NÁDIA HORTENSE TORRES

Monitoração de resíduos dos hormônios 17α-etinilestradiol, 17β-estradiol e estriol em águas de abastecimento urbano da cidade de Piracicaba, SP

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo

Piracicaba
2009

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Torres, Nádia Hortense
Monitoração de resíduos dos hormônios 17α-etinilestradiol, 17β-estradiol e estriol em águas de abastecimento urbano da cidade de Piracicaba, SP / Nádia Hortense Torres; orientador Valdemar Luiz Tornisielo. - - Piracicaba, 2009.
83 f.: fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Água contaminada 2. Cromatografia líquida 3. Hormônios sexuais 4. Resíduos químicos I. Título

CDU 351.778.3:543.544.122

Aos meus pais, Vera e Mozart, pelo amor gratuito dedicado, e por me ensinarem que, mesmo com dificuldades, devemos seguir em frente, pois a vida continua.

Aos meus familiares de Americana, São Paulo e Borborema, por sempre me apoiarem em todas etapas da minha vida.

Aos meus grandes amigos, sempre presentes, nas horas alegres e tristes.

À DEUS e à Santa Maria, por guiarem meus caminhos sempre.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Valdemar Luiz Tornisielo por compartilhar suas experiências no âmbito científico e, principalmente, pela amizade construída ao longo do tempo.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura por colocar à disposição o Laboratório de Ecotoxicologia para a realização deste trabalho.

Ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

À Dra. Rosana Maria de Oliveira Freguglia pelo apoio, amizade e conhecimento científico transmitido nas pesquisas na área de cromatografia.

Ao técnico do laboratório Carlos Dorelli, pela experiência profissional compartilhada.

Ao estagiário Rodrigo Pimpinato pelas inúmeras risadas, por sua amizade e companheirismo no laboratório.

Aos meus colegas do Laboratório de Ecotoxicologia: Grazi, Rodrigo, Neide, Cida, Giu, Guilherme, Aderbal, Rosana, Marília, Marcela, Priscilla, Rafael, Paulo e Franz, pelas horas de amizade e companheirismo dedicadas.

À bibliotecária Marilia, Rafael, Cidinha e à Rosana pelas correções do trabalho.

Ao Luiz Fernando Romanholo Ferreira por seu amor, companheirismo e carinho.

Aos meus grandes amigos do CENA, Ana Carolina, Leila, Felipe, Tâmara e Vivian pelo apoio, companheirismo, amizade, inúmeras conversas e risadas.

À minha irmã, Mariana, por seu amor incondicional.

Aos meus pais, Mozart e Vera, pois, sem eles eu nada seria se não os tivessem ao meu lado.

"Impossível é apenas uma grande palavra/
usada por gente fraca que prefere viver/
no mundo como está em vez de usar o poder/
que tem para mudá-lo Impossível não é/
um fato é uma opinião. Impossível não é/
uma declaração. É um desafio. Impossível/
é hipotético. Impossível é temporário."

Bete Marques.

RESUMO

TORRES, N. H. **Monitoração de resíduos dos hormônios 17α-etinilestradiol, 17β-estradiol e estriol em águas de abastecimento urbano da cidade de Piracicaba, SP.** 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

A ocorrência de fármacos residuais no meio ambiente pode levar a efeitos adversos, tanto em organismos aquáticos como em terrestres. Os fármacos, tanto humanos como de uso veterinário, são absorvidos pelo organismo e estão sujeitos a reações metabólicas e, uma quantidade significativa dessas substâncias, tanto a original como seus metabólitos, são excretadas. Por não serem facilmente biodegradáveis, terem propriedades farmacológicas danosas quando administrados indevidamente, através de água contaminada, é crescente a preocupação com o destino destes fármacos residuais, principalmente com relação à avaliação de risco ambiental. A ocorrência destes resíduos, principalmente em águas superficiais e sistemas de abastecimento, vem sendo objeto de estudos em diversos países, principalmente na Europa. Por isso, a detecção, a eliminação e a investigação do destino destes compostos estrógenos em ecossistemas aquáticos têm tido prioridade na química ambiental. Estes produtos são encontrados nos corpos d'água em baixas concentrações, de μg L^{-1} a ηg L^{-1} e, mesmo assim, podem afetar os organismos por meio da bioacumulação. Estudos toxicológicos relacionados a efeitos crônicos em organismos expostos, são escassos. O objetivo do projeto foi adaptar e validar a metodologia analítica, e monitorar a presença de resíduos de hormônios nas águas dos Rios Corumbataí e Piracicaba e amostras de água de abastecimento da cidade de Piracicaba, SP, Brasil. Foram coletadas amostras de água bruta dos Rios Piracicaba e Corumbataí e água de abastecimento residencial da cidade de Piracicaba, SP, no período de novembro de 2007 a abril de 2009. Dentre os hormônios estudados estão o 17α-etinilestradiol (17α-EE2), 17β-estradiol (17β-E2) e estriol (E3). O método foi baseado na extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD).

Palavras-chave: Águas de abastecimento urbano. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Estriol (E3). 17β-estradiol (17β-E2). 17α-etinilestradiol (17α-EE2). Extração em fase sólida (SPE).

ABSTRACT

TORRES, N. H. **Monitoring of residues of hormones 17α-ethinylestradiol, 17β-estradiol and estriol in urban water supply from the city of Piracicaba, SP.** 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

The occurrence of drug residues in the environment may lead to adverse effects, both on land and aquatic organisms. The drugs, for human and veterinary use, are absorbed by the organism and are subjected to metabolic reactions and a significant amount of these substances, both the original and its metabolites are excreted. By being not easily biodegradable and by having harmful pharmacological properties when administered through contaminated water, there is a growing concern about the fate of these residual drugs, especially in respect to the assessment of environmental risks. The occurrence of these residues, especially in surface waters and water supplies has been the subject of studies in several countries, mainly in Europe. Therefore, detection, investigation and disposal of the fate of these estrogens compounds in aquatic ecosystems have a high priority in the field of environmental chemistry. These products are found in water bodies in low concentrations, from μg L^{-1} a ηg L^{-1} and can still affect the organisms due to bioaccumulation. Toxicological studies related to chronic effects in the exposed organisms are scarce. The goals of this project was to adapt and validate the analytical methodology, and monitor the presence of hormone residues in the waters of the Corumbataí and Piracicaba rivers and samples of water supply from the city of Piracicaba, SP, Brazil. We collected samples of raw water from the rivers of Piracicaba and Corumbataí and residential water supply from the city of Piracicaba in the period November 2007 to April 2009. Among the hormones studied are the 17α-ethinylestradiol (17α-EE2), 17β-estradiol (17β-E2) and estriol (E3). The method is based on solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC-DAD).

Keywords: Urban water supply. High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Estriol (E3). 17β-estradiol (17β-E2). 17α-ethinylestradiol (17α-EE2). Solid-Phase Extraction (SPE).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Níveis de hidrofilicidade e hidrofobicidade dos compostos farmacêuticos. 22
Figura 2 – Fórmula estrutural do E3 23
Figura 3 – Fórmula estrutural do 17α-EE2 23
Figura 4 – Fórmula estrutural do 17β-E2 24
Figura 5 – Etapas empregadas em SPE visando ao isolamento de um composto (ou classe de compostos) 33
Figura 6 – Localização da bacia do Rio Piracicaba 43
Figura 7 – Bacia do Rio Corumbataí 45
Figura 8 – Esquema ótico de um espectrofotômetro com detector de arranjo de diodos 50
Figura 9 – Ponto de coleta nos Rios Piracicaba e Corumbataí 52
Figura 10 – Espectro da molécula do estriol obtido por comprimento de onda de 230 nm 54
Figura 11 – Espectro da molécula do 17β-estradiol obtido por comprimento de onda de 230 nm 54
Figura 12 – Espectro da molécula do 17α-etinilestradiol obtido por comprimento de onda de 230 nm 54
Figura 13 - Câmara de vácuo utilizada para a extração e o procedimento de *clean-up* dos hormônios das amostras de água 55
Figura 14 – Cromatograma da amostra branco extraída conforme item 3.11.3, com indicação dos tempos de retenção dos padrões 57
Figura 15 – Amostra fortificada com padrão mix extraída conforme item 3.11.3 57
Figura 16 – Curva de calibração do E3 obtida pela injeção de 5 pontos 59
Figura 17 – Curva de calibração do 17β-E2 obtida pela injeção de 5 pontos 59
Figura 18 – Curva de calibração do 17α-EE2 obtida pela injeção de 5 pontos 59
Figura 19 – Cromatograma da recuperação obtida para os hormônios E3, 17β-E2 e 17α-EE2, obtido por HPLC para amostra de água fortificada no nível de 1,0 μg L^{-1} . 62
Figura 20 – Cromatograma da recuperação obtidas para os hormônios E3, 17β-E2 e 17α-EE2, obtido por HPLC para amostra de água fortificada no nível de 2,0 μg L^{-1} . 63
Figura 21 – Cromatograma da recuperação obtida para os hormônios E3, 17β-E2 e 17α-EE2, obtido por HPLC para amostras de água fortificada no nível 3,0 μg L^{-1} .. 63
Figura 22 – Cromatograma do mix do padrão contendo E3, 17α-EE2 e 17β-E2 na concentração de 0,5 μg L^{-1} 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas relevantes dos esteróides avaliados..... 24
Tabela 2 – Excreção diária (µg) de esteróides estrogênicos em humanos 32
Tabela 3 – Hormônios analisados por HPLC-DAD, com informações de pureza, fornecedor, grupo químico e fórmula molecular 51
Tabela 4 – Gradiente utilizado no HPLC-DAD 53
Tabela 5 – Condições cromatográficas do HPLC/DAD utilizadas para analise dos extratos de água 53
Tabela 6 – Equações da reta e os valores dos coeficientes de correlação (r^2) para o método cromatográfico aplicado ao E3, 17β-E2 e 17α-EE2 58
Tabela 7 – Repetibilidade do método cromatográfico para a determinação do estriol 60
Tabela 8 – Repetibilidade do método cromatográfico para a determinação do 17β-estradiol 60
Tabela 9 – Repetibilidade do método cromatográfico para a determinação do 17α-etinilestradiol 60
Tabela 10 – Porcentagem de recuperação média (%), valores de *(s)* e coeficiente de variação (CV%), aos níveis de 1,0, 2,0 e 3,0 µg L^{-1} para o E3, 17α-EE2 e 17β-E2, analisados por HPLC-DAD 61
Tabela 11 – Porcentagem de recuperação média (%), valores de desvio padrão *(s)* e coeficiente de variação (CV%), para os níveis de 1,0, 2,0 e 3,0 µg L^{-1} para o E3, analisados por HPLC 64
Tabela 12 – Porcentagem de recuperação média (%), valores de desvio padrão *(s)* e coeficiente de variação (CV%), para os níveis de 1,0, 2,0 e 3,0 µg L^{-1} para o 17β-E2, analisados por HPLC..... 65
Tabela 13 – Porcentagem de recuperação média (%), valores de desvio padrão *(s)* e coeficiente de variação (CV%), para os níveis de 1,0, 2,0 e 3,0 µg L^{-1} para o 17α-EE2, analisados por HPLC 66
Tabela 14 – Coeficientes linear (s) e angular (S) dos hormônios, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)..... 67
Tabela 15 – Avaliação do efeito de matriz pelos valores dos coeficientes angulares das curvas em solvente e em matriz 68
Tabela 16 – Níveis de concentração dos hormônios nas amostras analisadas por HPLC-DAD 71

LISTA DE SIGLAS

CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coeficiente de Variação
DAD	Diode Array Detector
DE	Desregulador Endócrino
E1	Estrona
E3	Estriol
ED	Detecção eletroquímica
EDC	Endocrine disrupting Chemicals (Disruptores Endócrinos Químicos)
EM	Espectrometria de Massas
EPA	Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental)
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
FD	Detecção de fluorescência
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
K_{ow}	Coeficiente de Partição octanol-água
PFCP	Personal Farmaceuticals Care Product (Produtos Farmacêuticos e de Cuidados Pessoais)
LC-MS/MS	Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas)
LD	Limite de Detecção
LLE	Liquid-Liquid Extraction (Extração Líquido-Líquido)
LQ	Limite de Quantificação
MS	Espectrometria de Massa (MS)
MeEE2	Mestranol
pK_a	Constante de Dissociação Ácida
RE	Receptor de Estrogênios
SPE	Solid Phase Extraction (Extração em fase sólida)
UV	Ultravioleta
17α-EE2	17α-etinilestradiol
17β-E2	17β-estradiol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17
2. REVISÃO DA LITERATURA 19
2.1 Ocorrência de fármacos no meio ambiente 19
2.2 Características dos hormônios estudados 21
2.3 Hormônios e o ambiente 27
2.3.1 Classificação dos hormônios 29
2.4 Impacto causado por hormônios 30
2.5 Análise de hormônios em água 32
2.5.1 Extração de hormônios em fase sólida (SPE) 33
2.5.1.1 Condicionamento do cartucho 33
2.5.1.2 Adição da amostra 34
2.5.1.3 Limpeza do cartucho de SPE 34
2.5.1.4 Eluição dos analitos adsorvidos 34
2.6 Validação do método analítico 35
2.6.1 Seletividade 35
2.6.2 Linearidade 36
2.6.3 Precisão 37
2.6.3.1 Repetibilidade 38
2.6.4 Exatidão 39
2.6.4.1 Ensaio de recuperação 39
2.6.4.2 Materiais de referência certificados (CRM) 40
2.6.4.3 Comparação de métodos 40
2.6.4.4 Adição padrão 40
2.6.5 Limite de detecção (LD) 40
2.6.6 Limite de quantificação (LQ) 41
3. MATERIAIS E MÉTODOS 42
3.1 Caracterização da área de estudo 42
3.1.1 Área da bacia do Rio Piracicaba 42
3.1.2 Área da bacia do Rio Corumbataí 44
3.2 Preparo da vidraria 45
3.3 Validação do método analítico 46
3.4 Matriz 47

3.5 Interferência de matriz 48
3.6 Reagentes e solventes 48
3.7 Equipamentos 48
3.7.1 Funcionamento do detector de arranjo de diodos 49
3.8 Padrões Analíticos 50
3.9 Preparo das soluções padrão mix estoque e de trabalho 51
3.10 Coleta e armazenamento das amostras 51
3.11 Análises cromatográficas por HPLC-DAD 52
3.11.1 Condições cromatográficas 52
3.11.2 Análise qualitativa e quantitativa 53
3.11.3 Procedimento de extração das amostras de água 54
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES 56
4.1 Validação do método analítico 56
4.1.1 Seletividade 56
4.1.2 Linearidade 58
4.1.2.1 Linearidade do sistema cromatográfico para os hormônios E3, 17β-E2 e 17α-EE2 58
4.1.3 Precisão 60
4.2.4 Exatidão 61
4.2.4.1 Ensaio de recuperação 62
4.2.4.1.1 Ensaio de recuperação para o hormônio estriol 63
4.2.4.1.2 Ensaio de recuperação para o hormônio 17β-estradiol 64
4.2.4.1.3 Ensaio de recuperação para o hormônio 17α-etinilestradiol 66
4.2.3 Determinação dos valores de LD e LQ 67
4.3 Efeito de matriz 68
4.4 Determinação de hormônios em amostras de água bruta e tratada 69
4.5 Hormônio estrona 74
5. CONCLUSÕES 75
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS 76
REFERÊNCIAS 77

1. INTRODUÇÃO

Os riscos ambientais decorrentes da produção e consumo de determinados compostos químicos têm aumentado com o progresso tecnológico. A ocorrência de contaminação ambiental está diretamente associada aos aspectos quantitativos de produção, consumo e do gerenciamento do retorno dos resíduos destes compostos, e/ou de seus metabólitos, ao ambiente.

As atividades antrópicas, principalmente nas sociedades modernas, geram diversos tipos de poluentes que atingem, principalmente, os ambientes aquáticos. Com o advento da agricultura produtivista introduziu-se agressivamente o emprego de fertilizantes e agrotóxicos que resultaram no aumento da produtividade. Por outro lado, o emprego destes compostos trouxe consequências que resultaram no aumento da produtividade, mas, acompanhado deles, ocorreu o envenenamento e a mortandade de diversas formas de vida dos vários ecossistemas terrestres.

Entretanto, é inegável a importância dos fármacos na economia mundial, tendo em vista o contínuo crescimento da população humana. Estes compostos e seus metabólitos podem afetar reservas de água potável, superficiais e subterrâneos de diversas formas e podem, também, atingir as pessoas através de alimentos contaminados e à vida selvagem, ou seja, atingem populações consideradas não-alvo, através da contaminação dos cursos d'água.

O principal meio de carreamento de contaminantes é por meio da água, a qual é elemento fundamental aos organismos nos ecossistemas e, se ocorrer sua contaminação, todos os seus componentes bióticos ou abióticos serão afetados.

Há algum tempo, no ramo da toxicologia, conhecida como ecotoxicologia, vem estudando e monitorando o comportamento de compostos tóxicos no ambiente, assim como seus efeitos sobre organismos terrestres e aquáticos. Esta ferramenta científica faz-se necessária, no sistema de produção para fins de certificados, relatórios técnicos e análises, que conduzirão à melhor qualidade dos produtos, bem como, a práticas produtivas mais perenes e sustentadas, subsidiando deste modo o

poder decisório de órgãos competentes como o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Há alguns anos, pesquisas realizadas na Europa têm manifestado preocupação com a presença de fármacos nos corpos d'água, inclusive nos sedimentos. Segundo Barcelò (2004), um dos primeiros pesquisadores a investigar a presença de fármacos no ambiente aquático, alguns fármacos são introduzidos de forma contínua e esta constante introdução de resíduos farmacológicos no meio aquático é suficiente para causar efeitos danosos sobre os organismos vivos que encontram-se expostos de forma perene a este coquetel de contaminantes. Alguns produtos vendidos sem receita, como os analgésicos e antiinflamatórios, são encontrados em uma concentração mais elevada, como também o ácido clorifíbico, um regulador de colesterol.

