid high performance liquid chromatographic assay of ethinylestradiol in rabbit plasma. **J. Chromatogr. Biomed. Applic.**, 619 (1993) 143-147.
- GADD, J. B.; TREMBLAY, L. A.; NORTHCOTT, G. L., Steroid estrogens, conjugated estrogens and estrogenic activity in farm dairy shed effluents. **Environ. Pollut.**, 158(3) (2010) 730-6.
- GATTI, R.; GIOIA, M. G.; DI PIETRA, A. M.; CAVRINI, V., HPLC-fluorescence determination of unconjugated estrogens in pharmaceuticals. **J. Pharmacol. Biomed. Anal.**, 18 (1-2) (1998) 187-192.
- GATTI, R.; GOTTI, R.; GIOIA, M. G.; CAVRINI, V., HPLC analysis of pharmaceutical estrogens in raw materials and dosage forms. **J. Pharmacol. Biomed. Anal.**, 17(2) (1998) 337-347.
- GAFFNEY, V. de J. *et al.* Análise de fármacos em águas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS. **Quím. Nova**, 37(2014), 1138-149.
- GHISELLI, G.; JARDIM, W. F.; Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, 30 (3) (2007) 695-706.
- GIESE, R. W., Measurement of endogenous estrogens: analytical challenges and recent advances. **J. Chromatogr. A**, 1000(2003) 401-412.
- GIROTTI, G., NOGUEIRA, K. L., MOURA, J. A., SOUZA, J. B., GIACOMETTI, L. L., MARCHI, M. R.R., e TOGNOLLI, J. O.. Estrógenos em água: otimização da extração em fase sólida utilizando ferramentas quimiométricas. **Eclética Química**, 32(2), 61-67, 2007.
- GOMES, L. R.; SCRIMSHAW, D. M.; LESTER, J. N.; Determination of endocrine disrupters in sewage treatment and receiving Waters. **Trends Anal. Chem.**, 22 (2003) 697-706.
- GREEN, J. M. Peer Reviewed: A Practical Guide to Analytical Method Validation. **Anal. Chem.**, 68(9) (1996) 305A-309A.
- GROB, R. L., *Chromatographic Analysis of the Environment*, 2nd ed., Marcel Dekker: New York, 1983.
- GUILLETTE, L. J. J.; PICKFORD, D. B.; CRAIN, D. A.; ROONEY, A. A.; PERCIVAL, H. F., Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. **Gen. Comp. Endocrinol.**, 101 (1996) 32-42.
- HALLING-SØRENSEN, B.; NIELSEN, S. N.; LANZKY, P. F.; INGERSLEV, F.; HOLTEN-LÜTZHØFT, H. C.; JØRGENSEN, S. E., Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-a review. **Chemosphere**, 36 (2) (1998) 357-93.

HE, F.-J.; CHEN, J.-Q.; Consumption of soybean, soy foods, soy isoflavones and breast cancer incidence: Differences between Chinese women and women in Western countries and possible mechanisms. *Food Science and Human Wellness*, 2 (2013) 146–161.

HEDENMO, M.; ERIKSSON, B.-M., Liquid chromatographic determination of the macrolide antibiotics roxithromycin and clarithromycin in plasma by automated solid-phase extraction and electrochemical detection. *J. Chromatogr. A*, 692(1-2) (1995) 161-166.

HOERGER, C. C.; WETTSTEIN, F. E.; HUNGERBÜHLER, K.; BUCHELI, T. D.; Occurrence and Origin of Estrogenic Isoflavones in Swiss River Waters. *Environ. Sci. Technol.*, 43 (2009) 6151–6157.

<http://www.joaopessoahistorica.com/2011/05/croquis-de-joao-pessoa.html>, acesso disponível em maio de 2015.

HUBER, L., Validation of analytical methods: review and strategy. *LC-GC Int.*, 11 (1998) 96-105.

INGRAND, V.; HERRY, G.; BEAUSSE, J.; ROUBIN, M., Analysis of steroid hormones in effluents of wastewater treatment plants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1020 (1) (2003) 99-104.

International Conference on Harmonisation (ICH); Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.

International Programme on Chemical Safety (IPCS); *Global Assessment of the State-of-Science of Endocrine Disruptors*, Geneva, 2002.

JOBLING, S.; NOLAN, M.; TYLER, C. R.; BRIGHTY, G.; SUMPTER, J. P., Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ.Sci. Technol.* 32 (1998) 2498-2506.

JOHNSON, A. C.; BELFROID, A.; DI CORCIA, A., Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent *Sci. Total Environ.*, 256 (2000) 163-73.

KAO, Y. C.; ZHOU, C.; SHERMAN, M.; LAUGHTON, C. A.; CHEN, S., Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: a site directed mutagenicity study. *Environ. Health Perspect.* 106(2) (1998) 85-92.

KAWAGUCHI M, ISHII Y, SAKUI N, OKANOUCI N, ITO R, INOUE K, Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry in the multi-shot mode for determination of estrogens in river water samples. *J Chromatogr A* 1049, (2004), 1–8.

KUSTER, M.; AZEVEDO, D. A.; DE ALDA, M.J.L.; AQUINO NETO, F.R.; BARCELÓ, D.; Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). *Environ. Int.*, 35 (2009) 997-1003.

