

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA
CAMPUS DE ARARAQUARA**



GUILHERME JULIÃO ZOCOLO

**“Ocorrência de isoflavonas de soja no ambiente e
correlação com atividade estrogênica: estudo de caso da
região de Dourados (MS)”**

**ARARAQUARA-SP
2010**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA
CAMPUS DE ARARAQUARA**



GUILHERME JULIÃO ZOCOLO

**“Ocorrência de isoflavonas de soja no ambiente e
correlação com atividade estrogênica: estudo de caso da
região de Dourados (MS)”**

Tese apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho - UNESP, como
parte dos requisitos para a obtenção do
título de Doutor em Química.

**ORIENTADORA:
PROF^a. DR^a. MARY ROSA RODRIGUES DE MARCHI**

ARARAQUARA-SP
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Z84o Zocolo, Guilherme Julião
Ocorrência de isoflavonas de soja no ambiente e correlação com atividade estrogênica : estudo de caso da região de Dourados (MS) / Guilherme Julião Zocolo. – Araraquara : [s.n.], 2010
185 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Mary Rosa Rodrigues De Marchi

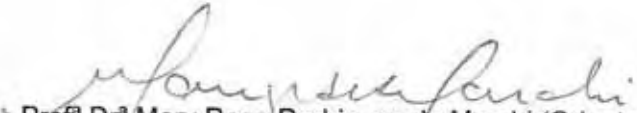
1. Química analítica. 2. Química ambiental. 3. Fitoestrógenos. I. Título.


GUILHERME JULIÃO ZOCCOLO

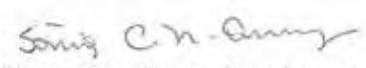
Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

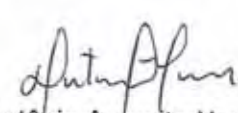
Araraquara, 16 de setembro de 2010.

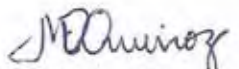
BANCA EXAMINADORA


Prof.ª Dr.ª Mary Rosa Rodrigues de Marchi (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Prof. Dr. Mario Sergio Galhiane
Faculdade de Ciências – UNESP, Bauru


Dr.ª Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz
Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental - EMBRAPA, Jaguariuna


Prof. Dr. Antônio Augusto Neves
Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas - UFV, Viçosa


Prof.ª Dr.ª Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz
Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas - UFV, Viçosa

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DADOS PESSOAIS

Nome: Guilherme Julião Zocolo

Filiação: Paulo Zanin Zocolo e Edelzia Julião Zocolo

e-mail: gjzocolo@yahoo.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2006 - 2010 Doutorado em Química.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.
Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.

2003 - 2006 Mestrado em Química.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.
Título: Determinação de Método para a Análise de substâncias sulfuradas em *Petiveria alliacea* L. Ano de obtenção: 2006. Orientador: Dr Alberto José Cavalheiro.
Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

1998 - 2003 Graduação em Química (Bacharelado e licenciatura).

Universidade Federal de Viçosa, UFV, Minas Gerais, Brasil. Título: Análise de óxidos de ferro hematita e goethita por reflectância difusa na região do infravermelho.
Orientador: Prof Dr. Antônio Augusto Neves.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2008 – 2008 Curso Teórico e Prático Em LC – ESI - MS/MS. (Carga horária: 120h)
Varian, VARIAN, São Paulo, Brasil.

2008 – 2008 Avaliação de Incerteza Em Química Analítica. (Carga horária: 24h)
Rede Metrológica do Estado de São Paulo, REMESP, São Paulo, Brasil.

2002 – 2002 Extensão universitária em Química Forense. (Carga horária: 12h)
Universidade Federal de Viçosa, UFV, Minas Gerais, Brasil.

2000 – 2000 Extensão universitária em RMN-Princípios e Aplicações. (Carga horária: 8h)
Universidade Federal de Viçosa, UFV, Minas Gerais, Brasil.

1999 – 1999 Extensão universitária em Biofármacos e Fármacos. (Carga horária: 6h)
Universidade Federal de Viçosa, UFV, Minas Gerais, Brasil.

1999 – 1999 Extensão universitária em Princípios de RMN. (Carga horária: 6h)
Universidade Federal de Viçosa, UFV, Minas Gerais, Brasil.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

2007 – 2007 Consultoria em Cromatografia Gasosa. (Carga horária: 40h) **Centro Federal de Educação Tecnológica da Paraíba, CEFET/PB**, Paraíba, Brasil.

2006-2007 Professor de Ciências Ciclo II inicial, ensino por 6 meses.

2003 – 2004 Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP.
Vínculo institucional Vínculo: Outro, Enquadramento funcional: Representante dos alunos de Pós Graduação. **Atividades** 10/2003-10/2004 Conselhos, Comissões e

Consultoria. **Cargos ou funções** 1. Representante.