Tratando-se de um ponto importante que implica em qualidade de vida do ser humano, cabe às instituições científicas o papel de buscar esse tipo de identificação e mostrar as novas indagações para os órgãos responsáveis e a sociedade em geral.

O objetivo do presente projeto foi adaptar e validar a metodologia analítica, e monitorar, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos (HPLC/DAD), a presença de resíduos dos hormônios estriol (E3), 17α-etinilestradiol (17α-EE2) e 17β-estradiol (17β-E2), nas amostras de água bruta dos Rios Corumbataí e Piracicaba e em amostras de água de abastecimento da cidade de Piracicaba, SP, Brasil.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ocorrência de fármacos no meio ambiente

Um dos tópicos mais importantes, na área da química ambiental, é a qualidade das águas, sendo de consumo humano ou utilizadas para outros fins. A concentração de poluentes de diversas origens vem crescendo e, com isso, aumentando a preocupação com relação aos efeitos causados no meio biótico.

Estes compostos são classificados como micropoluentes e são encontrados na água em concentrações traço e, mesmo em níveis muito baixos, podem apresentar risco à saúde humana e animal. Metais pesados, inseticidas, hormônios e outros fármacos, podem contaminar as águas e os seus efeitos a longo prazo em seres vivos e ecossistemas terrestres são, até agora, praticamente desconhecidos.

Nas amostras de diversas matrizes ambientais, incluindo, principalmente, a água, podem-se observar vestígios de uma grande gama de produtos químicos utilizados ao longo dos anos pelo homem. Pois, a água como um dos bens de maior importância ao ser humano, também pode trazer doenças e contaminantes altamente tóxicos para seus usuários.

É provável que o coquetel de compostos produzidos pelo homem presente em nossas águas possa ter efeitos desastrosos nos ecossistemas mais sensíveis e, possivelmente, também nos seres humanos. Os micropoluentes poderão chegar a ser um problema da mesma magnitude que as doenças transmissíveis pela água, as quais causam mais de 2 milhões de mortes por ano.

Inclusos no coquetel de compostos químicos altamente perigosos, estão os compostos farmacêuticos, os quais, segundo Kümmerer (2001), em torno de 50.000 fármacos de uso humano foram registrados na Alemanha, dos quais 90% do total consumido contêm 900 diferentes substâncias ativas.

Na União Européia, foi autorizado o comércio de, aproximadamente 3.000 substâncias ativas. Nos hospitais, principalmente em cirurgias, uma grande variedade das substâncias farmacêuticas é usada para finalidades médicas, como diagnósticos e desinfetantes (KÜMMERER, 2001).

Além das substâncias ativas, formulações auxiliares e, em muitos casos, pigmentos e corantes são, também, componentes dos fármacos. Depois da aplicação, muitas drogas são excretadas por pacientes e não-metabolizadas e são inseridas também nas águas residuais. Depois do uso destes produtos e, às vezes em quantidades residuais, compostos usados em diagnósticos e desinfetantes também chegam ao esgoto (BODZEK; DUDZIAK, 2006).

Os fármacos atingem o meio ambiente pelos seguintes meios, de acordo com Bodzek e Dudziak (2006): os medicamentos veterinários ou aqueles usados como promotores de crescimento, produtos farmacêuticos usados em tratos culturais aquáticos, desinfetantes inseridos no meio ambiente por meio dos líquidos lixiviados, compostos presentes no esterco de animais os quais acarretam descarte de drogas e dos seus metabólitos, águas residuárias provenientes do "*run-off*" de grandes volumes de água advindos dos campos após a aplicação de esterco. As substâncias podem, penetrar nas águas interiores via solo após a aplicação de fertilizante líquido ou lodo de esgoto como fertilizante.

Técnicas analíticas tornaram-se mais sensíveis, largamente abrangentes e, devido a este fato, um número crescente de drogas humanas e veterinárias tem sido detectado em amostras ambientais. Contudo, sabe-se pouco sobre os possíveis riscos ecológicos de muitos destes compostos químicos. Esta lacuna no conhecimento tem resultado em um montante substancial de esforço para o desenvolvimento de dados e abordagens que podem provar a utilidade do acesso do impacto de fármacos no meio ambiente (ANKLEY et al., 2007).

Há uma pequena evidência de que os disruptores endócrinos causam efeitos adversos em populações de animais expostos e, portanto, as conseqüências na fauna exposta a esses químicos são largamente indeterminadas (JOBLING et al., 2002).

Dentro do grupo dos fármacos, estão os hormônios estrógenos, segundo Bodzek e Dudziak (2006), o 17β-estradiol, estrona, e o estriol, os quais estão presentes no meio ambiente depois de serem excretados por animais. O aumento crescente das concentrações dos metabólitos destes compostos, como o 17α-etinilestradiol, mestranol e o diestilbestrol, tem sido causado pela descarga de uma grande quantidade de medicamentos expirados (não utilizados) advindos de domicílios, resíduo de hospitais e indústrias farmacêuticas (BODZEK; DUDZIAK, 2006).

Muitos efeitos de compostos disruptores endócrinos em humanos e na fauna têm sido estudados. Para uma perspectiva ecológica, um dos melhores exemplos documentados envolve feminização de peixe macho exposto a efluentes municipais. Um trabalho pioneiro nesta área foi feito na União Européia e nos anos recentes a feminização de peixes machos tem sido descoberta em lugares impactados por efluentes no mundo inteiro (ANKLEY et al., 2007).

A natureza da feminização em peixes machos indica que o fenômeno é devido aos compostos químicos que ativam o estrógeno receptor do vertebrado. Embora muitos compostos químicos poderem interagir com o estrógeno receptor, há fortes evidências indicando que as substâncias responsáveis por um montante substancial de atividade estrogênica de efluentes municipais são os esteróides naturais e sintéticos, incluindo o etinilestradiol (17α-EE2), um estrogênio sintético usado como fármaco em humanos (ANKLEY et al., 2007).

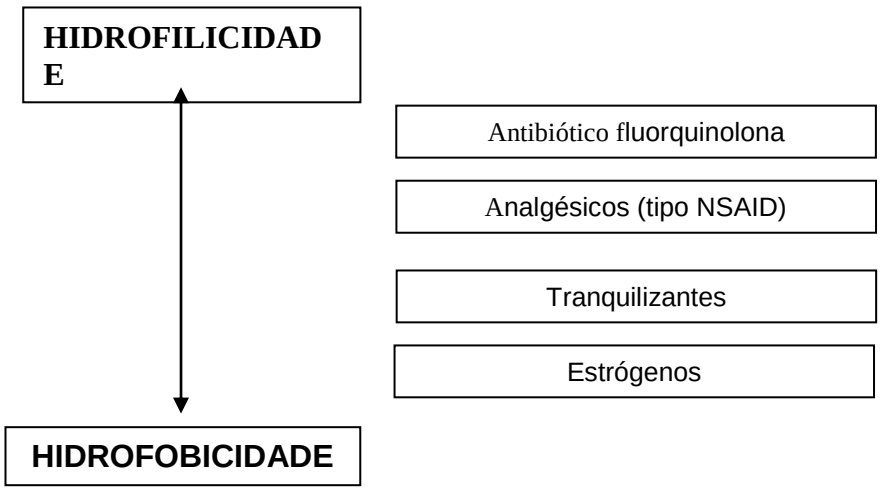
2.2 Características dos hormônios estudados

Existem basicamente duas classes de substâncias que podem alterar o funcionamento do sistema endócrino: os hormônios naturais que incluem estrogênio, progesterona e testosterona, presentes no corpo humano e nos animais, e os fitoestrogênios, substâncias contidas em algumas plantas, como nas sementes de soja, e que apresentam uma atividade semelhante aos esteróides hormonais quando ingeridas por um determinado organismo; e 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) (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Os estrogênios apresentam em sua estrutura um grupo fenólico e em alguns casos um grupo hidroxila alifático. Como são os principais responsáveis pelo crescimento e pela reprodução de espécies animais, incluindo os seres humanos, seus derivados sintéticos são bastante empregados como contraceptivos (hormônios inibidores do processo de ovulação), ao passo que os estrogênios são também administrados no controle dos sintomas que envolvem a menopausa, distúrbios fisiológicos e no tratamento do câncer de próstata e de mama. Já os progestagênios são empregados nos tratamentos voltados para as causas de infertilidade e descontrole do ciclo menstrual. Em geral, são rapidamente absorvidos pelo organismo e, então, metabolizados no fígado (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Outras duas características importantes para o estudo das moléculas dos hormônios são a hidrofilicidade e a hidrofobicidade. A Figura 1 apresenta os níveis destas duas características dos fármacos.

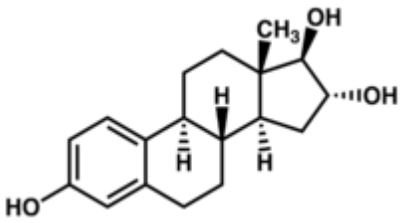


Fonte: Adaptado de FATTA et al. (2007)

Figura 1 - Níveis de hidrofilicidade e hidrofobicidade dos compostos farmacêuticos.

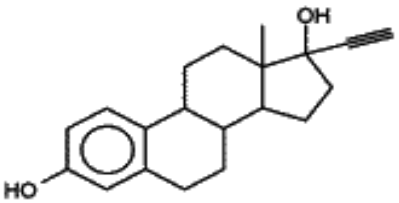
Na avaliação de risco muitos fármacos podem ser comparados aos pesticidas. O modo de ação pode ser levado em conta quando os efeitos dos fármacos podem ser avaliados com organismos e os padrões de teste. Um dos grupos que requerem atenção especial, são os hormônios, devido à sua alta eficiência (KÜMMERER, 2001).

Os esteróides naturais estrógenos 17β-E2 e o E3 têm solubilidade de, aproximadamente, 13 mg L^{-1}, ao passo que o esteróide sintético 17α-EE2 tem solubilidade de 4,8 mg L^{-1}. Estes esteróides têm intensidade de ligação média às moléculas de sedimentos e degradam rapidamente no solo e na água (YING; KOOKANA; RU, 2002). As Figuras 2, 3 e 4 ilustram as fórmulas estruturais do E3, 17α-EE2 e 17β-E2, respectivamente.



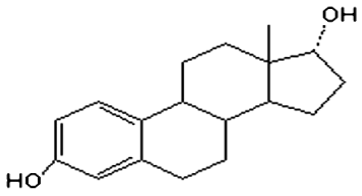
Fonte: Adaptado de Ghiselli e Jardim (2007)

Figura 2 – Fórmula estrutural do E3



Fonte: Adaptado de Ghiselli e Jardim (2007)

Figura 3 – Fórmula estrutural do 17α-EE2



Fonte: Adaptado de WANG et al. (2008)

Figura 4 – Fórmula estrutural do 17β-E2

Conforme mostrado na Tabela 1, todos estes esteróides têm baixa pressão de vapor, entre 2,3 x 10^{-10} e 6,7 x 10^{-15} mm Hg, indicando baixa volatilidade destes compostos. Os valores de Log K_{ow} dos esteróides naturais são 2,81 para o E3 e 3,94 para o 17β-E2. O esteróide sintético 17α-EE2 tem alto valor de Log K_{ow}, 4,15. Para as propriedades psicotérmicas destes esteróides, observa-se que os estrógenos são compostos orgânicos hidrofóbicos de baixa volatilidade. Devido a estas características, espera-se que a sorção no solo ou no sedimento possa ser um fator significante para a redução das concentrações na fase aquosa (YING; KOOKANA, RU, 2002). A Tabela 1 apresenta as propriedades físico-químicas relevantes dos esteróides avaliados.

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas relevantes dos esteróides avaliados

Hormônio	CAS number	Log K_{ow} [a]	Pressão de vapor (mmHg)	Solubilidade em água (mg L^{-1} a 20ºC)	Constante de Henry Law (atm.m^3/mole)	PM (g mol^{-1})	pKa
17β-E2	50-28-2	3,94	2,3 x 10^{-10}	13	3,64 x 10^{-11}	272,39	10,4
17α-EE2	57-63-6	4,15	4,5 x 10^{-11}	4,8	7,94 x 10^{-12}	296,41	10,5
E3	50-27-1	2,81	6,7 x 10^{-15}	13	1,33 x 10^{-12}	288,39	10,4

[a]Coeficiente de partição octanol-água

Fonte: Adaptado de Ying, Kookana e Ru (2002); Ghiselli (2006) e Bodzek e Dudziak (2006).

Os estrogênios sintéticos 17α-EE2 e o 17β-E2, são os mais potentes da classe dos disruptores endócrinos. O 17β-E2 é um dos estrogênios endógenos produzidos naturalmente pelo corpo humano (DESBROW et al., 1998). O 17α-EE2 é

encontrado em pílulas contraceptivas (que contêm de 30 a 50 µg de 17α-EE2 por pílula) e em terapias de reposição hormonal (VINE et al., 2005; BILA; DEZOTTI, 2007). É também um estradiol alquilado semi-sintético com uma substituição 17α-etinil (YING; KOOKANA; RU, 2002). O ingrediente contraceptivo mestranol é convertido após a sua administração em 17α-EE2 por demetilação (TERNES et al., 1999).

O 17β-E2 é um dos estrogênios usados na terapia de reposição hormonal (TRH), sendo o tratamento dos sintomas da menopausa, uma de suas indicações, devendo ser utilizado na menor dose eficaz, por um período o mais curto possível (YAKABE; HONDA; MAGALHÃES, 2005).

Teoricamente, os fármacos podem ser controlados por seus fabricantes, mas as implicações sociais podem ser complexas. No entanto, a questão permanece em aberto se a indústria farmacêutica pode desenvolver uma alternativa menos persistente ambientalmente para o 17α-EE2 (PICKERING; SUMPTER, 2003).

O 17α-EE2 e o 17β-E2 recebem atenção especial, pois são continua e diariamente excretados no esgoto e não são completamente removidos nas ETEs. Com isso são lançados continuamente nos sistemas aquáticos e podem ser encontrados nas águas superficiais, muitas vezes usadas como suprimento de água potável (BILA; DEZOTTI, 2007).

Pesquisas demonstram que o estrogênio 17β-E2 é um dos maiores responsáveis pela atividade estrogênica nos efluentes de ETEs (SOLÉ, 2003). Estrogênios naturais também são encontrados em águas naturais, no solo e lodos biológicos em várias partes do mundo (BELFROID et al., 1999; TERNES et al., 1999; ALDA; BARCELÒ, 2001). Peterson et al. (2000) relataram a presença de 17β-E2 (6 a 66 ηg L^{-1}) em águas subterrâneas próximas a áreas com alta densidade de criação de animais.

O 17α-EE2 é eliminado, principalmente, sob forma de conjugados, ao passo que outras transformações metabólicas ocorrem, mas são de menor relevância (YING; KOOKANA; RU, 2002). Este composto também um exemplo claro de um composto hormonalmente ativo (e muito potente) que, seguramente, pode ter algum

impacto no sistema endócrino de organismos recipientes não-alvo, como os peixes (SUMPTER; JOHNSON, 2006).

Assim, de acordo com Thorpe et al. (2003), o 17α-EE2 foi encontrado em alguns ambientes aquáticos que recebem efluentes domésticos e é suficiente para induzir muitos dos efeitos relatados de feminização de peixes usados em testes de laboratório e dos que vivem em seu habitat natural.

Estudos têm sido desenvolvidos utilizando o peixe “paulistinha” (*Danio rerio*) e notou-se que houve uma notável sensibilidade dos peixes para o esteróide estrógeno 17α-EE2. A exposição crônica de “paulistinhas” machos jovens a concentrações muito baixas de 17α-EE2 (1,5 ηg L^{-1}) reverte o sexo (“*imposex*”) de machos em fêmeas fenotípicas (PICKERING; SUMPTER, 2003). A feminização induzida também tem sido demonstrada em machos jovens de paulistinha, quando expostos ao17β-E2 (100 ηg L^{-1}) de 21 a 42 dias depois da fertilização, durante o período sexual de diferenciação (THORPE et al., 2003).

Em humanos e animais, estrógenos passam por várias transformações, principalmente no fígado. O 17β-E2 é rapidamente oxidado em estrona, a qual pode ser ainda convertida em estriol, sendo este o principal produto de excreção (YING; KOOKANA; RU, 2002).

O estriol (E3) é o principal esteróide estrogênico produzido durante a gravidez. Sua concentração no plasma e urina aumenta constantemente durante a gravidez. O estriol livre passa da placenta para a circulação onde é rapidamente convertido em derivados facilitando sua excreção. Por esta razão, o E3 possui uma vida média curta de somente 20 minutos no sangue materno (HUMAN DO BRASIL, 2008).

O E3 é uma das formas de estrógeno metabolizado do estradiol por meio da estrona advinda do ovário das mulheres e é usado, geralmente, para o tratamento dos sintomas da menopausa como uma alternativa ao estradiol, estrona ou uma combinação dos dois (KUMAR; MOHAN, SARMA, 2009).

2.3 Hormônios e o ambiente

Nas estações de tratamento, os resíduos farmacêuticos não são totalmente eliminados e, assim, são descarregados nas águas receptoras. Como estas águas são tratadas e reutilizadas nas grandes cidades, os fármacos presentes nestes corpos hídricos que entram em contato com os organismos, são absorvidos por ele após a ingestão e estão sujeitas a reações metabólicas. Contudo, uma fração significativa de substâncias de organismos de origem humana ou animal é liberada sob forma de produtos não metabolizados por meio da urina, fezes ou pela eliminação direta através banheiros sendo, portanto, emitidos na forma bruta para o esgoto, lodo de esgoto ou esterco. Além disso, alguns dos metabólitos excretados podem ser transformados à droga original ativa.