- LAGANÀ, A., BACALONI, A., DE 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** 501 (2004), 79–88.
- LAGANÀ, A.; BACALONI, A.; CAVALIERI, C., I.; FABERI, A.; FOGLIA, P.; SAMPERI, R.; Determination of isoflavones and coumestrol in river water and domestic wastewater sewage treatment plants. **Analytica Chimica Acta**, 531 (2005) 229-237.
- 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. **Environ. Sci. Technol.** 34 (2000) 3890-3894.
- LANÇAS, F. M.; **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas-SP : Átomo, 2009.
- LIMA, D. L.D., SILVA, C. P., OTERO, M., ESTEVES, V. I.; Low cost methodology for estrogens monitoring in water samples using dispersive liquid–liquid micro extraction and HPLC with fluorescence detection, **Talanta** 115 (2013) 980–985.
- LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A.; Endocrine disruptors in the environment - (IUPAC Technical Report). **Pure Appl. Chem.**, 75 (5) (2003) 631-681.
- LISKA, I., Fifty Years of Solid-Phase Extraction in Water Analysis– historical development and overview. **J. Chromatography A**, 885 (2000) 3-16.
- LIU, Z.; KANJO, Y.; MIZUTANI, S.; A review of phytoestrogens: Their occurrence and fate in the environment. **Water Research**, 44 (2011) 567 – 577.
- LOEWE, S.; LANGE, F.; Spohr E Uber. Weilich sexual hormone (thelytropine). **Biochem Zeitschr.** 180 (1927) 1-26.
- LOPES, L. G.; MARCHI, M. R. R.; SOUZA, J. B. G.; MOURA, J. A.; LORENZON, C. S.; CRUZ, C.; AMARAL, L. A. Estrogênios em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal - São Paulo. **Química Nova**, 33(3) (2010) 639-643.
- LUCCI, P., O., NÚÑEZ, M.T. G., Solid-phase extraction using molecularly imprinted polymer for selective extraction of natural synthetic estrogens from aqueous samples, **J. Chromatogr.** 1218 (2011) 4828–4833.
- MANAHAN, S. E.; **Fundamentals of Environmental Chemistry**, 2nd ed., Lewis Publishers CRC Press LLC: USA, 2001.
- MANAHAN, S.E.; **Toxicological Chemistry and Biochemistry**, 3rd ed., Lewis Publishers: Boca Raton, 2003.
- 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-nitrobenzoylchloride. **Anal. Chim. Acta**, 522 (2004) 241-246.

- MATSUMOTO, D., KOTANI, A., HAKAMATA, H., TAKAHASHI, K., Kusu, F.; Column switching high-performance liquid chromatography with two channels electrochemical detection for high-sensitive determination of isoflavones. **Journal of Chromatography A**, 1217 (2010) 2986–2989.
- 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 beta-diketonate europium chelate. **J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.**, 773(2) (2002) 135-142.
- MCMMASTER, M.; LC/MS: A Practical User's Guide. editor: Wiley-Interscience, 2005.
- MOREIRA, Davi Silva, Desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia/espectrometria de massas para avaliação da ocorrência de perturbadores endócrinos em mananciais de abastecimento da região metropolitana de belo horizonte, dissertação de mestrado, 124p., Ouro Preto, 2008.
- NIESSEN, W.M.A.; Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. Terceira edição, (Chromatographic Science). Boca Raton: CRC Press, 2006. Acesso disponível em www.scietchromatographica.com, 2009 v. 1, n. 2.
- NOVAKOVI, J.; TVRZICKÁ, E.; PACÁKOVÁ, V., High-performance liquid-chromatographic determination of equine estrogens with ultraviolet absorbency and electrochemical detection. **J. Chromatogr. A**, 678 (2) (1994) 359-363.
- NUNES, G. S., SANTOS, T. C. R., BARCELÓ, D., PIMENTA, A. S., RIBEIRO, M. L.; Extração por fluido supercrítico de alguns inseticidas carbamatos em amostras de batata, com determinação por HPLC/fluorescência e confirmação por HPLC/espectrometria de massas. **Quím. Nova**. 25(2) (2002) 214-220.
- PERES, T.B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**, 63 (2) (2002) 227-229.
- REID, J. J.; STITZEL, R. E.; HEAD, R. J., HPLC-ECD procedure for the measurement of O-methylation of catechol estrogens by vascular tissue. **J. Pharmacol. Methods**, 14(1) (1985) 25-39.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, (2004) 27(5), 771-780.
- RIBEIRO, C.; TIRITAN, M. E.; ROCHA, E.; ROCHA, M. J., Seasonal and spatial distribution of several endocrine disrupting compounds in Douro River estuary, Portugal. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 56 (1) (2009) 1–11.
- RICE, S.L., HALE, R.C.; Parameters for ultra-performance liquid chromatographic/tandem mass spectrometric analysis of selected androgens versus estrogens in aqueous matrices. **Anal. Chem.** 81 (2009) 6716–6724.
- ROCHA, M. J., CRUZEIRO, C., REIS, M., ROCHA, E., PARDAL, M.; Determination of seventeen endocrine disruptor compounds and their spatial and seasonal distribution in Ria Formosa Lagoon (Portugal). **Environ Monit Assess** 185 (2013) 8215–8226.

- ROCHA, M. J., CRUZEIRO, ROCHA. E.; Development and validation of a GC–MS method for the evaluation of 17 endocrine disruptor compounds, including phytoestrogens and sitosterol, in coastal waters – their spatial and seasonal levels in Porto costal region (Portugal). **Journal of Water and Health** 11-2 (2013), 281-296
- SANDERSON, H.; BRAIN, R. A.; JOHNSON, D. J.; WILSON, C. J.; SOLOMON, K. R., Toxicity classification and evaluation of four pharmaceuticals classes: antibiotics, antineoplastics, cardiovascular and sex hormones. **Toxicology**, 203 (1-3) (2004) 27-40.
- SANFILIPPO, K.; PINTOA, B.; COLOMBINIB, M. P.; BARTOLUCCIB, U.; REALIA, D.; Determination of trace endocrine disruptors in ultrapure water for laboratory use by the yeast estrogen screen (YES) and chemical analysis (GC/MS). **J. Chromatogr., B**, 878 (2010), 1190-1194.
- SCOTT, R. P. W.; **Techniques And Practice Of Chromatography**. Chromatographic Science, Vol. 70, Series. Marcel Dekker, Usa, 1995.
- SETAC – Society of Environmental Toxicology and Chemistry; *Endocrine Disruptors and Modulators*, Pensacola, 2000.
- SHABIR, G. A., Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **J. Chromatogr. A**, 987 (1-2) (2003) 57-66.
- SHIMADA, K.; MITAMURA, K.; HIGASHI, T., Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids. **J. Chromatogr. A**, 935 (2001) 141-172.
- 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. **J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.** 223 (1981) 33-39.
- SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H.; Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, 34 (4), 665-676, 2011.
- SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J. **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8ª ed. Norte-Americana, Thomson Learning Ltda, 2006.
- SNOW, D.D., DAMON-POWELL, T., ONANONG, S., CASSADA, D.A.; Sensitive and simplified analysis of natural and synthetic steroids in water and solids using on-line solid-phase extraction and microwave-assisted solvent extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry atmospheric pressure photoionization, **Anal. Bioanal. Chem.** 405 (2013) 1759–1771.
- SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J., GLAJCH, J. L.; **Practical HPLC Method Development**. Editora: Wiley & Sons, 2ª edição, 1997, ISBN: 0-471-00703X.