Contudo, nos últimos anos, vários métodos analíticos têm sido relatados para a determinação de cerca de 100 produtos farmacêuticos em matrizes ambientais aquosas, dentre eles os hormônios. No entanto, o conhecimento sobre sua ocorrência em rios e águas subterrâneas ainda é limitado a um pequeno número de países. Dados sobre o comportamento e os destinos dos produtos farmacêuticos nos rios e lagos, incluindo os sedimentos, ainda são escassos.

Os hormônios são uma parte essencial tanto da medicina moderna humana quanto da veterinária e, apesar de já terem sido aprovados pelo governo e terem sido submetidos a estudos farmacocinéticos, existe ainda uma considerável falta de conhecimento sobre seu destino no ambiente.

De acordo com Bila e Dezotti (2007), os desreguladores endócrinos são substâncias de uma categoria recente de poluentes ambientais que interferem nas funções do sistema endócrino. Essas substâncias são encontradas no meio ambiente em concentrações da ordem de μg L^{-1} e ηg L^{-1} e são suspeitas de causarem efeitos adversos à saúde humana e animal.

Alguns agentes terapêuticos e farmacêuticos também estão na lista das substâncias classificadas como desreguladores endócrinos (DE). São estrogênios sintéticos usados como contraceptivos orais, na reposição terapêutica na

menopausa ou na prevenção do aborto, tais como, dietilbestrol e o 17α-EE2. A maior aplicação médica do 17α-EE2 tem sido no desenvolvimento de pílulas contraceptivas, que contêm de 30 a 50 μg de 17α-EE2 por pílula. Os DE abrangem uma faixa de classe de substâncias com estruturas distintas, incluindo hormônios sintéticos e naturais, substâncias naturais e uma grande quantidade de substâncias sintéticas. No entanto, algumas definições são propostas para essas substâncias, denominadas em inglês “Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs)”. Alguns autores entendem que são considerados “endocrine disrupting chemicals” somente as substâncias que interagem com sítios receptores de hormônios, enquanto outros entendem como qualquer substância que cause desequilíbrio, interferência ou alteração no sistema endócrino, independentemente se atua diretamente no sítio receptor ou não (BILA; DEZOTTI, 2007).

De acordo com a EPA (1997), um desregulador endócrino é definido como um “agente exógeno que interfere com síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônio natural no corpo que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos”.

De acordo com a CEC (1999), “um desregulador endócrino é uma substância ou um composto exógeno que altera uma ou várias funções do sistema endócrino e tem, consequentemente, efeitos adversos sobre a saúde num organismo intacto, sua descendência, ou (sub) populações”.

Existem ainda outras definições para as substâncias estrogênicas presentes no ambiente. Frequentemente são referidos como estrogênios ambientais, estrogênios exógenos ou exoestrogênios. Exoestrogênios são diversos grupos de substâncias que não necessariamente apresentam alguma semelhança com a estrutura química do 17β-E2, mas causam respostas antagônicas, possivelmente através de mecanismos de ação via receptores hormonais. A atividade agonista é a capacidade de uma substância acoplar-se ao receptor de hormônios esteróides e elucidar uma resposta. Em contrapartida, a atividade antagonista é a habilidade de uma substância acoplar-se ao receptor de estrogênio e bloquear a ação do ligante natural (estrogênio) e, assim, sua resposta não será elucidada. Essas substâncias podem ser identificadas por sua capacidade de ligar-se ao receptor de estrogênios (RE) e induzir ou alterar uma resposta hormonal (ZACHAREWSKI, 1997). As

substâncias sintéticas com atividade estrogênica também são denominadas de xenoestrogênios por alguns autores (DESBROW et al., 1998).

2.3.1 Classificação dos hormônios

Os hormônios podem ser classificados de acordo com a sua natureza, sendo ela natural (produção natural do corpo humano) ou artificial (produção industrial). Os esteróides que causam preocupação com relação ao meio ambiente aquático devido ao seu potencial disruptor endócrino são, principalmente, estrógenos e contraceptivos, os quais incluem o 17β-estradiol (17β-E2), estrona (E1), estriol (E3), 17α-etinilestradiol (17α-EE2) e o mestranol (MeEE2) (YING; KOOKANA; RU, 2002).

De acordo com Sumpter (1998), pesquisas têm sido realizadas para rastrear estrógenos “reais” e/ou químicos que imitam estrógenos (também chamados de xenoestrogênios). Representantes de ambos os grupos químicos estão presentes nos efluentes, por exemplo, estrógenos naturais (estradiol, estrona, etc) e sintéticos (etinilestradiol), e têm sido relatados por estarem presentes em ETEs.

De acordo com Bila e Dezotti (2007), as substâncias classificadas como desreguladoras endócrinas (DE), incluindo substâncias naturais e sintéticas, usadas ou produzidas para uma infinidade de finalidades podem ser agrupadas em duas classes: 1. Substâncias sintéticas – utilizadas na agricultura e seus subprodutos, como pesticidas, herbicidas, fungicidas e moluscicidas; utilizadas nas indústrias e seus subprodutos, como dioxinas, alquifenóis e outros; compostos farmacêuticos, como os estrogênios sintéticos dietilbestrol (DES) e 17α-EE2 e, 2. Substâncias naturais – fitoestrogênios, tais como, genisteína e metaresinol e estrogênios naturais 17β-E2, estrona (E1) e E3.

2.4 Impacto causado por hormônios

Os compostos estrógenos são dispostos por diversas formas no meio ambiente, seja por contaminação aqüífera ou por disposição incorreta de lixo no solo, por contato no ambiente de trabalho ou em residência, por meio de alimentos, entre outras formas. Contudo, estes compostos químicos muitas vezes apresentam propriedades físico-químicas persistentes, são lipofílicos, bioacumulativos e têm baixa pressão de vapor, facilitando a sua dispersão no meio ambiente.

Uma possível contaminação do solo e de águas subterrâneas pode ser causada pela aplicação de lodo advindo das estações de tratamento municipais (ETEs) em diversos tipos de culturas agrícolas, assim como o transporte dos hormônios através da infiltração de águas superficiais contaminadas para as águas subterrrâneas e a infiltração de águas residuárias diretamente de escapes em tubulações de esgoto. Contudo, o principal meio pode ser para as ETEs e depois retornar sem sua completa remoção para as águas receptoras (TERNES et al.; 1999).

Alguns desreguladores endócrinos são solúveis em gordura, assim, altos níveis podem estar presentes em carne, peixe, ovos e derivados do leite. Hartmann et al. (1998), relataram a ocorrência de hormônios sexuais (17β-E2, estrona, testosterona e progesterona) em carnes (gado, porco, aves, peixe), leite e seus derivados, ovos e plantas (gramíneas e leguminosas). A contaminação de alimentos também pode vir do fato de que alguns hormônios são aplicados na criação de animais e, consequentemente, consumidos na alimentação humana, contudo, em grande parte dos países essa prática está proibida (PETERSON, 2000).

Os desreguladores endócrinos também podem ser encontrados nas cinzas dos produtos incinerados, no lodo biológico de estações de tratamento de efluentes e em chorumes de aterros sanitários. Uma quantidade considerável de produtos industrializados potencialmente danosos é disposta diretamente no solo ou em aterros sanitários. Conseqüentemente, alguns desreguladores endócrinos, tais como

o bisfenol A, nonilfenol, octilfenol e 17α-EE2 e alguns ftalatos, foram encontrados no chorume de aterros sanitários (BILA; DEZOTTI, 2007).

Estudos demonstraram que o esterco animal afeta a qualidade das águas superficiais e de subsolo. Peterson et al. (2000), relataram a presença de 17β-E2 (6 a 66 ηg L^{-1}) em águas subterrâneas próximas a áreas com alta densidade de criação de animais. Os estrogênios são naturalmente excretados pelos animais ou são administrados nos mesmos como promotores de crescimento, mesmo esta prática não ser mais permitida em muitos países (PETERSON et al., 2000; CASEY et al., 2003).

Os estrogênios apresentam em sua estrutura um grupo fenólico e em alguns casos um grupo hidroxila alifático, enquanto que nos progestagênios este grupo fenólico é substituído por um grupo cetona. Como são os principais responsáveis pelo crescimento e pela reprodução de espécies animais, incluindo os seres humanos, seus derivados sintéticos são bastante empregados como contraceptivos (hormônios inibidores do processo de ovulação), ao passo que os estrogênios são também administrados no controle dos sintomas que envolvem a menopausa, distúrbios fisiológicos e no tratamento do câncer de próstata e de mama. Já os progestagênios são empregados nos tratamentos voltados para as causas de infertilidade e descontrole do ciclo menstrual. Em geral, são rapidamente absorvidos pelo organismo e, então, metabolizados no fígado (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Para a avaliação de risco e sua monitoração é necessário saber que há diferentes fontes de emissão dos fármacos no ambiente. Para muitos compostos, há falta de dados relatando sua emissão no ambiente, assim como por residências e hospitais. Especialmente com relação aos hospitais, existem poucas informações (KÜMMERER, 2001).

Baseados em um levantamento feito e em medições de excreção de estrógenos por humanos, Johnson, Belfroid e Di Corcia (2000) estimaram a excreção diária de estrógenos advinda de mulheres e homens (Tabela 2). Baseado na excreção diária de estrógenos por humanos, o fator de diluição e prévias medições, espera-se encontrar estrógenos na concentração de ηg L^{-1} em amostras ambientais de água de rio (JOHNSON; BELFROID; DI CORCIA, 2000).

Tabela 2 – Excreção diária (µg) de esteróides estrogênicos em humanos

Categoria	**17β-E2**	**E3**	**17α-EE2**
Homens	1,6	1,5	CT
Mulheres menstruadas	3,5	4,8	CT
Mulheres na menopausa	2,3	1	CT
Mulheres grávidas	259	6000	CT

CT: concentração traço
Fonte: Adaptado de Johnson, Belfroid e Di Corcia (2000)

2.5 Análise de hormônios em água

Os baixos níveis de contaminação e a complexidade das matrizes ambientais, exigem o uso de métodos com alta sensibilidade e seletividade para a análise de resíduos de estrógenos (WANG et al., 2008).

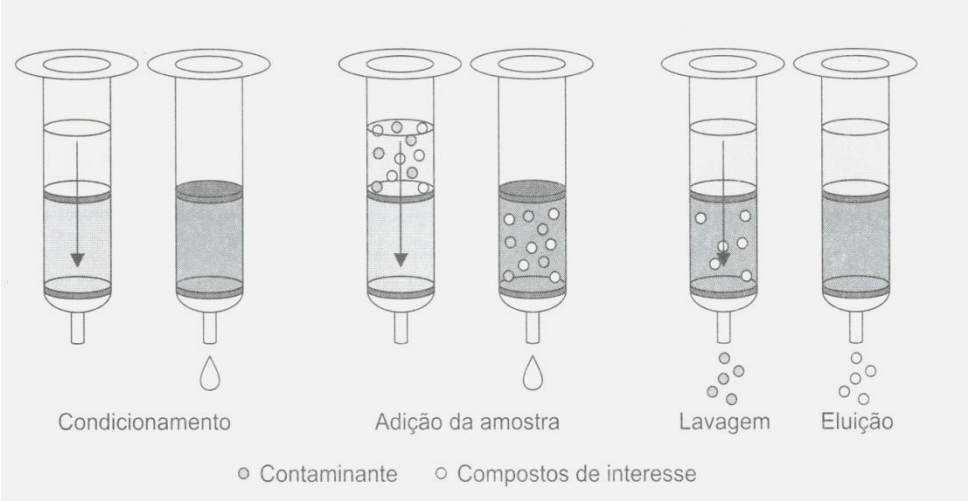
Para a análise de estrógenos, a cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-EM), foi inicialmente utilizada, embora seja um método trabalhoso, pois a derivatização era exigida (NAKAMURA et al., 2001; KAWAGUCHI et al., 2004). Também são usados com frequência, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detecção ultravioleta (UV) (RUSSELL et al., 2000; ALDA; BARCELÒ, 2001), detecção eletroquímica (ED) (PENALVER et al., 2002), detecção por fluorescência (FD) (MATSUMOTO et al., 2002; WEBER et al., 2005) e espectrometria de massa (MS) (PICHON et al., 1995; HU et al., 2005).

A cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS) tem boa sensibilidade e precisão, mas não está acessível em muitos laboratórios, pois há um alto custo dos equipamentos e exigência de operadores treinados. Portanto, HPLC é uma boa escolha, embora sua sensibilidade e seletividade não sejam tão boas quanto do LC-MS-MS. Para tanto, uma amostra necessita de um pré-tratamento antes da análise cromatográfica, a qual é normalmente necessária, como, a extração líquido-líquido (LLE) (RUSSELL et al., 2000; NOVAKOVA et al., 2004; CHOI et al., 2006) ou a extração em fase sólida (SPE) (LAGANA et al., 2004; QUINTANA et al., 2004; WEIGL et al., 2004).

2.5.1 Extração de hormônios em fase sólida (SPE)

A SPE pode ser descrita como sendo um processo cromatográfico simplificado, com o sorvente atuando como fase estacionária. A fase móvel é a amostra aquosa durante a etapa de extração ou o solvente orgânico durante a etapa de eluição. Altos fatores de enriquecimento são obtidos quando os analitos são fortemente retidos pelo sorvente na presença de água e quando eles têm baixa retenção com o solvente orgânico usado para dessorção.

Para a realização da SPE, utilizando-se, por exemplo, C18, são necessárias quatro etapas, conforme Figura 5. Estas etapas devem ser otimizadas de forma a obter-se uma recuperação máxima do produto a ser analisado.



Fonte: Adaptado de Lanças (2004a)

Figura 5 – Etapas empregadas em SPE visando ao isolamento de um composto (ou classe de compostos)

2.5.1.1 Condicionamento do cartucho

Cada sorvente de SPE requer o seu condicionamento com o objetivo de se ativar ou se preparar para reter o analito. A limpeza prévia com solvente orgânico (água) serve para remover contaminação indesejável que possa estar presente no

cartucho. Essa etapa é um pré-requisito para a adsorção do analito (LANÇAS, 2004a).

2.5.1.2 Adição da amostra

Nessa etapa, o composto se distribui entre a amostra líquida e a superfície do sorvente, por simples adsorção à superfície ou através da penetração na superfície, e um equilíbrio é estabelecido. A velocidade de eluição deve ser inferior a 2 mL por minuto, controlando-se o vácuo ou a pressão aplicada durante a etapa de adição da amostra (LANÇAS, 2004a).

2.5.1.3 Limpeza do cartucho de SPE

A limpeza do cartucho de SPE visa eliminar os interferentes com um solvente que não possua força suficiente para arrancar o analito de interesse do material de empacotamento. O solvente ideal é o próprio solvente da amostra, caso ele não remova também o analito de interesse (LANÇAS, 2004a).

2.5.1.4 Eluição dos analitos adsorvidos

Na última etapa da SPE, os analitos de interesse são dessorvidos com um pequeno volume de solvente adequado. Essa etapa é realizada com maior sucesso utilizando-se um solvente que tenha a maior força eluotrópica para o sorvente que está sendo usado. O solvente deve ser seletivo o bastante para que a interação entre o analito e o sorvente seja enfraquecida e a distribuição do analito através do eluente ocorra.

Para sorventes de fase reversa, a série eluotrópica é bem conhecida para solventes orgânicos e o poder de eluição diminui dentro da série hexano, THF, acetato de etila, diclorometano, acetona, acetonitrila e metanol. Solventes polares ou capazes de ligação hidrogênio com a água adsorvida podem ser mais efetivos. Por isso, metanol ou acetonitrila são normalmente preferidos devido a sua miscibilidade com água. Misturas de solventes miscíveis podem também ser usadas para se proporcionar um balanço hidrofílico-hidrofóbico (BARCELÒ; HENNION, 1997).

A vazão de eluição deve ser baixa e o volume mínimo é cerca de 2 vezes o do sorvente, isto é, de 2 a 5 mL para cartuchos de 500 mg. Quanto menor o volume de dessorção, maior o fator de pré-concentração. A dessorção é mais eficiente se for feita com 2 ou 3 alíquotas de 1 mL ao invés de uma alíquota única com 2 ou 3 mL (BARCELÒ; HENNION, 1997).

2.6 Validação do método analítico

A validação do método proposto foi obtida por meio da avaliação dos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, repetibilidade e exatidão.

2.6.1 Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes (RIBANI et al., 2004).

A farmacopéia americana define a seletividade de um método analítico como sua habilidade em medir, de forma exata, um analito na presença de interferências, as quais se espera que estejam presentes na matriz da amostra (LANÇAS, 2004b). Em geral, uma forma simples de verificar a seletividade de um método cromatográfico é observar a presença de picos na região do tempo de retenção do analito de interesse, injetando-se um branco obtido com a mesma matriz a ser analisada. Nesse caso, devem-se empregar várias amostras, e a ausência de picos próximos ao tempo de retenção do analito de interesse deve ser observada (LANÇAS, 2004b).

Este parâmetro pode ser obtido de várias maneiras. A avaliação pode ser feita com detectores modernos (arranjo de diodos, por exemplo), que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza-se isto como uma indicação da presença do composto puro (HUBER, 1998; JENKE, 1998; VESSMAN et al., 2001).

2.6.2 Linearidade

A linearidade é a resposta obtida em função da concentração do analito, a qual deve ser estudada em um intervalo de concentração apropriado. A linearidade foi determinada pelo coeficiente de correlação (r^2), obtido pelo gráfico relacionado à resposta do equipamento em função de várias concentrações do analito (VAZ et al., 2007). O número mínimo de pontos geralmente aceitos nos gráficos de calibração varia entre 5 e 6 pontos (LANÇAS, 2004b).

A relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie (CUSTÓDIO; ANDRADE; AUGUSTO, 2004).

Para estimar os coeficientes de uma curva analítica, pode-se usar um método da regressão linear. Além dos coeficientes de regressão **a** e **b**, também pode ser

calculado, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação **r**. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI et al., 2004).

Para verificar se a equação de regressão é estatisticamente significativa podem ser efetuados os testes de ajuste do modelo linear. Um coeficiente de correlação maior que 0,99 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (SHABIR, 2003; JENKE, 1998; GREEN, 1996).

Em qualquer técnica instrumental, a relação linear simples, descrita pela equação (1), só é válida em um determinado intervalo de massa ou concentração da espécie medida (RIBANI et al., 2004).

$$y = ax + b \qquad (1)$$

onde:

y = resposta medida (área do pico);
x = concentração;
a = inclinação da curva de calibração = sensibilidade;
b = interseção com o eixo y, quando x = 0.

2.6.3 Precisão

É a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS, 1995; INMETRO, 2003). Para avaliar a precisão, calcula-se a estimativa do desvio

padrão absoluto (s) (RIBANI et al., 2004). A estimativa do desvio padrão *(s)* foi feita pela equação (2).

$$s = \sqrt{\frac{\Sigma(xi - \bar{x})^2}{n - 1}} \qquad (2)$$

onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto;
$\bar{x}$ = média aritmética de um pequeno número de medições (média das determinações) (RIBANI et al., 2004).

Outra expressão da precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV). O coeficiente de variação é obtido pela equação (3).

$$CV(\%) = \frac{s}{x} \times 100 \qquad (3)$$

onde:
x = média aritmética dos valores;
s = estimativa do desvio padrão.

2.6.3.1 Repetibilidade

A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetibilidade: mesmo procedimento; mesmo analista;

mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo (RIBANI et al., 2004).

Para avaliação da repetibilidade do método cromatográfico, uma mesma amostra de um padrão é injetada sete vezes, nas mesmas condições de operação e no mesmo dia. A reprodutibilidade do método cromatográfico também pode ser avaliada através de três injeções da mesma amostra do padrão, realizadas por um operador, em dois dias diferentes (VAZ et al., 2007).

2.6.4 Exatidão

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação; adição padrão (RIBANI et al., 2004).

2.6.4.1 Ensaio de recuperação

A recuperação, R, é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (THOMPSON et al., 1999). Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até ± 20% (GARP, 1999).

2.6.4.2 Materiais de referência certificados (CRM)

São materiais de referência ou padrões analíticos acompanhados de um certificado que possui o valor de concentração da substância, uma incerteza associada (RIBANI et al., 2004) e a data de validade.

2.6.4.3 Comparação de métodos

É a comparação entre resultados obtidos empregando-se o método em desenvolvimento e os resultados conseguidos através de um método de referência, avaliando o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos (RIBANI et al., 2004).

2.6.4.4 Adição padrão

Este método é empregado quando é difícil ou impossível preparar um branco da matriz sem a substância de interesse (RIBANI et al., 2004).

2.6.5 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS, 1995; INMETRO, 2003).

O cálculo do LD pode ser feito pelo método da relação sinal-ruído, que consiste em utilizar a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de tal modo que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável) (RIBANI et al., 2004).

2.6.6 Limite de quantificação (LQ)

Os limites de quantificação (LQ) para cada composto pode ser determinado utilizando o primeiro nível de concentração da curva analítica (INMETRO, 2003). O LQ representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental (EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS, 1995; INMETRO, 2003).

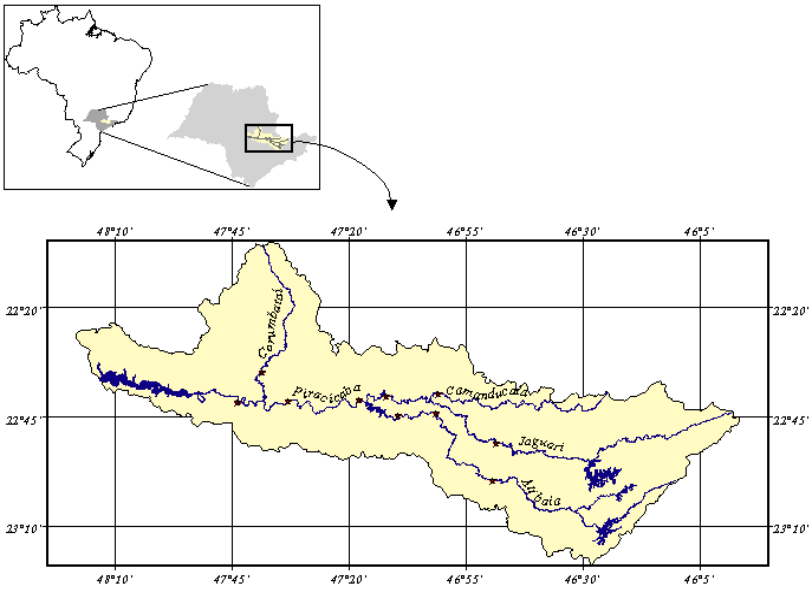
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização da área de estudo

Para que fosse avaliada a qualidade dos corpos hídricos pertencentes às bacias dos Rios Piracicaba e Corumbataí, com relação aos disruptores endócrinos natural (17β-E2) e sintéticos (17α-EE2 e E3), foram coletadas amostras de água bruta de ambos os Rios e água tratada proveniente de residência da cidade de Piracicaba, estado de São Paulo. O projeto foi desenvolvido no laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura CENA/USP, Piracicaba, São Paulo.

3.1.1 Área da bacia do Rio Piracicaba

A bacia do Rio Piracicaba apresenta área de drenagem de 3.700,79 Km^2 (COMITÊ PCJ, 2007). Esta bacia hidrográfica estende-se por uma área de 12.531 km^2, situada no sudeste do estado de São Paulo e extremo sul de Minas Gerais. O Rio Piracicaba nasce da junção dos Rios Atibaia e Jaguari, no município de Americana. Após atravessar a cidade de Piracicaba, recebe as águas de seu principal afluente, o Rio Corumbataí. O Rio Piracicaba percorre 250 km de sua formação até a sua foz no Rio Tietê entre os municípios de Santa Maria da Serra e Barra Bonita. A Figura 6 apresenta a localização da bacia do Rio Piracicaba (COMITÊ PCJ, 2007).



Fonte: Adaptado de CBH-PCJ (2008)

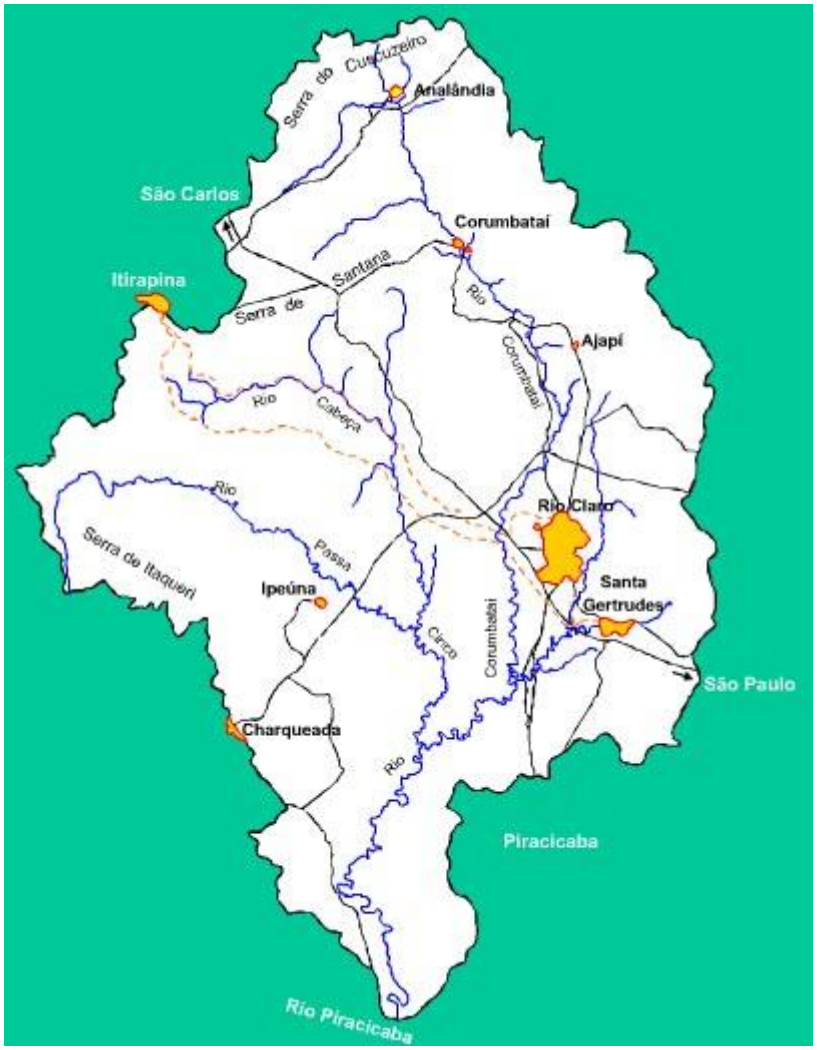
Figura 6 – Localização da bacia do Rio Piracicaba

A região do Rio Piracicaba é muito industrializada, sendo destaque as culturas de cana-de-açúcar e citrus. Segundo Montebelo (1998), o Rio Piracicaba apresenta médio porte, está situado em região subtropical. Constitui bacia com diversos problemas ambientais, típicos de áreas impactadas pela ação antrópica. Na bacia do Rio Piracicaba, o lançamento de esgoto, sobretudo o doméstico, é o principal problema de contaminação das águas da região, decorrente do intenso aumento da densidade demográfica ocasionado pela expansão da atividade industrial (CBH-PCJ, 2008).

Os municípios que integram a bacia do Rio Piracicaba são, Águas de São Pedro, Americana, Campinas, Charqueada, Hortolândia, Iracemápolis, Limeira, Monte Mor, Nova Odessa, Paulínia, Piracicaba, Rio das Pedras, Saltinho, Santa Bárbara d'Oeste, Santa Maria da Serra, São Pedro e Sumaré (COMITÊ PCJ, 2007).

3.1.2 Área da bacia do Rio Corumbataí

A bacia do Rio Corumbataí está localizada na primeira zona hidrográfica do estado de São Paulo, abrangendo a parte superior do Rio Tietê, desde suas cabeceiras até a Barragem de Barra Bonita, num percurso de 592 Km. Esta zona drena 32.710 Km^2, compreendendo dez bacias hidrográficas e a bacia hidrográfica do Rio Piracicaba integra o sistema Tietê-Paraná sendo composta das bacias do Rio Jaguari (4.339 Km^2), do Rio Corumbataí (1.710 Km^2) e do Rio Atibaia (1.030 Km^2) (CEAPLA, 2004). A bacia do Rio Corumbataí apresenta área de drenagem de 1.679,19 Km^2 (COMITÊ PCJ, 2007). A localização da bacia é mostrada na Figura 7.



Fonte: Adaptado de CEAPLA (2004)

Figura 7 – Bacia do Rio Corumbataí

Os municípios que integram a bacia do Rio Corumbataí são, Analândia, Charqueada, Cordeirópolis, Corumbataí, Ipeúna, Iracemápolis, Itirapina, Piracicaba, Rio Claro, Santa Gertrudes e São Pedro (COMITÊ PCJ, 2007).

3.2 Preparo da vidraria

Toda vidraria utilizada, tanto no processo de coleta, armazenamento, quanto para a extração, foi descontaminada seguindo os passos:

- Imergiu-se em sabão alcalino Derquim® LM 01 (diluição 1:1000), durante 24 horas;
- Lavou-se sob água corrente, até completa remoção do sabão;
- Enxaguou-se três vezes, utilizando água deionizada;
- Lavou-se com acetona grau HPLC todo o excesso foi recolhido em frasco próprio, devidamente identificado e foi enviado ao setor de tratamento de resíduos de solventes do CENA/USP;
- Desativou-se com solução de 5% de dimetildiclorosilano em tolueno;
- Lavou-se duas vezes com diclorometano grau HPLC;
- Após completa secagem, toda vidraria foi vedada com papel filme e armazenada em local apropriado.

3.3 Validação do método analítico

A validação do método proposto foi obtida por meio da avaliação dos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, repetibilidade e exatidão.

A seletividade do método cromatográfico foi avaliada pela observação da ausência de picos na região do tempo de retenção do analito de interesse. Para tanto, injetou-se amostras do branco sem fortificação e do branco fortificado obtido com água ultrapura.

A linearidade foi avaliada pela resposta obtida em função da concentração do analito, a qual foi estudada em um intervalo de concentração que variou de 0,5 a 4,0 $\mu g\ L^{-1}$. A linearidade foi determinada pelo coeficiente de correlação (r^2), obtido pelo gráfico relacionando a resposta do equipamento em função de 5 concentrações do analito. Para estimar os coeficientes das curvas analíticas, utilizou-se o método da regressão linear.

A determinação da linearidade das curvas analíticas foi feita a partir de padrões analíticos preparados em solvente, nas concentrações de 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 $\mu g\ L^{-1}$, injetadas em triplicata. Após as injeções foram calculados a média das

áreas, a estimativa do desvio padrão relativo (DPR), ou coeficiente de variação (CV), a estimativa do desvio padrão (s) e a equação da regressão linear da curva analítica para cada hormônio.

O processo utilizado para avaliar a exatidão foi feito por meio de ensaios de recuperação. Amostras de água ultrapura foram fortificadas e extraídas conforme o método, nas concentrações de 1,0, 2,0 e 3,0 µg L^{-1} e quantificadas por HPLC-DAD.

A precisão foi avaliada pela estimativa do desvio padrão relativo (DPR), ou coeficiente de variação (CV) e a estimativa do desvio padrão (s), por meio da análise da injeção em triplicata de padrão mix na concentração de 1,0 µg L^{-1}.

Para avaliação da repetibilidade do método cromatográfico, uma mesma amostra de um padrão a 1,0 µg L^{-1} foi injetada sete vezes, nas mesmas condições de operação e no mesmo dia.

Os limites de detecção (LD) foram determinados pela injeção da menor concentração do padrão mix dos hormônios, e calculados através do método visual. Os limites de quantificação (LQ) para cada um dos hormônios foram determinados usando o primeiro nível de concentração da curva analítica, utilizando solução mix do padrão contendo E3, 17α-EE2 e 17β-E2 na concentração de 0,5 µg L^{-1}.

3.4 Matriz

As matrizes utilizadas foram água bruta, advinda dos pontos de captação de abastecimento urbano da cidade de Piracicaba, nos Rios Piracicaba e Corumbataí e água de abastecimento residencial da cidade de Piracicaba, estado de São Paulo.

3.5 Interferência de matriz

Para avaliação da interferência ou não de matriz, foram adicionados padrões analíticos na matriz (água do Rio Corumbataí). As amostras foram fortificadas com as concentrações intermediárias da curva analítica e extraídas conforme o método. Assim foi verificado se a matriz exerce efeito positivo (aumento de sinal) ou negativo (decréscimo de sinal) sobre o resultado da análise.

3.6 Reagentes e solventes

Os solventes utilizados no processo de extração foram metanol grau HPLC e água ultrapura. Para descontaminação e limpeza da vidraria foram utilizados acetona grau HPLC, dimetildiclorosilano diluído em tolueno grau HPLC e diclorometano grau HPLC. O gás utilizado para concentração das amostras foi nitrogênio (N_2) comercial.

3.7 Equipamentos

Para a análise dos compostos E3, 17α-EE2 e 17β-E2, foi utilizado um cromatógrafo liquido, modelo 1200 (Agilent Technologies®), constituído de bomba quaternária, injetor automático, degaseificador e detector com arranjo de diodos (DAD). Os outros equipamentos utilizados estão descritos a seguir.

- Workstation (Agilent ChemStation versão B.03.02, 17 de janeiro de 2008) para integração;
- Coluna Kromasil 100-5C18, 5 µm x 4,6 mm x 250 mm;
- Coluna de guarda Kromasil® 100-5C18;
- Balança analítica HA – 202 M, AND Company;
- Bomba de vácuo Primar;

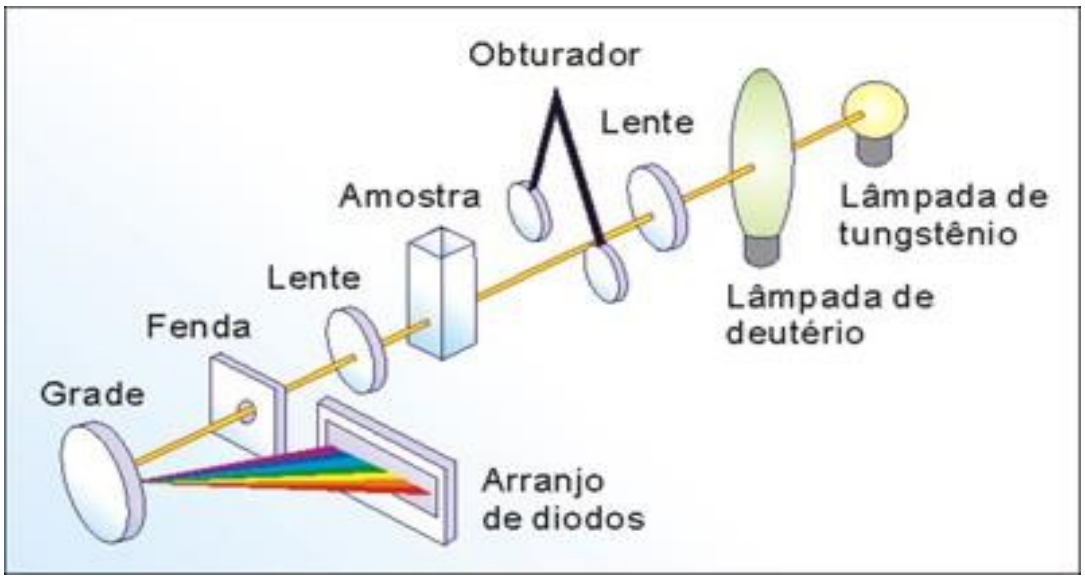
- Câmara de vácuo, Visiprep DL^{TM}, Supelco;
- Cartucho C18 OHASIS HLB, 6 cc, Waters Corporation com capacidade de 4 mL.
- Banho de ultra-som Bandelin Sonorex RK510S;
- Frascos de vidro âmbar de diferentes volumes;
- Frascos âmbar com tampa de teflon de 2 mL;
- Micropipeta de 200, 1000 e 10000 μL;
- Balões volumétricos de 10 mL;
- Outros materiais usuais em laboratório (béquer, proveta, pipeta volumétrica, balão volumétrico, tubo de ensaio).