- SODRÉ F.; LOCATELLI M.; MONTAGNER C.; JARDIM W. Origem e destino de interferentes endócrinos em águas naturais. *Caderno Temático, Universidade Estadual de Campinas*, v. 6, 27p , 2007.
- SOUZA, N. C. de. Avaliação de micropoluentes emergentes em esgotos e águas superficiais. 2011. 166 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil - Saneamento Ambiental) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.
- STAFIEJ, A., PYRZYNSKA, K. e REGAN, F.; Determination of anti-inflammatory drugs and estrogens in water by HPLC with UV detection, **J. Sep. Sci.** 30 (2007), 985–991.
- SUMPTER, J. P. **Toxicology Letters**. Feminized responses in fish to environmental estrogens. 82-83 (1995) 737-742,
- SUMPTER, J. P.; JOBLING, S., Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. **Environ. Health Perspect.**, 103 (1995) 173-178.
- SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S., Validação de métodos cromatográficos. **Pharm. Technol.** 2 (3) (1998) 12-20.
- TEKEL, J., DAESELEIRE, E., HEEREMANS, A., VAN PETEGHEM C., Development of a Simple Method for the Determination of Genistein, Daidzein, Biochanin A, and Formononetin (Biochanin B) in Human Urine. **J. Agric. Food Chem.**, 47 (9) (1999) 3489-3494.
- TERNES, T. A.; KRECKEL, P.; MUELLER, J., Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants--II. Aerobic batch experiments with activated sludge. **Sci. Total Environ.**, 225 (1-2) (1999) 91-99.
- TERNES, T. A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERES, K.; WILKEN, R.-D.; SERVO, M., Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants -- I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **Sci. Total Environ.**, 225 (1999) 81.
- TORO-FUNES, N.; ODRIOZOLA-SERRANO, I.; BOSCH-FUSTE, J.; LATORRE-MORATALLA, M.L.; VECIANA-NOGUES, M.T.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VIDAL-CAROU, M.C., Fast simultaneous determination of free and conjugated isoflavones in soy milk by UHPLC–UV. **Food Chemistry**, 135 (2012) 2832–2838.
- USEPA. *United States Environmental Protection Agency* – <http://www.epa.gov/esd/bios/pdf/contaminants-biosolids2.pdf>, acesso disponível em outubro de 2011.
- VÉKEY, K.; Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **J. Chromatogr., A** 921 (2001), 227-236.
- VERBINNEN, R. T.; GILVANDA, S. N.; VIEIRA, E. M.; Determinação de hormônios estrógenos em água potável usando CLAE-DAD. **Quim. Nova**, 33 (9), 2010, 1837-1842.
- VERDRENGH, M. *et al.*, Phytoestrogen genistein as an anti-staphylococcal agent. **Microbes Infect.**, 6(1) (2004) 86-92.

VIGLINO, L., ABOULFADL, K., PRÉVOST, M., SAUVÉ, S.; Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using online preconcentration coupled with LC–APPI-MS/MS, **Talanta** 76 (2008), 1088–1096.

WALZ, E. Isoflavon- und saponin-glucoside in Soja-Hispida. Justus Liebigs. **Ann. Chem.** 489 (1931) 118-155.

WANG, L., CAY, Q-I, HE, B., YUAN, C.-G., SHEN, SHAO, D.-Z., J., et al.; Determination of estrogens in water by HPLC–UV using cloud point extraction, **Talanta** 70 (2006), 47–51.

WHITLAM, J. B.; VINE, J. H.; Quantitation of ibuprofen in biological fluids by gas chromatography—mass spectrometry. **J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.**, 181, (1980) 463-468.

WRc-NSF Ref: UC 6052; Study on the Scientific Evaluation of 12 Substances in the Context of Endocrine Disrupter Priority List of Actions, European Commission, 2002.

YANAKA, K.; TAKEBAYASHI, J.; MATSUMOTO, T.; ISHIMI, Y. J.; Determination of 15 Isoflavone Isomers in Soy Foods and Supplements by High-Performance Liquid Chromatography. **Agric. Food Chem.**, 60 (2012) 4012–4016.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Espectros em três dimensões, na faixa de 190 a 800 nm (recorte da faixa de 200 a 350 nm) dos seis fitoestrógenos, obtidos em uma corrida cromatográfica com o método HPLC-DAD, de um MIX de 20 mg L⁻¹ dos seis fitoestrógenos