3.7.1 Funcionamento do detector de arranjo de diodos

A Figura 8 ilustra um esquema óptico de um espectrofotômetro com detector de arranjo de diodos. Neste esquema há duas fontes de radiação, as lâmpadas de deutério e tungstênio, cujas emissões são focalizadas através de uma lente sobre a amostra. Portanto, todo o espectro de emissão da lâmpada incide sobre a mesma, sendo que a luz incidente será, em parte, absorvida. Esta luz que atravessou a amostra (transmitida ou emergente) irá incidir sobre uma lente que focaliza o feixe sobre uma fenda, e desta sobre uma grade de difração. Esta grade irá difratar a luz, separando os seus diferentes comprimentos de onda, sendo que cada um deles irá incidir sobre um diodo do arranjo. Este diodo, ao receber o feixe de luz, produz uma corrente elétrica cuja magnitude depende da intensidade da emissão (novamente aqui se aplica o efeito fotoelétrico). Através de um circuito de calibração adequado, esta corrente será transformada em absorbância nos diferentes comprimentos de onda, resultando no que se convenciona chamar de espectro de absorção (OWEN, 1996).

O procedimento experimental convencional de obtenção de espectros de absorção em um instrumento deste tipo envolve inicialmente o registro de um espectro do ruído de fundo ou do solvente ou do ar (a serem utilizados como

branco). Arquiva-se o mesmo e, em seqüência, se obtém o espectro da amostra e se efetua a subtração dos dois. O resultado é o espectro da amostra, o qual tem o solvente (ou ar) como branco (OWEN, 1996).



Fonte: Adaptado de Universidade Federal do Pará (2009)

Figura 8 – Esquema ótico de um espectrofotômetro com detector de arranjo de diodos

3.8 Padrões Analíticos

Os padrões analíticos utilizados foram o E3, 17α–EE2 e o 17β–E2. As soluções estoque destes padrões foram obtidas a partir da diluição de 10 mg do padrão em 10 mL de metanol, para obtenção da concentração de 100 µg L^{-1}. Os padrões dos hormônios e seus respectivos fornecedores estão descritos conforme Tabela 3.

Tabela 3 – Hormônios analisados por HPLC-DAD, com informações de pureza, fornecedor, grupo químico e fórmula molecular

Hormônio	Pureza	Fornecedor	Origem Química	Fórmula Molecular
E3	99,0%	Dr. Ehrenstorfer GmbH®, Augsburg, Germany	Hormônio natural	$C_{18}H_{24}O_3$
17α–EE2	98,5%	Dr. Ehrenstorfer GmbH®, Augsburg, Germany	Hormônio sintético	$C_{20}H_{24}O_2$
17β–E2	99,0%	Dr. Ehrenstorfer GmbH®, Augsburg, Germany	Hormônio natural	$C_{18}H_{24}O_2$

3.9 Preparo das soluções padrão mix estoque e de trabalho

Após o preparo de cada padrão individual, foi feita uma solução mix na concentração de 100 µg L^{-1}. A partir desta solução padrão estoque foram obtidas as soluções de trabalho para a elaboração da curva de calibração.

Os pontos da curva de calibração analítica foram preparados a partir de diluições das soluções mix 10 µg L^{-1} em metanol para as concentrações de: 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 µg L^{-1} para os hormônios E3, 17α-EE2 e 17β-E2. Todas as soluções dos padrões dos hormônios foram estocadas em frascos de vidro âmbar, com tampa de teflon, e armazenadas em freezer (-20ºC) até o momento do uso.

3.10 Coleta e armazenamento das amostras

As coletas foram realizadas durante o período de novembro de 2007 a abril de 2009, mensalmente, para o acompanhamento das variações sazonais, totalizando 54 amostras. Foram coletadas amostras de água na entrada da captação do sistema de tratamento de água dos Rios Corumbataí e Piracicaba (água bruta) e água tratada residencial da cidade de Piracicaba, SP (Tabela 4).

Coletou-se 3 frascos de 1 litro para cada amostra, em frascos âmbar previamente descontaminados, identificados, acondicionados em isopor com gelo para serem transportadas até o laboratório e armazenados em geladeira a 4ºC, para posterior extração e análise. A Figura 9 ilustra os pontos de coleta dos Rios Piracicaba e Corumbataí.

Figura 9 – Ponto de coleta nos Rios Piracicaba e Corumbataí

3.11 Análises cromatográficas por HPLC-DAD

3.11.1 Condições cromatográficas

A metodologia descrita por Wang et al. (2008), foi otimizada e adaptada para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD).

A coluna foi mantida em 40°C, o tempo da corrida foi de 62 minutos. O gradiente foi ajustado durante a otimização do método, conforme Tabela 4. O solvente A foi o metanol grau HPLC filtrado com filtro de fibra de vidro a 0,45 µm e o solvente B foi água ultrapura filtrada igualmente ao metanol e degaseificada antes

da utilização. Utilizou-se a vazão de 1,0 mL min^{-1}, com injeção manual de 20 µL. As condições cromatográficas estão listadas conforme Tabela 5.

Tabela 4 – Gradiente utilizado no HPLC-DAD

Tempo (min)	Gradiente A (%)	Gradiente B (%)
0 – 12	51,0	49,0
12 – 26	49,0	51,0
26 – 45	49,0	51,0
45 - 62	49,0	51,0

Tabela 5 – Condições cromatográficas do HPLC/DAD utilizadas para analise dos extratos de água

Condições	Coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) + coluna de guarda C18 (4 x 4 mm, 5 µm)
Fluxo	1 mL min^{-1}
Comprimento de onda	230 nm
Tempo de corrida	62 min
Volume de injeção	Loop de 20 µL
Tempos de retenção	E3: 10,5 min; 17β-E2: 52,8 min; 17α-EE2: 58,4 min
Temperatura da coluna	40ºC
Detector	Arranjo de diodos (DAD)

3.11.2 Análise qualitativa e quantitativa

As análises qualitativa e quantitativa dos hormônios foram maximizadas utilizando-se vários comprimentos de onda com padrões em concentrações diferentes.

Os comprimentos de onda foram definidos baseando-se na literatura (ALDA; BARCELÒ, 2001; ALMEIDA; NOGUEIRA, 2006; WANG ET AL., 2008), os quais foram 210, 230 e 240 nm. Cada padrão foi injetado separadamente e, para identificar o tempo de retenção e o perfil cromatográfico de cada composto, foi selecionado o comprimento de onda que apresentou a melhor resposta espectral da

molécula. Para tanto, foram injetadas em triplicata, padrões nas concentrações de 0,5, 2,5 e 10 µg L^{-1}. Os espectros das moléculas dos hormônios estriol, 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol, que apresentaram melhor resposta por comprimento de onda, estão apresentados nas Figuras 10, 11 e 12, respectivamente.

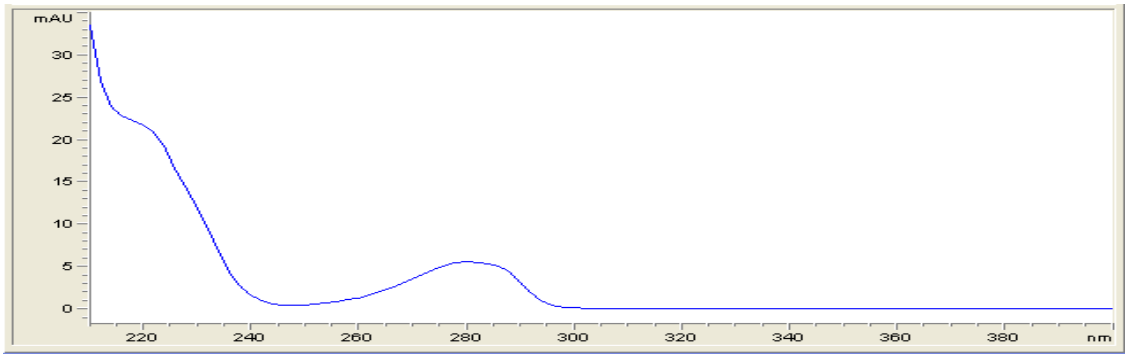


Figura 10 – Espectro da molécula do estriol obtido por comprimento de onda de 230 nm

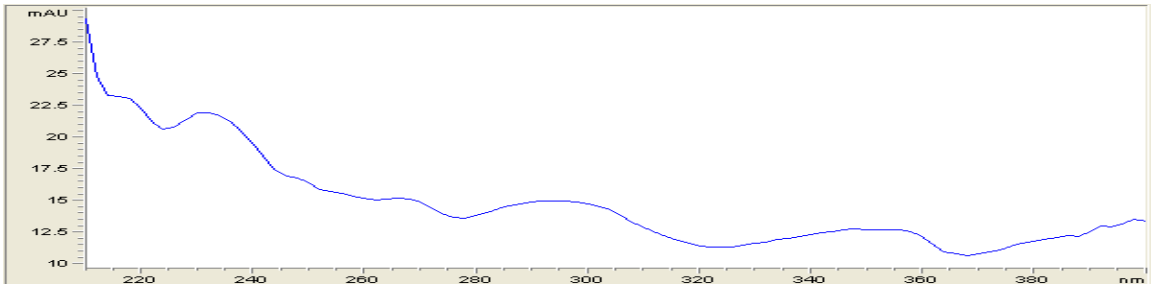


Figura 11 – Espectro da molécula do 17β-estradiol obtido por comprimento de onda de 230 nm

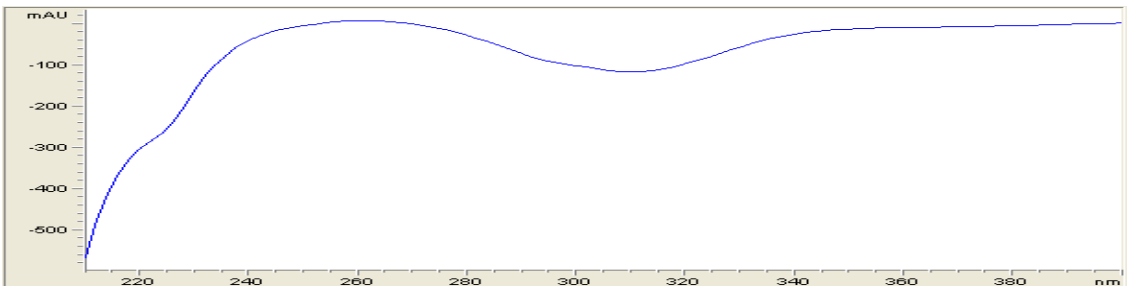


Figura 12 – Espectro da molécula do 17α-etinilestradiol obtido por comprimento de onda de 230 nm

3.11.3 Procedimento de extração das amostras de água

O método foi adaptado da metodologia desenvolvida por Alda e Barcelò (2001), para extração dos hormônios 17β-E2, 17α-EE2 e E3 em amostras de água bruta e tratada. O procedimento de extração foi realizado conforme etapas que seguem:

- Condicionou-se os cartuchos HLB C_{18} 500 mg (OASIS, Waters Corporation®) com 4 mL de metanol com fluxo de 1,5 mL min^{-1}, na sequência passou-se 4 mL de água ultrapura. Para isto foi utilizada uma câmara de vácuo conforme Figura 13;
- Para extração, as amostras foram homogeneizadas em ultra-som por 5 segundos e 200 mL foram filtrados em filtro de fibra de vidro 0,45 µm. Em seguida, transferiu-se para um recipiente limpo de vidro envolto em papel alumínio e, na sequência, as amostras foram adicionadas em cartucho C18, com fluxo de 1,5 mL min^{-1};
- Lavou-se os cartuchos 2 vezes com 4 mL de água ultrapura e descartou-se a água de lavagem e secou-se sob vácuo por 30 min;
- Procedeu-se a eluição dos analitos, utilizando 8 mL de metanol grau HPLC;
- Transferiu-se o eluato para frasco âmbar, secou-se totalmente em banho maria 40ºC com fluxo de gás N_2. Ressuspendeu-se em 4 mL de solução preparada com 49% de metanol e 51% água ultrapura;
- Injetou-se 20 µL do extrato por injeção manual, em injetor com loop de 20 µL.

Figura 13 - Câmara de vácuo utilizada para a extração e o procedimento de *clean-up* dos hormônios das amostras de água

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Validação do método analítico

4.1.1 Seletividade

Para avaliação da seletividade, foi feita uma comparação da matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra. Obteve-se os tempos de retenção do E3, 17β-E2 e do 17α-EE2, 10 min, 52,8 min e 58,4 min, respectivamente.

Utilizou-se um detector com arranjo de diodos para realizar a comparação do espectro do pico obtido na separação com o de um padrão, e utilizou-se isto como uma indicação da presença do composto puro. Para tanto, foram injetados em triplicata, um extrato da amostra do branco (Figura 14), isto é, água ultrapura extraída sem a adição do padrão mix e um branco fortificado contendo os hormônios E3, 17α-EE2 e 17β-E2 (Figura 15).

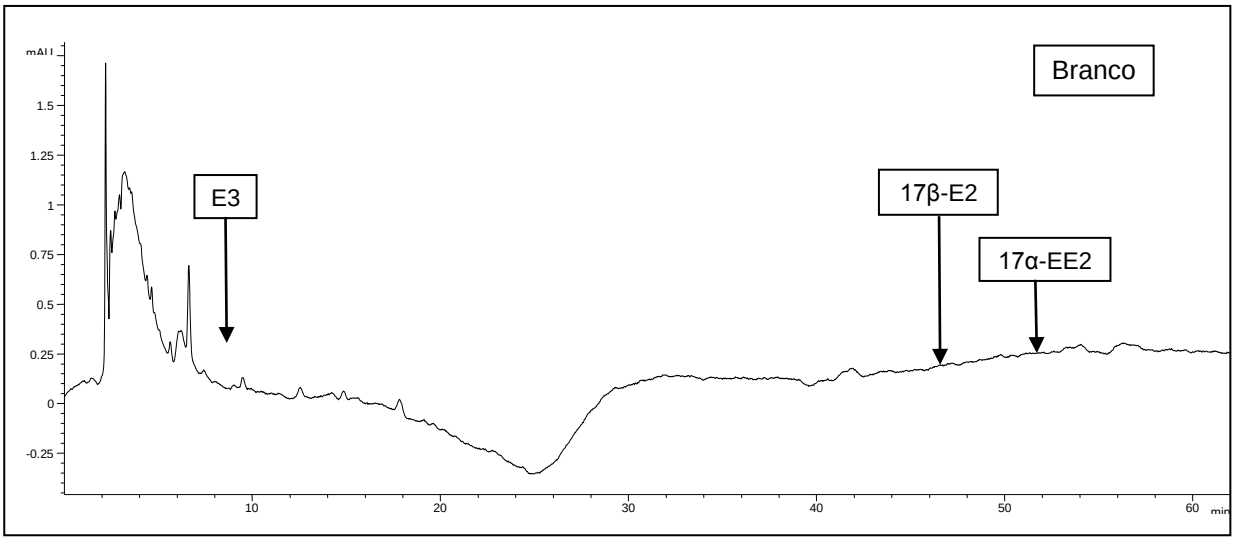


Figura 14 – Cromatograma da amostra branco extraída conforme item 3.11.3, com indicação dos tempos de retenção dos padrões

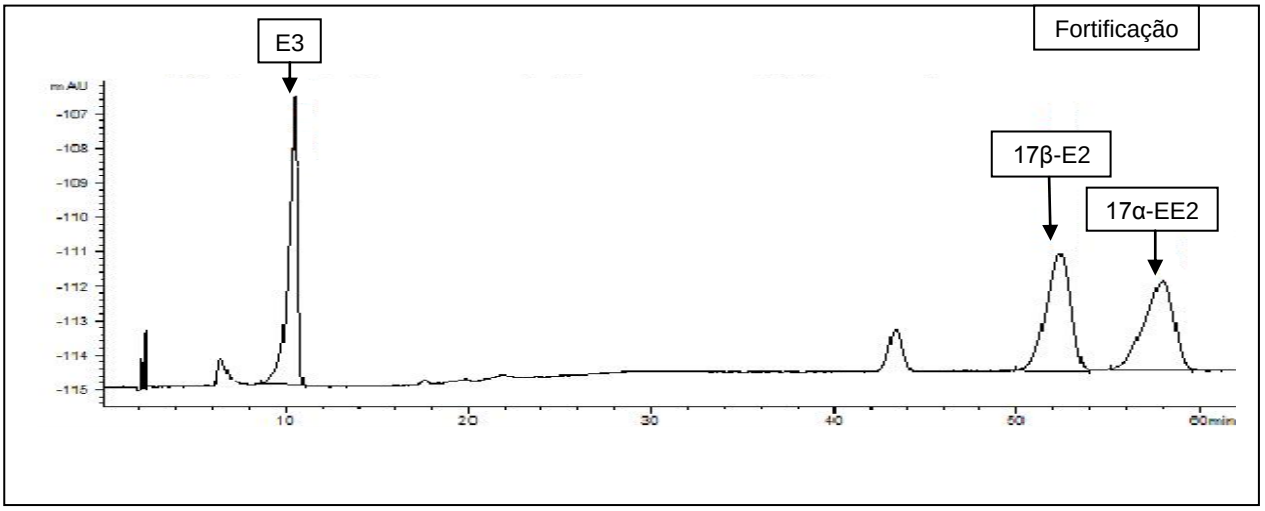


Figura 15 – Amostra fortificada com padrão mix extraída conforme item 3.11.3

O método cromatográfico empregado foi, portanto, considerado seletivo, pois o nível de contaminação e/ou interferente presente na amostra branco foi inferior a 30% do limite de quantificação (GARP,1999).

4.1.2 Linearidade

4.1.2.1 Linearidade do sistema cromatográfico para os hormônios E3, 17β-E2 e o 17α-EE2

As equações da reta e os valores dos coeficientes de correlação (r^2) são apresentadas na Tabela 6, para o método cromatográfico aplicado ao E3, ao 17β-E2 e o 17α-EE2 , utilizou-se 5 pontos com injeções em triplicata para cada ponto da curva de calibração, assim como Wang et al. (2008). A linearidade foi observada na faixa entre 0,5 e 4,0 µg L^{-1} para o método analítico, e foi obtida através da curva-padrão, injetando-se todas concentrações em triplicata.

Os resultados do estudo de linearidade para o hormônios E3, 17β-E2 e 17α-EE2 estão apresentados nas Figuras 16, 17 e 18, nas quais se denotam os valores dos coeficientes de correlação (r^2), 0,9987, 0,9979 e 0,9993, para o E3, 17β-E2 e 17α-EE2, respectivamente.

Tabela 6 – Equações da reta e os valores dos coeficientes de correlação (r^2) para o método cromatográfico aplicado ao E3, 17β-E2 e 17α-EE2

Hormônio	**Coeficiente de correlação (r^2)**	**Equação da reta**
Estriol (E3)	0,9987	y = 132,84x - 5,439
17β-estradiol (17β-E2)	0,9979	y = 139,35x - 3,0485
17α-etinilestradiol (17α-EE2)	0,9993	y = 124,44x - 1,9374

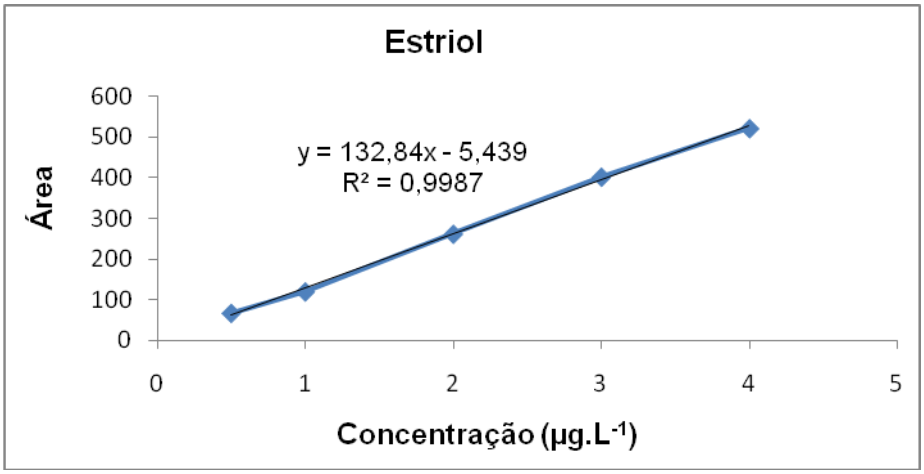


Figura 16 – Curva de calibração do E3 obtida pela injeção de 5 pontos

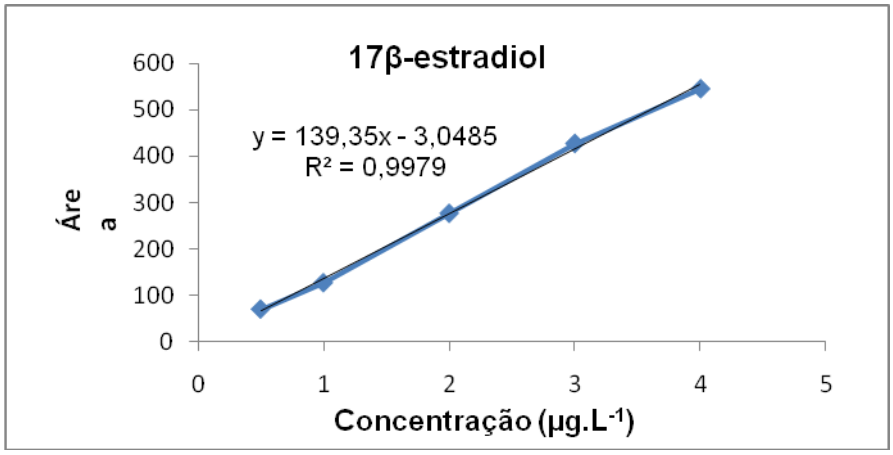


Figura 17 – Curva de calibração do 17β-E2 obtida pela injeção de 5 pontos

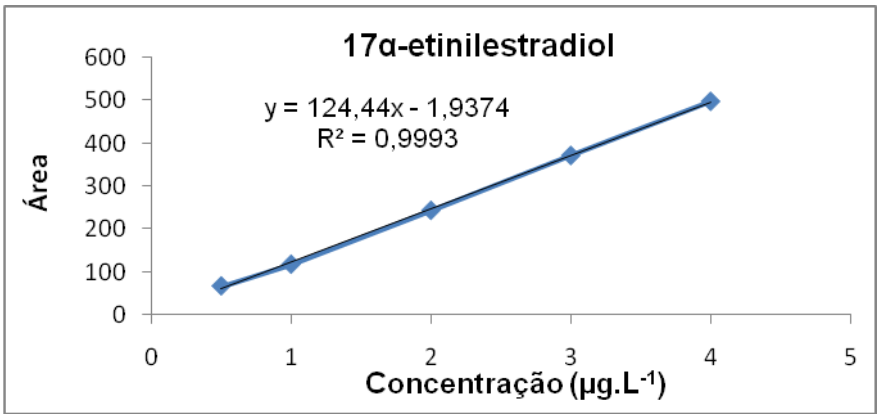


Figura 18 – Curva de calibração do 17α-EE2 obtida pela injeção de 5 pontos

4.1.3 Precisão

Para avaliar a repetibilidade do método cromatográfico, uma mesma amostra do padrão mix 1,0 µg L^{-1} foi injetada sete vezes pelo mesmo operador, nas mesmas condições de operação e no mesmo dia. A média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo das medidas do tempo de retenção e da altura dos picos obtidos dos hormônios estriol, 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol, são apresentados nas Tabelas 7, 8 e 9, respectivamente.

Tabela 7 – Repetibilidade do método cromatográfico para a determinação do estriol

Parâmetro	**Tempo de retenção (min)**	**Altura (mAu)**
Média	10,55	7,14
Desvio Padrão	11,94	0,39
Desvio Padrão Relativo	1,81	5,46

Tabela 8 – Repetibilidade do método cromatográfico para a determinação do 17β-estradiol

Parâmetro	**Tempo de retenção (min)**	**Altura (mAu)**
Média	52,90	1,93
Desvio Padrão	8,44	0,21
Desvio Padrão Relativo	1,09	10,88

Tabela 9 – Repetibilidade do método cromatográfico para a determinação do 17α-etinilestradiol

Parâmetro	**Tempo de retenção (min)**	**Altura (mAu)**
Média	58,46	2,98
Desvio Padrão	10,59	0,24
Desvio Padrão Relativo	0,78	8,05

A precisão do método também foi avaliada repetindo-se três vezes a extração seguindo o método apropriado e as amostras foram fortificadas em três níveis de concentração (1,0, 2,0 e 3,0 µg L^{-1}) e injetadas em triplicata. Calculou-se o desvio

padrão *(s)* e o coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (RSD) dos hormônios, conforme descrito na Tabela 10.

Tabela 10 – Porcentagem de recuperação média (%), valores de *(s)* e coeficiente de variação (CV%), aos níveis de 1,0, 2,0 e 3,0 µg L^{-1} para o E3, 17α-EE2 e 17β-E2, analisados por HPLC-DAD

Fármaco	**Concentração (µg L^{-1})**	**Recuperação média (%)***	**Desvio padrão *(s)***	**Coeficiente de variação médio (CV%)***
E3	1,0	82,56	11,42	10,52
17β-E2	1,0	97,02	8,44	10,22
17α-EE2	1,0	65,02	15,55	13,65
E3	**2,0**	**112,38**	**20,90**	**5,71**
17β-E2	**2,0**	**97,87**	**17,06**	**6,14**
17α-EE2	**2,0**	**116,75**	**20,42**	**5,07**
E3	3,0	97,57	11,55	0,84
17β-E2	3,0	100,02	19,54	1,03
17α-EE2	3,0	93,97	31,86	1,51

Recuperação média é a média entre os valores de Recuperação dos três níveis de fortificação;
Coeficiente de variação médio é a média entre os valores de CV dos três níveis de fortificação

Os valores dos coeficientes de variação variaram entre 0,84 e 10,52%, apresentando baixa dispersão dos dados. As recuperações médias obtidas ficaram entre 65,02 e 112,38%, as quais estão dentro do intervalo aceitável admitido pelo GARP (1999), de 70 a 120%, com precisão de até ± 20%.

4.2.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio de ensaios de recuperação e pela comparação de métodos.

4.2.4.1 Ensaio de recuperação

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até ± 20% (GARP, 1999).

A recuperação foi avaliada repetindo-se três vezes a extração seguindo o método apropriado e as amostras foram fortificadas em três níveis de concentração (1,0; 2,0 e 3,0 µg L^{-1}) e injetadas em triplicata. Calculou-se o desvio padrão *(s)* e o coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (RSD) dos dados obtidos pela injeção dos hormônios para cada hormônio. Nas Figuras 19, 20 e 21 são apresentados os cromatogramas obtidos das fortificações.

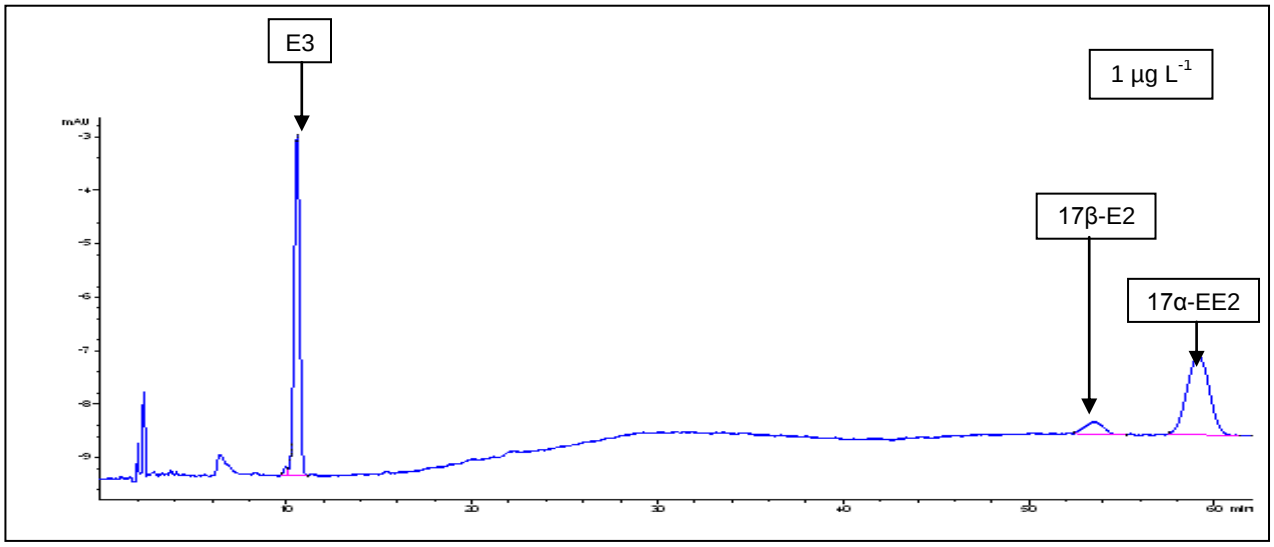


Figura 19 – Cromatograma da recuperação obtida para os hormônios E3, 17β-E2 e 17α-EE2, obtido por HPLC para amostra de água fortificada no nível de 1,0 µg L^{-1}

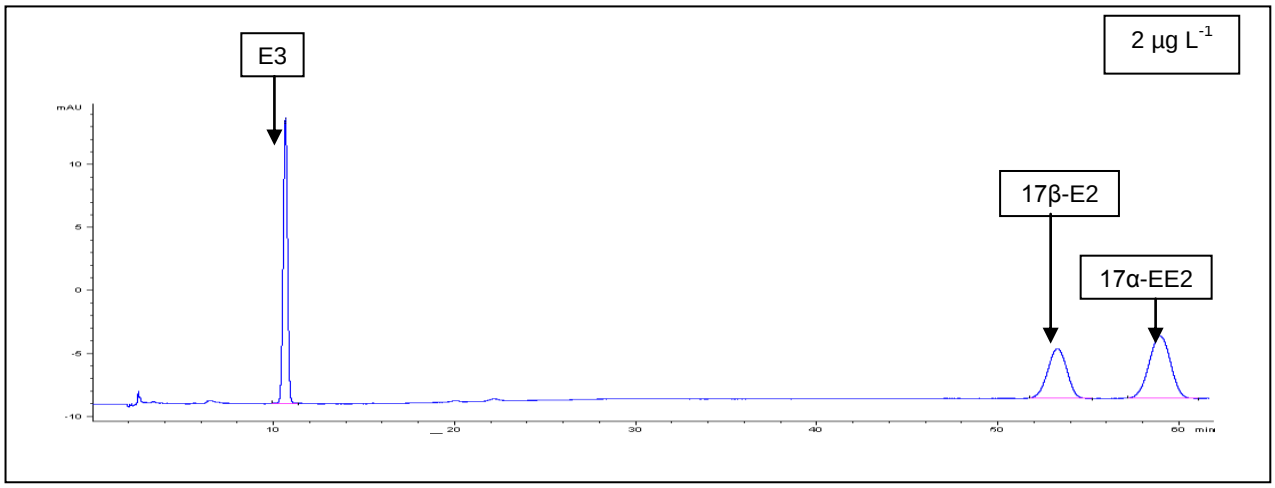


Figura 20 – Cromatograma da recuperação obtidas para os hormônios E3, 17β-E2 e 17α-EE2, obtido por HPLC para amostra de água fortificada no nível de 2,0 µg L^{-1}

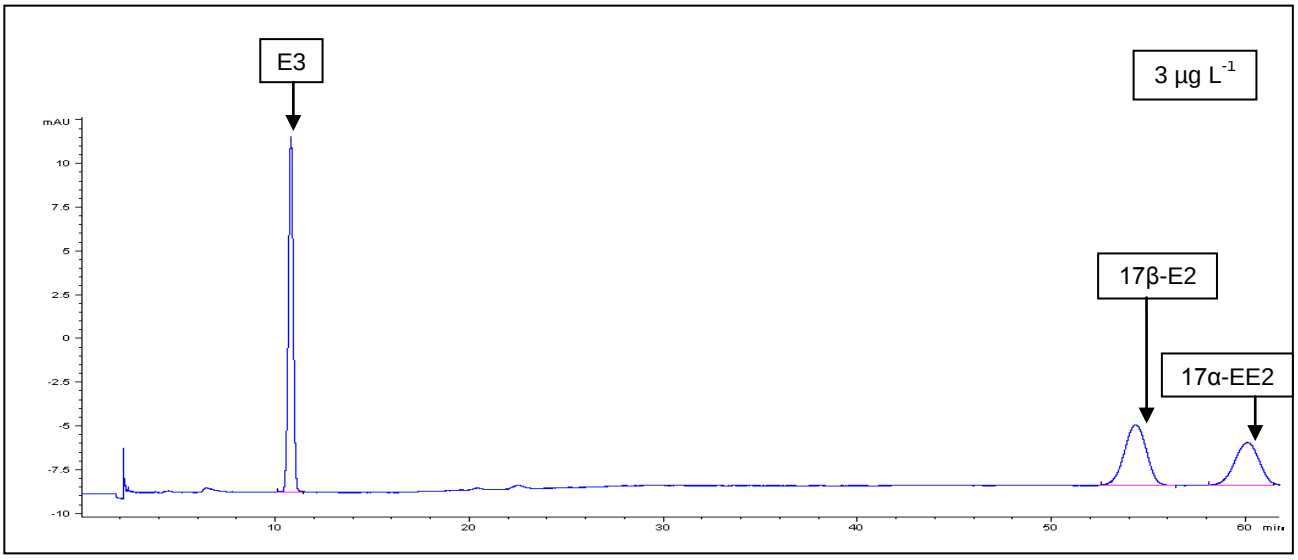


Figura 21 – Cromatograma da recuperação obtida para os hormônios E3, 17β-E2 e 17α-EE2, obtido por HPLC para amostras de água fortificada no nível 3,0 µg L^{-1}

4.2.4.1.1 Ensaio de recuperação para o hormônio estriol

Para a avaliação do nível de recuperação para o hormônio E3 em amostras de água, foram preparadas fortificações em três níveis de concentração. Triplicatas das amostras foram fortificadas com os padrões de 1,0, 2,0 e 3,0 µg L^{-1} em 200 mL

de água ultrapura. A Tabela 11 apresenta os níveis de fortificação e recuperação do método para o hormônio E3.

Tabela 11 – Porcentagem de recuperação média (%), valores de desvio padrão *(s)* e coeficiente de variação (CV%), para os níveis de 1,0, 2,0 e 3,0 µg L^{-1} para o E3, analisados por HPLC

Fármaco	**Concentração (µg L^{-1})**	**Recuperação média (%)***	**Desvio padrão *(s)***	**Coeficiente de variação médio (CV%)***
E3	1,0	82,56	11,42	10,52
	2,0	112,38	20,90	5,71
	3,0	97,57	11,55	0,84

Os valores de recuperação para o estriol variaram entre 82,56 e 112,38%, os quais estão dentro do intervalo aceitável de recuperação para análise de resíduos que, de acordo com o GARP (1999), são aceitáveis entre 70 e 120%, com precisão de até ± 20%.