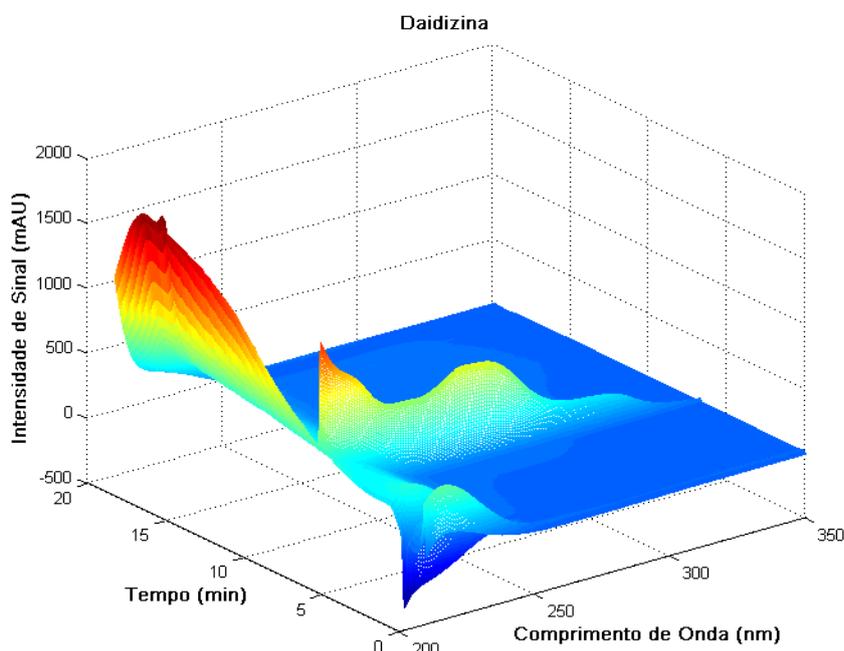


Figura A-1 - Cromatograma em três dimensões da daidizina, obtido relacionando intensidade de sinal analítico (mAu) versus tempo de corrida (minutos) versus comprimento de onda (nm), de uma corrida cromatográfica realizada com o método HPLC-DAD de um mix de 20,0 mg L⁻¹.

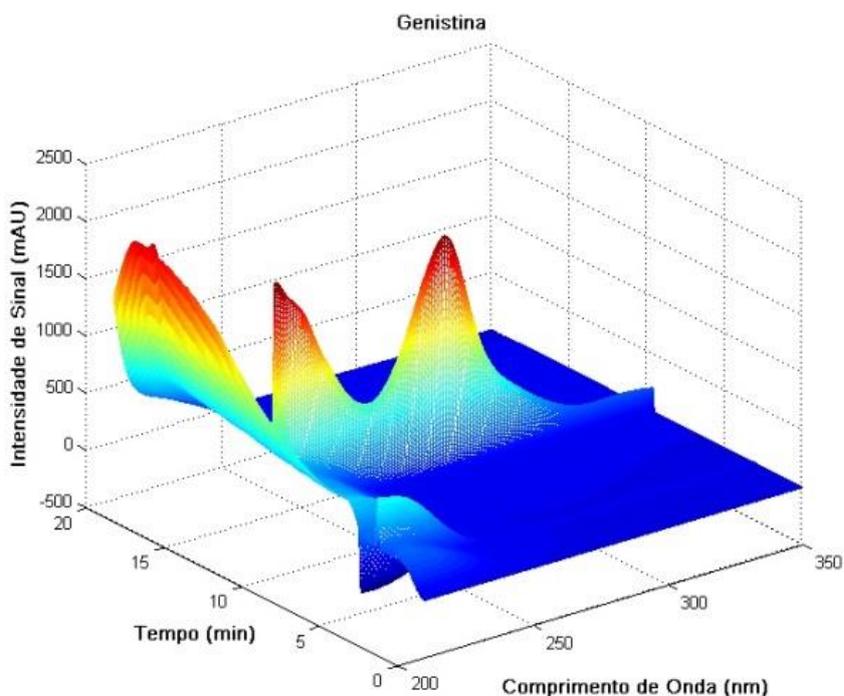


Figura A-2 - Cromatograma em três dimensões da genistina, obtido relacionando intensidade de sinal analítico (mAu) versus tempo de corrida (minutos) versus comprimento de onda (nm), de uma corrida cromatográfica realizada com o método HPLC-DAD de um mix de 20,0 mg L⁻¹.

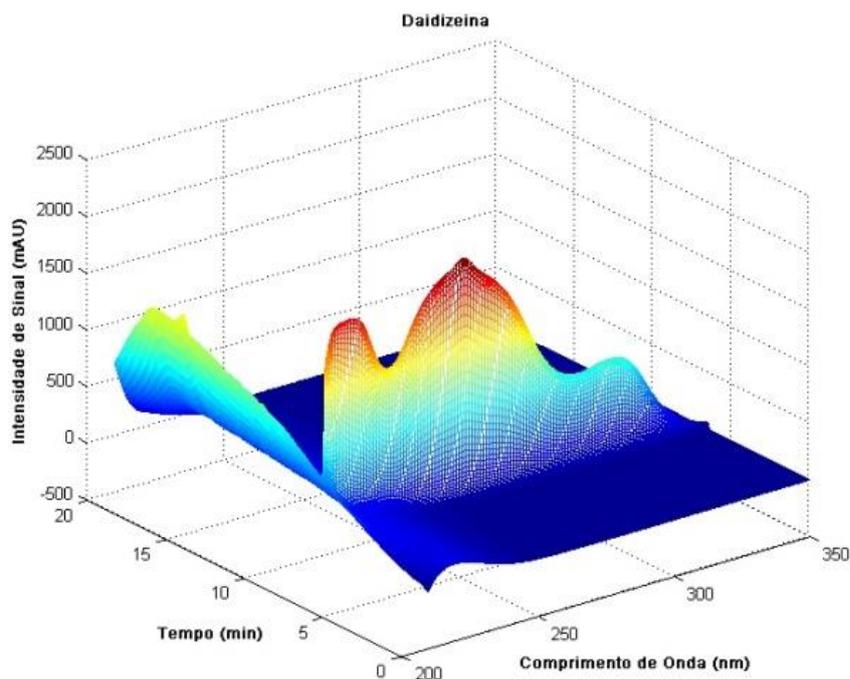


Figura A-3: Cromatograma em três dimensões da daidizeína, obtido relacionando intensidade de sinal analítico (mAu) versus tempo de corrida (minutos) versus comprimento de onda (nm), de uma corrida cromatográfica realizada com o método HPLC-DAD de um mix de $20,0 \text{ mg L}^{-1}$.

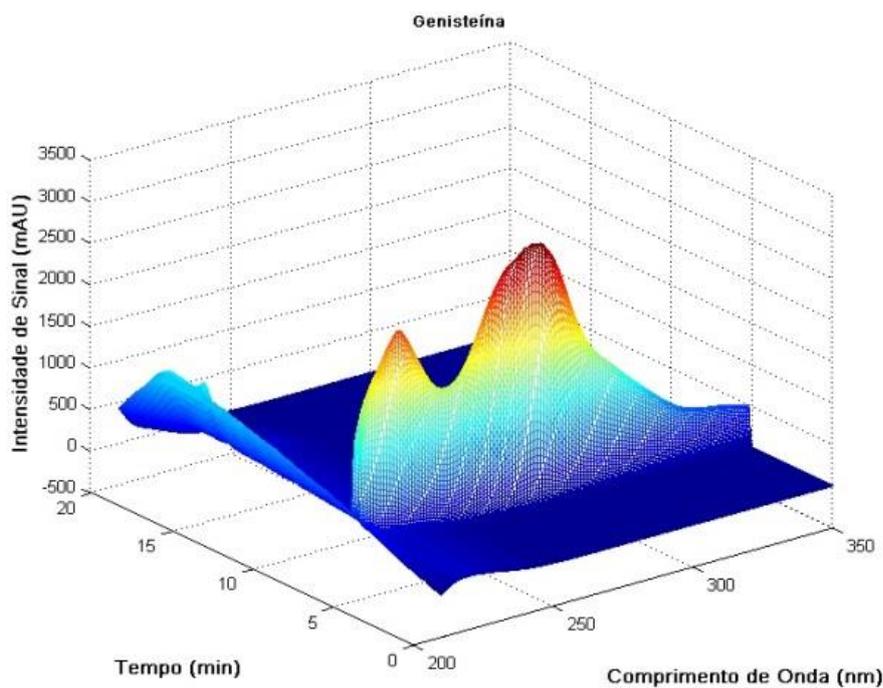


Figura A-4: Cromatograma em três dimensões da genisteína, obtido relacionando intensidade de sinal analítico (mAu) versus tempo de corrida (minutos) versus comprimento de onda (nm), de uma corrida cromatográfica realizada com o método HPLC-DAD de um mix de $20,0 \text{ mg L}^{-1}$.

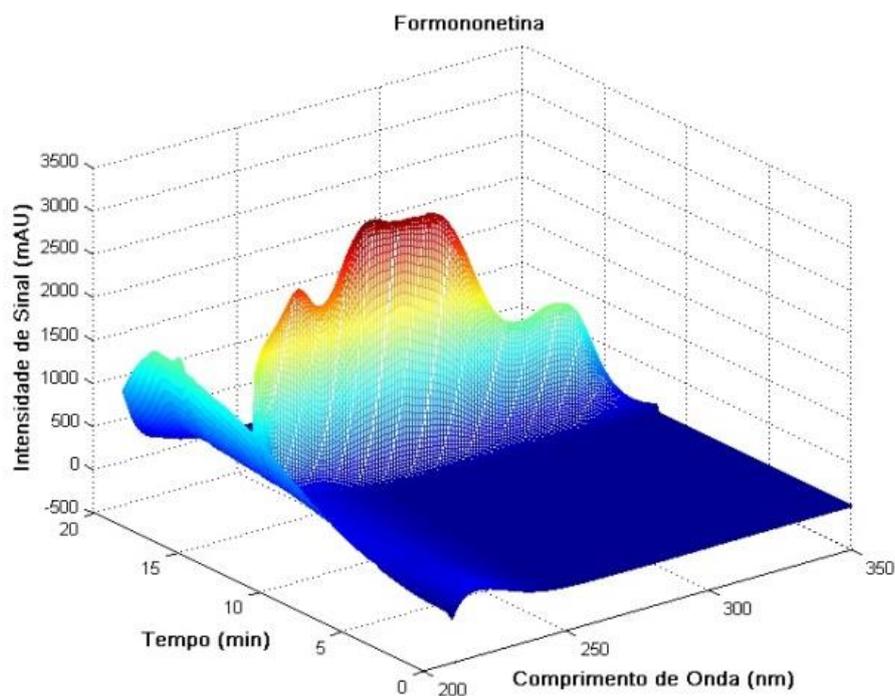


Figura A-5 - Cromatograma em três dimensões da formononetina, obtido relacionando intensidade de sinal analítico (mAu) versus tempo de corrida (minutos) versus comprimento de onda (nm), de uma corrida cromatográfica realizada com o método HPLC-DAD de um mix de 20,0 mg L⁻¹.