A porcentagem de recuperação do estriol nas amostras de água ultrapura fortificadas com padrão mix a 3,0 µg L^{-1}, alcançaram o valor de 97%, ficando muito próximo ao encontrado por Wang et al. (2008), o qual utilizou a mesma concentração de fortificação em amostras de água bruta de rio e obteve o valor de 91%, utilizando também C18 como sorbente do cartucho de extração em fase sólida (SPE).

Alda e Barcelò (2001) obtiveram porcentagens de recuperação de 99% para o hormônio E3, utilizando cartucho OASIS com 200 mL de amostra fortificada a 1,0 µg L^{-1}, já no presente estudo encontrou-se a porcentagem de recuperação de 82,56% para a mesma amostra.

4.2.4.1.2 Ensaio de recuperação para o hormônio 17β-estradiol

Para a avaliação do nível de recuperação para o E2 em amostras de água, foram preparadas fortificações em três níveis de concentração. Triplicatas das

amostras foram fortificadas com os padrões de 1,0, 2,0 e 3,0 µg L^{-1} em 200 mL de água ultrapura. Na Tabela 12 são apresentados os níveis de fortificação e recuperação do método para o 17β-E2.

Tabela 12 – Porcentagem de recuperação média (%), valores de desvio padrão *(s)* e coeficiente de variação (CV%), para os níveis de 1,0, 2,0 e 3,0 µg L^{-1} para o 17β-E2, analisados por HPLC

Fármaco	**Concentração (µg L^{-1})**	**Recuperação média (%)***	**Desvio padrão *(s)***	**Coeficiente de variação médio (CV%)***
17β-E2	1,0	97,02	8,44	10,22
	2,0	97,87	17,06	6,14
	3,0	100,02	19,54	1,03

Os valores de recuperação para o 17β-estradiol variaram entre 91,44 e 100,02%, os quais estão dentro do intervalo aceitável de recuperação para análise de resíduos que, de acordo com o GARP (1999), geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até ± 20%.

A porcentagem de recuperação do 17β-estradiol nas amostras de água ultrapura fortificadas com padrão mix a 3,0 µg.L^{-1}, alcançou o valor de 100,02, também muito próximo ao encontrado por Wang et al. (2008), o qual utilizou a mesma concentração de fortificação em amostras de água bruta de rio e obteve o valor de 99%, o qual utilizou como sorbente o C18.

Alda e Barcelò (2001) obtiveram porcentagens de recuperação de 97% para o hormônio 17β-E2, utilizando cartucho OASIS com 200 mL de amostra fortificada a 1,0 µg L^{-1}, no presente estudo encontrou-se a mesma porcentagem de recuperação para a amostra analisada.

4.2.4.1.3 Ensaio de recuperação para o hormônio 17α-etinilestradiol

Para a avaliação do nível de recuperação para o EE2 em amostras de água, foram preparadas fortificações em três níveis de concentração. Triplicata das amostras foram fortificadas com os padrões de 1,0, 2,0 e 3,0 µg L^{-1} em 200 mL de água ultrapura. Na Tabela 13 são apresentados os níveis de fortificação e recuperação do método para o 17α-EE2.

Tabela 13 – Porcentagem de recuperação média (%), valores de desvio padrão *(s)* e coeficiente de variação (CV%), para os níveis de 1,0, 2,0 e 3,0 µg L^{-1} para o 17α-EE2, analisados por HPLC

Fármaco	**Concentração (µg L^{-1})**	**Recuperação média (%)***	**Desvio padrão *(s)***	**Coeficiente de variação médio (CV%)***
17α-EE2	1,0	65,02	15,55	13,65
	2,0	116,75	20,42	5,07
	3,0	93,97	31,86	1,51

Os valores de recuperação para o 17α-etinilestradiol variaram entre 93,97 e 126,83%, os quais estão dentro do intervalo aceitável de recuperação para análise de resíduos que, de acordo com o GARP (1999), devem estar entre 70 e 120%, com precisão de até ± 20%.

Alda e Barcelò (2001) obtiveram porcentagens de recuperação de 97% para o hormônio 17α-EE2, utilizando cartucho OASIS com 200 mL de amostra fortificada a 1,0 µg L^{-1}, no presente estudo encontrou-se a mesma porcentagem de recuperação para a amostra analisada.

4.2.3 Determinação dos valores de LD e LQ

Os limites de detecção (LD) foram calculados através do método visual, distinguindo-se o ruído e o sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável). Os limites de quantificação (LQ) para cada um dos hormônios foram determinados injetando-se o primeiro nível de concentração da curva analítica. Para os cálculos dos LQ e LD, injetou-se em triplicata, a menor concentração da curva analítica, (0,5 µg L^{-1}) da solução mix do padrão contendo E3, 17α-EE2 e 17β-E2, o cromatograma obtido é apresentado na Figura 22. Os valores de LD e LQ obtidos estão apresentados na Tabela 14.

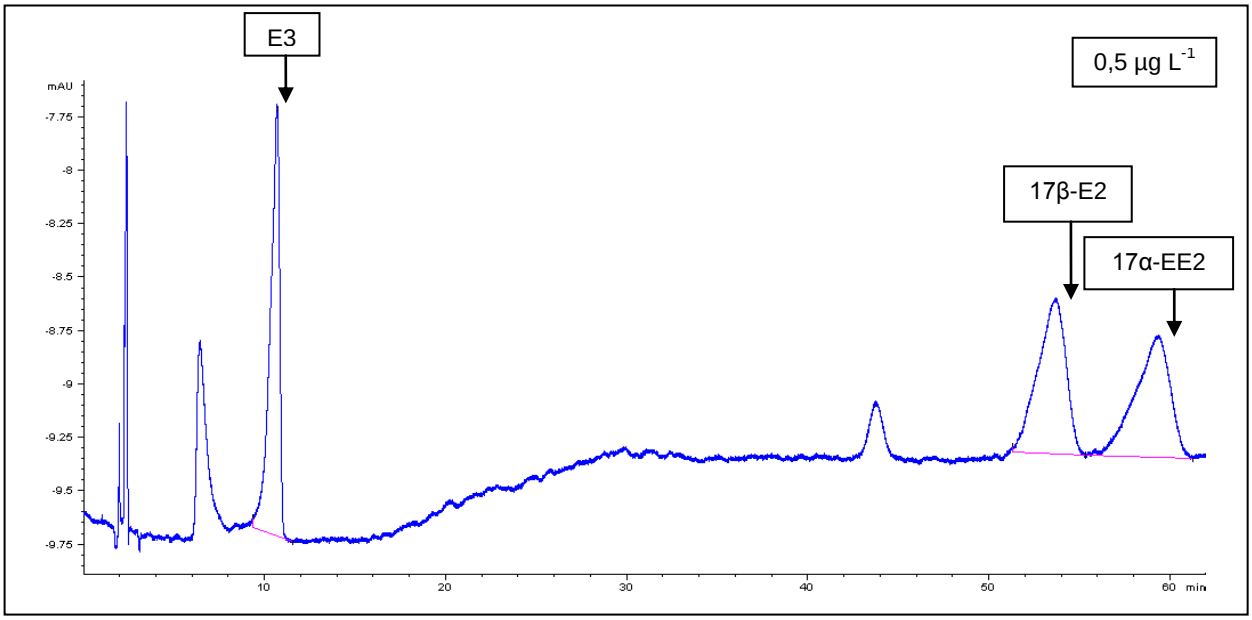


Figura 22 – Cromatograma do mix do padrão contendo E3, 17α-EE2 e 17β-E2 na concentração de 0,5 µg L^{-1}

Tabela 14 – Coeficientes linear (s) e angular (S) dos hormônios, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Hormônios	**r^2**	**LD (µg L^{-1})**	**LQ (µg L^{-1})**
E3	0,9987	0,025	0,5
17β-E2	0,9979	0,070	0,5
17α-EE2	0,9993	0,090	0,5

Não houve variações significativas entre os valores do LD para os compostos 17β-E2 e 17α-EE2, no entanto, observa-se uma variação no valor do LD do E3 significativa. Esta divergência deve ter ocorrido devido ao fato desta molécula apresentar ligações químicas que a tornam menos detectável por DAD, Araújo (2006), analisou esta molécula por detector de fluorescência e obteve limite de detecção menor que o obtido neste trabalho.

Os limites de detecção para os compostos estão abaixo dos limites estabelecidos por Almeida e Nogueira (2006), os quais encontraram LDs de 50 μg L^{-1} para o 17β-E2 e 300 μg L^{-1} para o 17α-EE2, valores muito acima do estabelecido neste estudo, que foi de 0,5 μg L^{-1}.

4.3 Efeito de matriz

Para o cálculo de interferência de matriz, foram preparadas duas curvas analíticas, uma em extratos da matriz (preparados conforme item 3.11.3) e outra utilizando mix dos padrões em metanol. Os coeficientes angulares das curvas realizadas na matriz e em solvente e os efeitos da matriz para cada composto estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Avaliação do efeito de matriz pelos valores dos coeficientes angulares das curvas em solvente e em matriz

Hormônio	Coef. angular (curva no solvente)	Coef. angular (curva na matriz)	Variação entre coef. angulares (%)	Avaliação
E3	132,84	132,68	0,76	Efeito de matriz não significativo
17β-E2	139,35	144,48	3,68	Efeito de matriz não significativo
17α-EE2	124,44	123,28	- 0,93	Efeito de matriz não significativo

Verificou-se que a matriz exerce pouco efeito positivo para os compostos E3 e 17β-E2 e negativo para o composto 17α-EE2 sobre o resultado. Os resultados das análises indicaram que não houve influência do efeito da matriz, pois foi abaixo de 10%.

4.4 Determinação de hormônios em amostras de água bruta e tratada

Segundo Ternes et al.(1999), os quais identificaram a presença de vários estrogênios no esgoto doméstico e efluentes de estação de tratamento de esgoto (ETE) no Brasil, concluíram que esses estrogênios são frequentemente detectados nos descartes de ETE e águas naturais devido à sua remoção incompleta na passagem pela ETE.

Estas moléculas podem causar danos ambientais e de saúde humana e seus efeitos podem ser evidenciados em qualquer nível da hierarquia biológica: célula, órgãos, organismo, população e ecossistema (BILA; DEZOTTI, 2003). De acordo com Jorgensen e Halling-Sorensen (2000), alguns desses efeitos podem ser observados em concentrações na água na ordem de çg L^{-1}, os quais podem ser a redução na produção de esperma e aumento da incidência de alguns tipos de câncer (BILA; DEZOTTI, 2007).

A solubilidade em água torna os hormônios compostos mais móveis e pode, portanto, contaminar a hidrosfera ameaçando o lençol freático. A lipofilicidade dos hormônios colaboram com a bioacumulação e acumulam nos sedimentos (JORGENSEN; HALLING-SORENSEN, 2000).

No presente estudo, o resíduo do hormônio 17á-EE2 esteve presente em 4 das 54 amostras analisadas. Raimundo (2007) encontrou resíduos do mesmo composto em 5 de um total de 34 amostras analisadas. Raimundo (2007) analisou oito substâncias químicas, que foram detectadas ao menos uma vez nas amostras. São elas, dibutilftalato, bisfenol A, 17â-E2, 17á-EE2, progesterona, levonorgestrel, 4-octilfenol e 4-nonilfenol.

Neste trabalho realizado com os Rios Piracicaba e Corumbataí e água tratada, dos dois compostos hormonais mais frequentemente detectados nas 54 amostras analisadas, o estriol foi encontrado em maior número de vezes (12,96 %) e o 17á-etinilestradiol que apareceu em 7,4 % das amostras. As concentrações dos dois compostos mais frequentemente determinados nas amostras, são mostradas na Tabela 16, onde se observa que as concentrações dos dois compostos variaram em até 1,5 ordem de magnitude. Vethaak et al. (2005) realizaram um estudo sobre a ocorrência de interferentes endócrinos em diversas matrizes ambientais e verificaram que a concentração de alguns interferentes endócrinos variou em até duas ordens de magnitude.

Os compostos mostrados na Tabela 17 apresentaram baixa variabilidade dos resultados. A concentração encontrada do 17á-etinilestradiol foi na faixa de 0,19 a 0,3 µg L^{-1} e, nas amostras nas quais encontrou-se contaminação, foram coletadas no período de estiagem. O 17á-EE2 também foi encontrado em águas superficiais de países como Alemanha em concentrações entre 0,4 e 1,4 çg L^{-1} (ADLER et al., 2001; KUCH; BALLSCHMITER, 2001) e Inglaterra, em concentrações abaixo de 5 çg L^{-1} em setembro de 1982, e 2-15 çg L^{-1} em agosto de 1987 (AHERNE; BRIGGS, 1989).

O 17â-estradiol é um estrogênio pertencente à classe dos estrenos e, juntamente com o estriol e o estreno, são considerados uns dos principais hormônios produzidos no corpo humano, exercendo papel fundamental no controle do ciclo mestrual em conjunto com a progesterona. Sua presença em águas naturais é um forte indício da contaminação pelo aporte de esgoto doméstico (DESBROW, 1998). Dentre as amostras analisadas (n=54), não foi encontrado nenhum indício de contaminação pelo 17â-estradiol, o que pode indicar que não houve contaminação por esgoto doméstico nas amostras analisadas.

O composto estriol foi encontrado em maiores concentrações na campanha amostral realizada durante o período de chuvas, isto pode ser devido à sua alta solubilidade em água, em torno de 13 mg L^{-1}. O estriol é um metabólito de andrógenos e estrógenos, por isso a contaminação deste composto nas amostras de água pode indicar a presença de outros hormônios metabolizados, como, por exemplo, a estrona, testosterona, entre outros.

Na data em que foram realizadas as coletas do ano de 2007, havia um período de secas em novembro e em dezembro. No período de coleta em 2008, em fevereiro e março houve dias de chuvas intensas, já nos meses de abril, junho, agosto e setembro, houve época de seca. O mês de julho de 2008 foi o que apresentou a mais baixa média de pluviometria, 0,3 mm. Os níveis de contaminação das amostras estavam acima do LD, mas abaixo do LQ.

Os eventos de chuvas em alguns dias isolados, por menor que foram, favoreceram a diminuição da concentração dos compostos, que ocorreu nos meses de novembro e dezembro de 2007, e nos meses de fevereiro, março, abril, junho, julho, agosto e setembro de 2008.

Tabela 16 – Níveis de concentração dos hormônios nas amostras analisadas por HPLC-DAD

Ponto de coleta	**Mês de coleta**	**Pluviometria dia da coleta (mm)**	**Média mensal de pluviometria (mm)**	**Concentração ($\mu g\ L^{-1}$)**	**Hormônio**
ST	N/07	0,0	120,3	0,114	E3
ST	D/07	35,9	188,6	0,314	E3
RC	D/07	35,9	188,6	0,146	E3
ST	F/07	0,0	153,7	0,125	E3
RP	M/08	0,0	132,4	0,137	E3
RC	AB/08	0,0	174,6	0,116	E3
ST	JN/08	0,5	43,5	0,195	E3
ST	JN/08	0,0	43,5	0,305	17á-EE2
ST	JL/08	0,0	0,0	0,199	17á-EE2
ST	AG/08	0,0	68,7	0,197	17á-EE2
RP	S/08	0,0	46,1	0,191	17á-EE2

Fonte: ESALQ/USP (2004)
ST = saída do tratamento; RP = Rio Piracicaba; RC = Rio Corumbataí; N = novembro; D = dezembro; F = fevereiro; M = março; AB = abril; JN = junho; JL = julho;AG = agosto; S = setembro

O 17á-EE2 é um hormônio sintético utilizado principalmente em medicamentos anticoncepcionais. No corpo humano, apenas 15 % da substância é metabolizada enquanto que o restante é eliminado no esgoto, por isso, este hormônio também é considerado um indicador de contaminação fecal (RAIMUNDO,

2007). O resíduo deste composto em água tratada é indesejável e tem-se a preocupação em minimizar a exposição de possíveis consumidores susceptíveis, como as crianças. Contudo, a concentração da exposição ao etinilestradiol via água potável (1 - 2 çg dia^{-1}) pode ser comparada com a dose diária de esteróides, a qual é de 0,1 mg dia^{-1} (HARTMANN et al., 1998; FRITSCHE; STEINHART, 1999).

De 60 a 80% dos esteróides sexuais femininos ingeridos está associada a produtos derivados do leite (HARTMANN et al., 1998). Em comparação com a produção diária humana de hormônios esteróides, a exposição diária é considerada insignificante (HARTMANN et al., 1998; FRITSCHE; STEINHART, 1999). A produção endógena do estrogênio masculino é da ordem de 20 mg dia^{-1} de estradiol e 20 mg dia^{-1} de estriol (JUNGERMANN; MÖHLER, 1980).

As concentrações dos hormônios E3 e 17â-E2 quantificadas nas amostras deste trabalho, estão acima dos valores descritos pelas metodologias desenvolvidas por Alda e Barcelò (2001) e Wang et al. (2008), os quais encontraram concentrações na faixa de çg L^{-1}, sendo que, nas amostras dos Rios Piracicaba, Corumbataí e água tratada, foram encontradas contaminações em 7 amostras, variando na faixa de 0,11 a 0,31 µg L^{-1}, valores superiores ao LD, estabelecido em 0,025 µg L^{-1}. O E3 também foi encontrado nas águas do Rio Tiber, na Itália, na concentração de 0,33 çg L^{-1} (YING; KOOKANA; RU, 2002).

Como não há na legislação brasileira limites estabelecidos para os hormônios E3, 17á-EE2 e 17â-E2 em água tratada, os níveis de hormônios nas amostras analisadas não podem ser classificados adequadamente, no que concerne aos limites permitidos para consumo humano. Com base nestas informações, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), necessita estabelecer urgentemente valores máximos permissíveis para estes compostos em águas de abastecimento urbano.