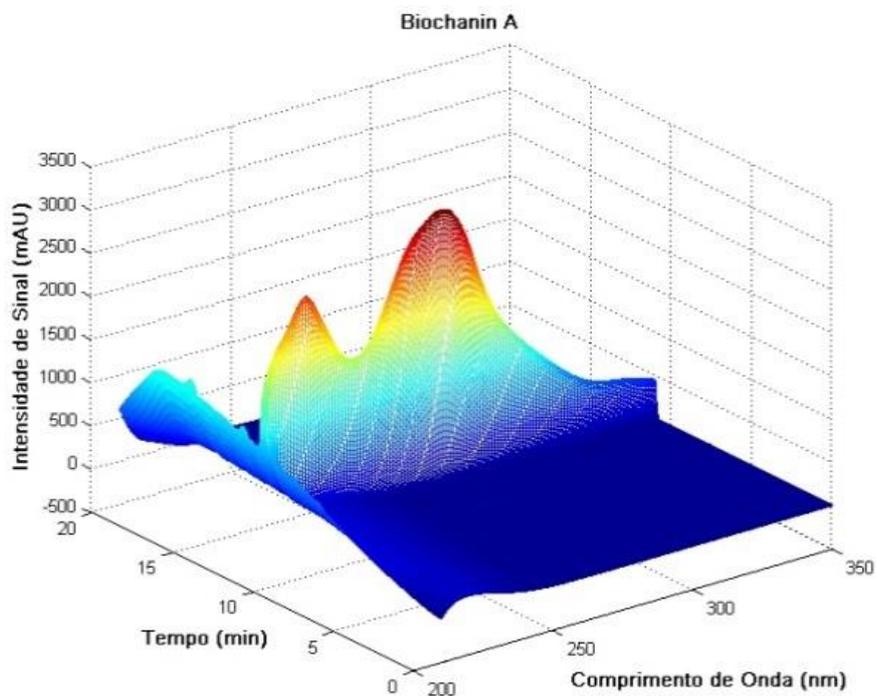


Figura A-6 - Cromatograma em três dimensões da biochanin A, obtido relacionando intensidade de sinal analítico (mAu) versus tempo de corrida (minutos) versus comprimento de onda (nm), de uma corrida cromatográfica realizada com o método HPLC-DAD de um mix de 20,0 mg L⁻¹.

APÊNDICE B – Cromatogramas dos doze experimentos realizados de acordo com o planejamento experimental mostrado na Tabela 3.2, para HPLC-FLU e HPLC-DAD com modificações, para definição dos parâmetros de vazão, temperatura e valor de pH.

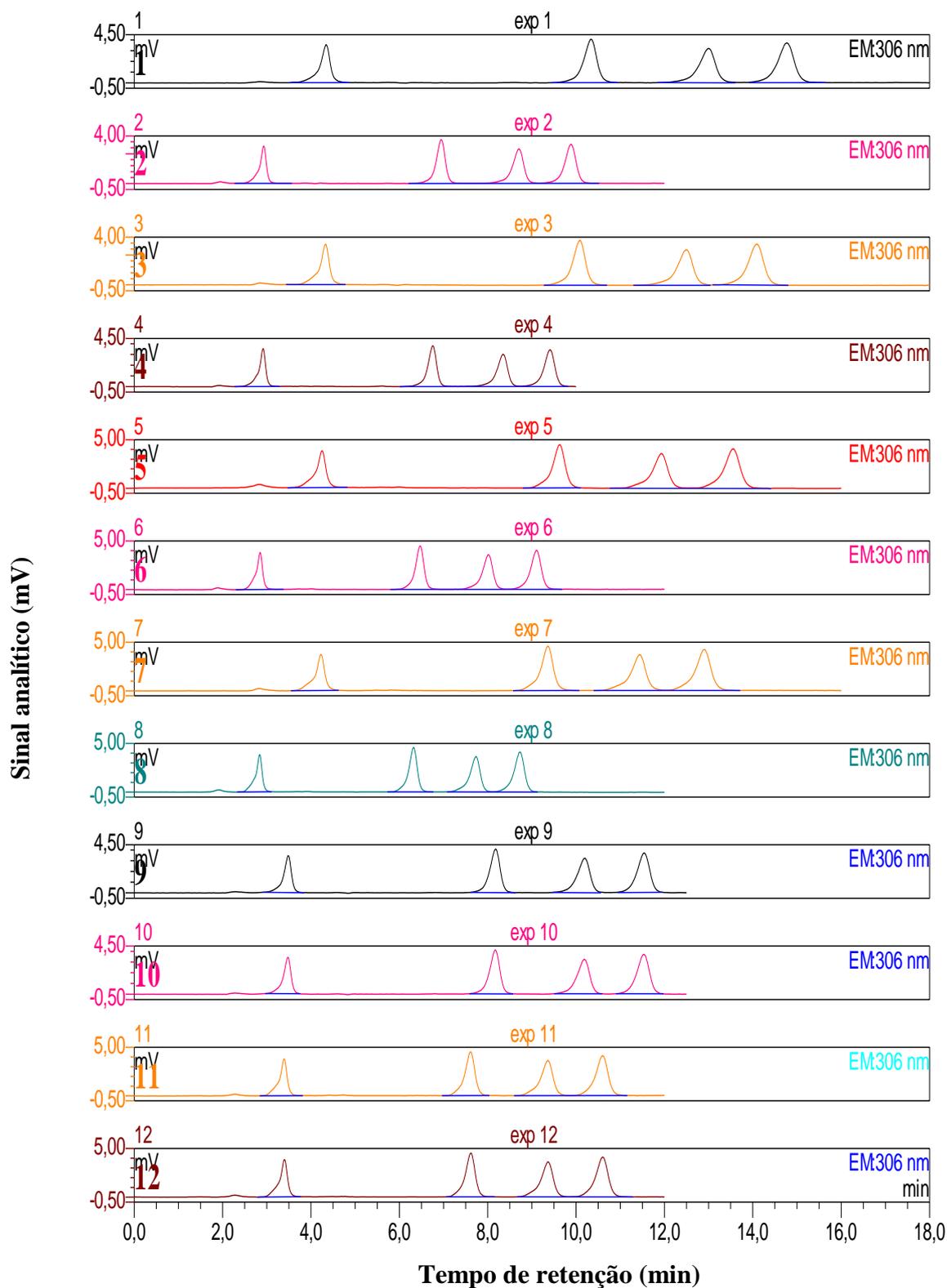


Figura B.1 - Cromatogramas dos doze experimentos realizados de acordo com o planejamento experimental mostrado na Tabela 3.2, por HPLC-FLU com modificações. (Fonte: elaborada pela autora).

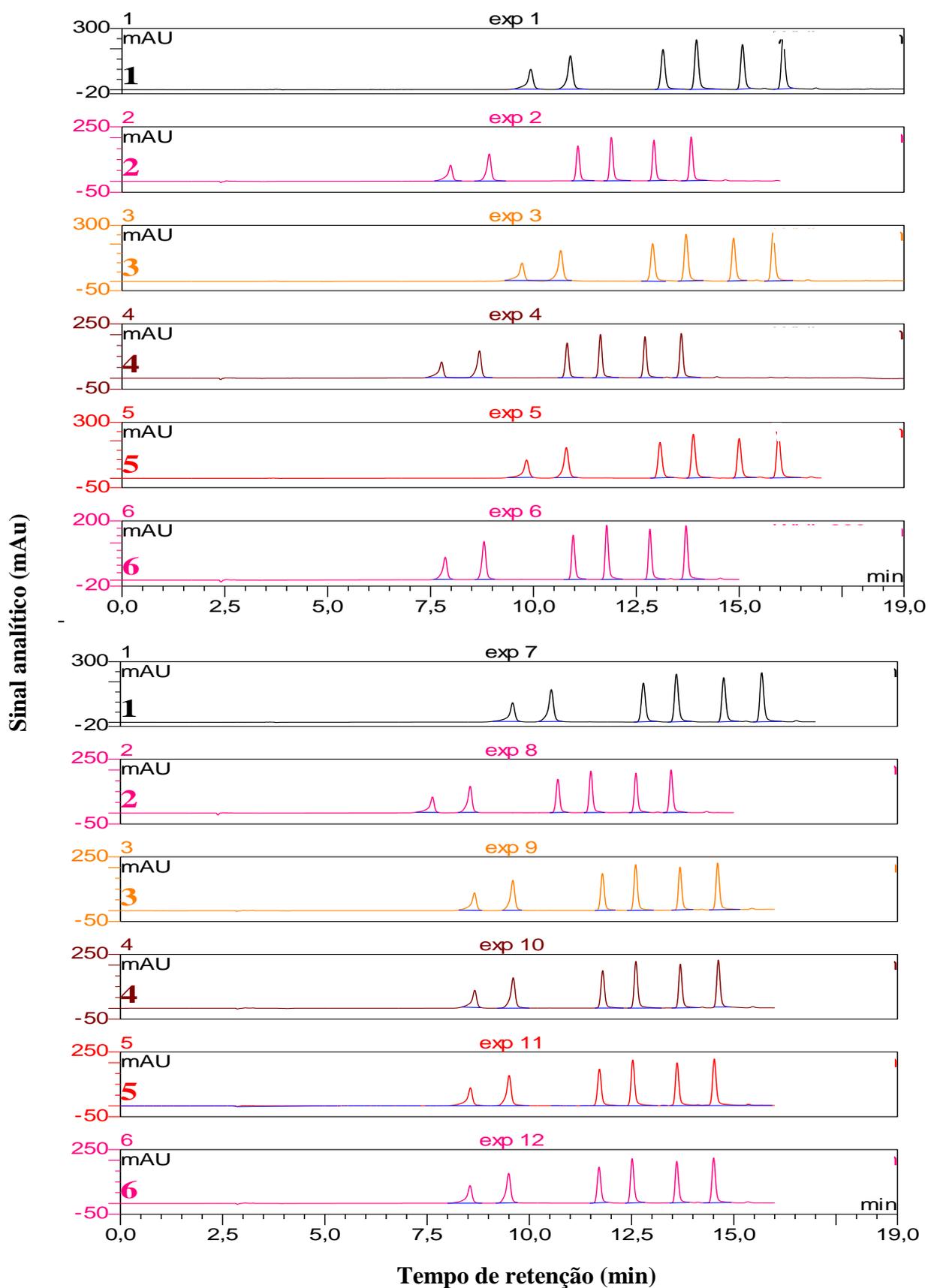


Figura B.2 - Cromatogramas dos doze experimentos realizados de acordo com o planejamento experimental mostrado na [Tabela 3.2](#), por HPLC-DAD com modificações. (Fonte: elaborada pela autora).

Apêndice C - Resultados da análise de variância (ANOVA) para os dez analitos estudados**Tabela C.1** - Dados da ANOVA para a daidizina.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	Teste F
Regressão (R)	261,9380	1	261,938	Significância de R
Resíduos (r)	0,4405	16	0,0275	MQ_R/MQ_r 9513,4
Falta de Ajuste (faj)	0,1141	4	0,0285	Falta de ajuste
Erro Puro (ep)	0,1265	12	0,0105	MQ_{faj}/MQ_{ep} 2,7058

Tabela C.2 - Dados da ANOVA para a genisteína.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	Teste F
Regressão (R)	723,2590	1	723,259	Significância de R
Resíduos (r)	6,1147	16	0,3821	MQ_R/MQ_r 1892,50
Falta de Ajuste (faj)	0,3569	4	0,0892	Falta de ajuste
Erro Puro (ep)	0,4217	12	0,0351	MQ_{faj}/MQ_{ep} 2,5390

Tabela C.3 - Dados da ANOVA para a genistina.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	Teste F
Regressão (R)	648,9320	1	648,932	Significância de R
Resíduos (r)	1,3437	16	0,0839	MQ_R/MQ_r 7727,11
Falta de Ajuste (faj)	0,2569	4	0,0642	Falta de ajuste
Erro Puro (ep)	0,2868	12	0,0239	MQ_{faj}/MQ_{ep} 2,6872

Tabela C.4 - Dados da ANOVA para a daidizeína.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	Teste F
Regressão (R)	847,5740	1	847,574	Significância de R
Resíduos (r)	4,1306	16	0,2581	MQ_R/MQ_r 3283,12
Falta de Ajuste (faj)	0,3409	4	0,0852	Falta de ajuste
Erro Puro (ep)	0,4897	12	0,0408	MQ_{faj}/MQ_{ep} 2,0886

Tabela C.5 - Dados da ANOVA para a formononetina.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	Teste F
Regressão (R)	726,9000	1	726,9	Significância de R
Resíduos (r)	4,1341	16	0,2583	MQ_R/MQ_r 2813,298
Falta de Ajuste (faj)	0,1768	4	0,0442	Falta de ajuste
Erro Puro (ep)	0,3864	12	0,0322	MQ_{faj}/MQ_{ep} 1,3727