Comparando as concentrações obtidas durante o presente estudo com outros estudos publicados, os níveis dos compostos são, com frequência, da mesma ordem de magnitude daqueles encontrados em outros países (SERVOS, 1999; TERNES et al., 1999; KOLPIN et al., 2002; VETHAAK et al., 2002; YING et al., 2002; ISOBE; TAKABA, 2004). No entanto, muitas conclusões podem ser somente tiradas de um

modo geral. Concentrações variam, consideravelmente, em diferentes localidades e em diferentes tipos de corpos hídricos. Além disso, diferenças nos métodos de coleta e técnicas de análise (notadas pelos limites de detecção), frequentemente impedem comparações mais detalhadas.

Apesar do equipamento utilizado (detector), apresentar sensibilidade menor do que o usado por Belfroid et al. (1999), Baronti et al. (2000), Kuch e Ballschmiter (2001) e Gómez (2006), os hormônios foram detectados em µg L^{-1}. Contudo, pode-se inferir que as concentrações dos analitos de interesse nas amostras de água bruta e tratada que deram positivas, estavam acima dos limites de detecção do método analítico, estabelecido para os compostos encontrados (E3 e 17á-EE2).

Wang et al. (2008) analisou água do Rio Haihe (China) e encontrou estradiol em níveis de concentração de 1,3 µg L^{-1} utilizando C18 como sorvente, já no presente estudo, nenhuma das 54 amostras analisadas apresentaram contaminação por este composto.

Em um estudo realizado por Ternes et al.(1999), foram encontrados estrogênios naturais e contraceptivos sintéticos na ETE da Penha/RJ. Os estrogênios estrona, 17â-estradiol e 17á-etinilestradiol recebem uma atenção especial, pois são continua e diariamente excretados no esgoto e não são completamente removidos nas ETE (TERNES et al., 1999; TERNES; KRECKEL; MUELER, 1999).

De acordo com Bila e Dezotti (2007), estes fármacos podem ser lançados continuamente nos sistemas aquáticos e podem ser encontrados nas águas superficiais, muitas vezes usadas como suprimento de água potável.

No estudo realizado por Alda e Barcelò (2001) em amostras de água bruta foram encontrados resíduos estrógenos em vários tipos de matrizes aquosas nos níveis entre 25-300 ηg L^{-1} e 10 µg L^{-1}, dentre estes compostos, o estradiol e o etinilestradiol são capazes de induzir a alterações no sistema endócrino em organismos vivos às concentrações em água abaixo de 1 ηg L^{-1} (PURDOM et al., 1994; HANSEN et al., 1998).

Contudo, no Brasil ainda é escassa a base de dados das contaminações por estes compostos em águas superficiais e outros compartimentos, portanto, não há dados para efetivas comparações com os dados coletados neste trabalho, pois não havia, até o momento, nenhum estudo realizado nos Rios Piracicaba e Corumbataí e água tratada da cidade de Piracicaba, com relação à contaminação por hormônios.

4.5 Hormônio estrona

O hormônio estrona foi incluído nas etapas iniciais do projeto, mas seu pico se sobrepôs ao do 17β-E2 e, para trabalhar com este composto, necessitaria de um novo método e uma nova validação de metodologia e, portanto, ele foi excluído do estudo.

5. CONCLUSÕES

- O método otimizado apresentou características como rapidez, simplicidade, confiabilidade, baixo custo, baixo consumo de solventes, necessidade de pouca vidraria e resultados satisfatórios para os hormônios estudados;

- O método de SPE/HPLC/DAD desenvolvido e validado apresenta valores dos limites de detecção e de quantificação adequados para analisar hormônios nas amostras de água dos Rios Corumbataí e Piracicaba e água de abastecimento urbano de Piracicaba, pois trata-se de um estudo de caso;

- Do total de amostras de água analisadas em diferentes estações do ano, apenas 11 acusaram presença de resíduos, fato que pode ser devido à ação antrópica;

- O hormônio estrona não apresentou resposta analítica nas condições do método otimizadas e, por isso, não foi incluído no estudo;

- O presente estudo de validação realizado com a metodologia, constitui-se em um método implantado e otimizado para as condições do laboratório e foi demonstrado que, o método com extração em fase sólida (SPE) tem potencial para aplicação nas análises de rotina de hormônios (E3, 17α-EE2 e 17β-E2) em amostras de água bruta e tratada;

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os dados coletados neste estudo de contaminação das amostras de água bruta e tratada, são um início para a ANVISA (Agência de Vigilância Sanitária) realizar uma revisão das legislações existentes e inserir limites máximos permitidos destes compostos em diversas matrizes ambientais;

- Devem-se desenvolver estudos envolvendo testes em organismos para as amostras ambientais advindas das bacias dos Rios Corumbataí e Piracicaba;

- O resíduo deste composto em água tratada é indesejável e tem-se a preocupação em minimizar a exposição de possíveis consumidores susceptíveis, como as crianças.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂCIA SANITÁRIA – ANVISA. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br, Acesso em: jul. 2009.

ALMEIDA, C; NOGUEIRA, J.M.F. Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Lisboa, v. 41, p. 1303-1311.

AMERICAN COUNCIL ON SCIENCE AND HEALTH – ACSH. **Endocrine disrupters**: a scientific perspective. New York: ACSH, 1999.

ANKLEY, G. T.; BROOKS, B. W.; HUGGETT, D. B.; SUMPTER, J. P. Repeating History: pharmaceuticals in the environment. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 15, p. 8211-8217, 2007.

ARAÚJO, J. C. **Estudo da eficiência do tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara-SP na remoção de hormônios sexuais**. 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

ASSOCIAÇÃO GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS – GARP. **Manual de resíduos de pesticidas em alimentos**. (apostila), 1999.

BARCELÒ, D. Los fármacos son el principal contaminantes emergentes. **Diario Médico**, Madrid, 2004. Disponível em: http://www.boletinfarmacos.org/012005/noticias%20varias.htm, Acesso em: jun. 2009.

BARCELÒ, D.; HENNION, M. C. **Trace determination of pesticides and their degradation products in water**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 1997. 542 p.

BARONTI, C.; CURINI, R.; D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; GENTILI, A.; SAMPERI, R. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated treatment plants and in receiving river water. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 34, p.5059–5066.

BELFROID, A.C.; VAN DER HORST, A.; VETHAAK, A.D.; SCHÄFER, A.J.; RIJS, G.B.J.; WEGENER, J.; COFINO, W.P. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. **The Science of the Total Environment**, Netherlands, v. 225, p. 101-108, 1999.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

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

BODZEK, M.; DUDZIAK, M. Elimination of steroidal sex hormones by conventional water treatment and membrane processes. **Desalination**, Oxford, v. 198, p. 24-32, 2006.

CARRERA, E. P.; GARCÍA-LOPEZ, A.; MARTIN del RÍO MDEL, P.; MARTIN-RODRÍGUEZ, G.; SOLÉ, M.; MANCERA, J. M. Effects of 17β-estradiol and 4-nonylphenol on osmoregulation and hepatic enzymes in gilthead sea bream (*Sparus auratus*). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C**, Oxford, v. 145, p. 210–217, 2007.

CASEY, F. X. M.; LARSEN, G. L.; HAKK, H.; SIRI, S. Fate and transport of 17β-estradiol in soil - water systems. **Environmental Science & Technology,** Easton, v. 37, p. 2400-2409, 2003.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES - CEC. **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: CEC, 1999. (COM, 706 Final).

CHRISTENSEN, F.M. Pharmaceuticals in the environment - a human risk? **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, San Diego, v. 28, p. 212-221, 1998.

COMITÊ DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DOS RIOS PIRACICABA, CAPIVARI E JUNDIAÍ. Caracterização dos recursos hídricos. In: _____. **Plano de bacias hidrográficas 2004-2007 dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí**. Relatório final. Piracicaba, 2007. cap. 8, p. 194-228. Disponível em: http://www.comitepcj.sp.gov.br/download/PB/PB0407_Cap08.pdf. Acesso em: 25 jun. 2009.

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. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 32, p. 1549-1558, 1998.

ESALQ/USP, LCE. Base de dados da Estação Automática. Posto Agrometeorológico.**http://www.esalq.usp.br/departamentos/lce/base.html**. Piracicaba, 2003. Disponível em: http://www.esalq.usp.br/departamentos/lce/automatica/pagina5.html. Acesso em: 15 mai. 2009.

EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS. **Validation of analytical procedures**: definitions and terminology. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 1995, London. CPMP/ICH/381/95 – ICH Q2A. p. 119-125.

FATTA, D.; NIKOLAOU, A.; ACHILLEOS A.; MERIÇ, S. Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 26, n. 6, p. 515-533, 2007.

FRITSCHE, S.; STEINHART, H. Occurrence of hormonally active compounds in food: a review. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 209, p. 153-179, 1999.

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

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

GOWER, D.B. Catabolism and excretion of steroids. In: MAKIN, H. L. J. (Ed.). **Biochemistry of steroid hormones**. Oxford, UK: Blackwell, 1975. p. 127-148.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 68, n. 9, p. A305-A309, 1996.

HANSEN, P.-D.; DIZER, H.; HOCK, B.; MARX, A.; SHERRY, J.; McMASTER, M.; BLAISE, Ch. Vitellogenin - a biomarker for endocrine disruptors. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 17, p. 448-451, 1998.

HARTMANN, S.; LACORN, M.; STEINHART, H. Natural occurrence of steroid hormones in food. **Food Chemistry,** Oxford, v. 62, n. 1, p. 7-20, 1998.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC International**, Eugene, OR, p. 96-105, 1998. Disponível em: <http://www.labcompliance.com/index.htm>. Acesso em: 10 jun. 2009.

HUMAN DO BRAISL. **Estriol**. Itabira, 2008. 3 p. Disponível em: http://www.humandobrasil.com.br/site_arquivos/pdf/FISPQ/estriol.pdf. Acesso em: 4 ago. 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO. **Orientações sobre validações de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro, 2003. (DOQ-CGCRE-008).

JUNGERMANN, K.; MÖHLER, H. **Biochemie**. Berlin: Springer-Verlag, 1980.

JENKE, D.R. Development and validation of an ion-exclusion chromatographic method for the quantitation of organic acids in complex pharmaceutical products.**Instrumentation Science and Technology**, Lady Lake, Fl, v. 36, n. 4, p. 179-186, 1998.

JOBLING, S.; COEY, S.; WHITMORE, J. G.; KIME, D. E.; VAN LOOK, K. J. W.; McALLISTER, B. G.; BERESFORD, N.; HENSHAW, A. C.; BRIGHTY, G.; TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. **Biology of Reproduction**, New York, v. 67, p. 515-524, 2002.

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. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 256, p. 163-173, 2000.

JORGENSEN, S. E.; HALLING-SORENSEN, B. Drugs in the environment. **Chemosphere**, Oxford, v. 40, p. 691-793, 2000.

KUMAR, K.A.; MOHAN, S.V.; SARMA, P.N. Sorptive removal of endocrine-disruptive compound (estriol, E3) from aqueous phase by batch and column studies: Kinetic and mechanistic evaluation, **Journal of Hazardous Materials**, Índia, v. 164, p. 820–828, 2009.

KÜMMERER, K. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and desinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources – a review. **Chemosphere**, Oxford, v. 45, p. 957-969, 2001.

LANÇAS, M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: Ed. RiMa, 2004a. 93 p. (Métodos Cromatográficos de Análise, 4).

LANÇAS, M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: Ed. RiMa, 2004b. 46 p. (Métodos Cromatográficos de Análise, 6).

LOPÉZ, DE A.; BARCELÒ, D. Use of solid-phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water. **Journal of Chromatography A**, Spain, v. 938, p. 145-153, 2001.

MACIEL, E. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica de multiresíduos para quantificação de resíduos de pesticidas em manga (*Mangifera Indica*)**. 2005. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MADSEN, S. S.; KORSGAARD, B. Time-course effects of repetitive oestradiol- 17β and thyroxine injections on the natural spring smolting of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Journal of Fish Biology**, London, v. 35, p. 119-128, 1989.

MADSEN, S. S.; KORSGAARD, B. Opposite effects of 17β-estradiol and combined growth hormone-cortisol treatment on hypo-osmoregulatory performance in sea trout presmolts, Salmo trutta. **General and Comparative Endocrinology**, San Diego, v. 83, p. 276–282, 1991.

MADSEN, S. S.; MATHIESEN, A. B.; KORSGAARD, B. Effects of 17β-estradiol and 4-nonylphenol on smoltification and vitellogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 17, p. 303–312, 1997.

MADSEN, S. S.; SKOVBOLLING, S.; NIELSEN, C.; KORSGAARD, B. 17-β estradiol and 4-nonylphenol delay smolt development and down-stream migration in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 68, p. 109-120, 2004.

McCORMICK, S. D. Hormonal control of gill Na+,K+-ATPase and chloride cell function. **Fish Physiology**, Amsterdam, v. 14, p. 285-315, 1995.

MONTEBELO, A.A. Tributários urbanos: fonte da matéria orgânica na água do rio Piracicaba. Piracicaba, 1998. Disponível em: http://www.cena.usp.br/piracena/html/noticias/noticia34.htm. Acesso em: jun. 2009.

MULROY, A. When the cure is the problem. **Water Environment & Technology**, Washington, v. 13, p. 32-37, 2001.

OWEN, T. Fundamentals of Modern UV-Visible Spectroscopy. **Agilent Technologies**, Santa Clara, p. 39-43, 1996.

PETERSON, E. W.; DAVIS, R. K.; ORNDORFF, H. A. 17 β-Estradiol as an indicator of animal waste contamination in Mantled Karst Aquifers. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 29, p. 826-834, 2000.

PICKERING, A. D.; SUMPTER, J. P. Comprehending endocrine disrupters in aquatic environments: additional projects arose from a three-year, multinational, multidisciplinary research program in the European Union. **Environmental Science & Technology,** Easton, v.1, p 331-336, 2003.

PURDOM, C. E.; HARDIMAN, P. A.; BYE, V. J.; ENO, N. C.; TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. **Chemistry and Ecology**, London, v. 8, p. 275-285, 1994.

RAIMUNDO, C. C. M. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. 2007. 126 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

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**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RICHARDSON, M. L.; BOWRON, J. M. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 37, p. 1-12, 1985.

SCHULMAN, L. J.; SARGENT, E. V.; NAUMANN, B. D.; FARIA, E. C.; DOLAN, D. G.; WARGO, J. P. A human health risk assessment of pharmaceuticals in the aquatic

environment. **Human and Ecological Risk Assessment**, London, v. 8, n. 4, p. 657-680, 2002.

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. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 987, p. 57-66, 2003.

SOLÉ, M.; RALDUA, D.; BARCELÒ, D.; PORTE, C. Long-term exposure effects in vitellogenin, sex hormones, and biotransformation enzymes in female carp in relation to a sewage treatment works. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 56, p. 373-380, 2003.

SUMPTER, J.P. Endocrine disrupters in the aquatic environment: an overview. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, Weinheim, v. 33, n. 1, p. 9-16, 2005.

SUMPTER, J. P. Xenoendocrine disrupters – environmental impacts. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 102-103, p. 337-342, 1998.

SUMPTER, J. P.; JOHNSON, A. C. Response to comment on “Lessons from Endocrine Disruption and Their Application to Other Issues Concerning Trace Organics in the Aquatic Environment”. **Environmental Science & Technology,** Easton, v. 40, p. 1086-1087, 2006.

TERNES, T. A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R.-D.; SERVOS, M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 225, p. 81-90, 1999.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 835-855, 2002.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; FAJGELJ, A.; WILLETS, P.; WOOD, R. Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 71, p. 337-348, 1999.

THORPE, K. L.; CUMMINGS, R. I.; HUTCHINSON, T. H.; SCHOLZE, M.; BRIGHTY, G.; SUMPTER, J. P.; TYLER, C. R. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. **Environmental Science & Technology,** Easton, v. 37, p. 1142-1149, 2003.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ. Espectroscopia de absorção. Belém: UFPA. Disponível em: http://www.ufpa.br/ccen/quimica/espectroscopia%20de%20absorcao.htm. Acesso em: 14 jul. 2009.

VAZ, F. L.; MILFONT, M. L. B.; SOUTO-MAIOR, A. N.; GOUVEIA, E. R. Determinação da concentração de paclobutrazol por cromatografia líquida de alta eficiência e espectroscopia. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 281-283, 2007.

VESSMAN, J.; STEFAN, R. I.; van STADEN, J. F.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D. T.; FAJGELJ, A.; MÜLLER, H. Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 73, p. 1381-1386, 2001.

VINE, E.; SHEARS, J.; AERLE, R. V.; TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Endocrine (sexual) disruption is not a prominent feature in the pike (*Esox Lucius*), a top predator, living in English waters. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 24, n. 6, p. 1436-1443, 2005.

WANG, S.; HUANG, W.; FANG, G.; HE, J.; ZHANG, Y. On-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of estrogens in environment. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 606, p. 194-201, 2008.

WEBB, S. F.; TERNES, T.; GIBERT, M.; OLEJNICZAK, K. Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 142, p. 157-167, 2003.

YAKABE, C.; HONDA, A. M.; MAGALHÃES, J. F. Determinação do 17β-estradiol nas formas farmacêuticas gel e adesivo transdérmico. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 359-364, 2005.

YING, G.-G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y. J. Occurrence and fate of hormones steroids in environment. **Environment International**, New York, v. 28, p. 545-551, 2002.

ZACHAREWSKI, T. *In vitro* bioassays for assessing estrogenic substances. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 31, p. 613-623, 1997.

ZROSTLÝKOVA, J.; HAJSLOVA, J.; GODULA M.; MASTOVSKA, K. Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.937, p.73-86, 2001.