Tabela C. 6 - Dados da ANOVA para a biochanin A.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	Teste F
Regressão (R)	923,8530	1	923,853	Significância de R
Resíduos (r)	8,3638	16	0,5227375	MQ_R/MQ_r 1767,34
Falta de Ajuste (faj)	0,3156	4	0,0789	Falta de ajuste
Erro Puro (ep)	0,4482	12	0,03735	MQ_{faj}/MQ_{ep} 2,1124

Tabela C. 7 - Dados da ANOVA para o estriol.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	Teste F
Regressão (R)	3,4731	1	3,4730	Significância de R
Resíduos (r)	0,0070	16	0,0004344	MQ_R/MQ_r 7994,26
Falta de Ajuste (faj)	0,0021	4	0,0005211	Falta de ajuste
Erro Puro (ep)	0,0049	12	0,0004055	MQ_{faj}/MQ_{ep} 1,2849

Tabela C. 8 - Dados da ANOVA para a estrona.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	Teste F
Regressão (R)	0,5367	1	0,5366	Significância de R
Resíduos (r)	0,0015	16	9,686E-05	MQ_R/MQ_r 5540,87
Falta de Ajuste (faj)	0,0001	4	3,743E-05	Falta de ajuste
Erro Puro (ep)	0,0014	12	0,0001167	MQ_{faj}/MQ_{ep} 0,3208

Tabela C.9 - Dados da ANOVA para o 17 β -estradiol.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	Teste F
Regressão (R)	2,7675	1	2,7674	Significância de R
Resíduos (r)	0,0064	16	0,0003977	MQ_R/MQ_r 6958,6
Falta de Ajuste (faj)	0,0019	4	0,0004742	Falta de ajuste
Erro Puro (ep)	0,0045	12	0,0003722	MQ_{faj}/MQ_{ep} 1,2738

Tabela C.10 - Dados da ANOVA para a 17 α -etinilestradiol.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	Teste F
Regressão (R)	3,0321	1	3,03208	Significância de R
Resíduos (r)	0,0124	16	0,0007732	MQ_R/MQ_r 3921,12
Falta de Ajuste (faj)	0,0058	4	0,001459	Falta de ajuste
Erro Puro (ep)	0,0065	12	0,0005444	MQ_{faj}/MQ_{ep} 2,6811

APÊNDICE D – Valores de concentrações obtidas nas três campanhas amostrais

Tabela D.1 - Concentrações dos estrógenos e fitoestrógenos nas amostras coletadas no Rio Cuiá, na primeira campanha amostral realizada em julho de 2012.

Analitos	Concentração dos analitos por pontos de coleta			
	P1	P2	P3	P5
Estriol (ng L ⁻¹)	4,08	ND**	ND**	< LQ
17 β-estradiol (ng L ⁻¹)	ND**	< LQ	6,12	< LQ
17 α-etinilestradiol (ng L ⁻¹)	ND**	4,28	ND**	ND**
Estrona (ng L ⁻¹)	791	< LQ	404	< LQ
Daidzina (μg L ⁻¹)	89,1	11,7	11,7	14,6
Genistina (μg L ⁻¹)	132	ND**	134	8,49
Daidzeína (μg L ⁻¹)	112	55,4	75,4	65,2
Genisteína (μg L ⁻¹)	159	114	151	122
Formonetina (μg L ⁻¹)	266	24,6	45,8	53,1
Biochanin A (μg L ⁻¹)	30,0	ND**	ND**	ND**

*Fator de pré-concentração de 2857 vezes. ** Não detectado.

Tabela D.2 - Concentrações de estrógenos e fitoestrógenos nas amostras coletadas no Rio Cuiá, na segunda campanha amostral realizada em dezembro de 2012.

Analitos	Concentração dos analitos por pontos de coleta				
	P1	P2	P3	P4	P5
Estriol (ng L ⁻¹)	ND**	18,9	19,8	5,61	12,3
17 β-estradiol (ng L ⁻¹)	12,5	20,7	11,3	20,2	7,46
17 α-etinilestradiol (ng L ⁻¹)	31,6	21,1	14,1	9,44	12,8
Estrona (ng L ⁻¹)	646	< LQ	203	497	100
Daidzina (μg L ⁻¹)	45,8	28,1	33,0	62,2	12,1
Genistina (μg L ⁻¹)	44,4	2,34	ND**	35,1	53,8
Daidzeína (μg L ⁻¹)	47,0	70,0	78,8	130	633
Genisteína (μg L ⁻¹)	182	111	134	341	83,1
Formonetina (μg L ⁻¹)	ND**	29,4	117	152	639
Biochanin A (μg L ⁻¹)	ND**	ND**	ND**	ND**	61,3

*Fator de pré-concentração de 2857 vezes. ** Não detectado.

Tabela D.3 - Concentrações de estrógenos e fitoestrógenos nas amostras coletadas no Rio Cuia, na primeira campanha amostral, realizada em maio de 2013.

Analitos	Concentração dos analitos por pontos de coleta			
	P1	P2	P3	P5
Estriol (ng L ⁻¹)	7,19	7,86	< LQ	ND**
17 β-estradiol (ng L ⁻¹)	583	4.754	2.139	ND**
17 α-etinilestradiol (ng L ⁻¹)	183	3.296	437	ND**
Estrona (ng L ⁻¹)	327	3.053	583	< LQ
Daidzina (μg L ⁻¹)	115	14,9	2.210	63,2
Genistina (μg L ⁻¹)	150	4,43	10,0	3,58
Daidzeína (μg L ⁻¹)	49,9	57,2	272	63,2
Genisteína (μg L ⁻¹)	286	233	218	212
Formonetina (μg L ⁻¹)	433	371	751	183
Biochanin A (μg L ⁻¹)	630	262	940	1.198

* Fator de pré-concentração de 2857 vezes. ** Não detectado.