2003 – 2003 Colégio Anglo de Viçosa - CAV Vínculo institucional. Vínculo: Professor, Enquadramento funcional: Professor de química, Carga horária: 40.

2000 - 2001 Centro Acadêmico de Química – CA. Vínculo institucional: Coordenador Acadêmico, Carga horária: 10.

2000 – 2000 Análises Químicas Ambientais Rps Ltda – AQUA. Vínculo institucional: Estagiário, Carga horária: 60.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

1. ANDRADE, S. J.; CRISTALE, J.; SILVA, F. S.; ZOCOLO, G. J.; MARCHI, M. R. R. de. Contribution of sugar-cane harvesting season to atmospheric contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Araraquara city, Southeast Brazil. **Atmospheric Environment**, v.44, p.2913-2919, 2010.

2. ZOCOLO, G. J.; SOUSA, A. C.; LOPES, M. N. T.; MARCHI, M. R. R. de. Determination of estrogens (estriol, β -estradiol, estrone and 17 β -ethynylestradiol) in river water from a rural area in Midwest Brazil. **Toxicology Letters**, v.196, p.S63-S63, 2010.

3. VILLANI, E. M. de A.; BARROS, N. F. de; NOVAIS, R. F.; MENDONÇA, E. de S.; ZOCOLO, G. J. Determinação de fósforo microbiano: comparação entre métodos e coberturas florestais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** (Impresso), v. 33, p.1061-1069, 2009.

4. RODRIGUES, Juliana; MICHELIN, Danielle Carvalho; RINALDO, Daniel; ZOCOLO, Guilherme Julião; DOS SANTOS, Lourdes Campaner; VILEGAS, Wagner; SALGADO, Hérica Regina Nunes. Antimicrobial Activity of Species (Melastomataceae). **Journal of Medicinal Food**, v.11, p.120-126, 2008.

5. SILVEIRA, Rodrigo D.; FARONI, Lêda R. A.; PIMENTEL, Marco A. G.; PETERNELLI, Luiz A.; ZOCOLO, Guilherme Julião. Eficácia biológica e persistência de bifentrina pulverizada em grãos de milho com diferentes temperaturas. **Neotropical Entomology** (Impresso), v.35, p.264-268, 2006.

6. SILVEIRA, Rodrigo Diniz; FARONI, Lêda Rita D'antonino; PIMENTEL, Marco Aurélio Guerra; ZOCOLO, Guilherme Julião. Influência da temperatura do milho, durante a pulverização, sobre a eficácia biológica da mistura de bifentrin e pirimifós metílico. **Revista Brasileira de Armazenamento**, 2005.

Trabalhos completos em anais de eventos

1. ZOCOLO, Guilherme Julião, MARCHI, Mary Rosa Rodrigues de. ANÁLISE E SELEÇÃO DE BIOMARCADORES AMBIENTAIS (FITOESTRÓGENOS) EM PALHA DE SOJA USANDO LC-ESI-MS/MS In: XXXI CONGRESSO INTERAMERICANO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL, 2008, Santiago. **XXXI CONGRESSO INTERAMERICANO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL**. Santiago: 2008.

Resumos simples em anais de eventos

1. ZOCOLO, Guilherme Julião; MARCHI, Mary Rosa Rodrigues de DETERMINATION OF PHYTOESTROGENS (GENISTEIN AND DAIDZEIN) IN RIVER WATER FROM MIDWEST BRAZIL In: 1st Ibero-American Meeting on Toxicology and Environmental Health, 2009, Ribeirão Preto. **1st Ibero-American Meeting on Toxicology and Environmental Health**. Ribeirão Preto: 2009.
2. PASCHOAL, F. M. M.; ZOCOLO, Guilherme Julião; MARCHI, Mary Rosa Rodrigues de; STRADIOTTO, N. R. Identificação e Quantificação dos Ácidos Graxos Presentes no Óleo de Tucumã. In: 17-Encontro da SBQ-Regional Interior Paulista Waldemar Saffiotti, 2009, Araraquara. **17-Encontro da SBQ-Regional Interior Paulista Waldemar Saffiotti**, 2009.
3. ZOCOLO, Guilherme Julião; MARCHI, Mary Rosa Rodrigues de. Comparação de HPLC-UV e LC-MS/MS na análise de fitoestrógenos da soja In: 31º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia. **31º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2008.
4. SPEROTO, J. S.; ZOCOLO, Guilherme Julião; MARCHI, Mary Rosa Rodrigues de; EVANGELISTA, R. C. Development and validation of HPLC methodology for analysis of isoflavones in crude extracts of soy (*Glycine max* (L) Merr.) In: XII COLACRO (Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas), 2008, Florianópolis. **XII COLACRO (Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas)**. Florianópolis, 2008.
5. FRANCO, S.; ZOCOLO, Guilherme Julião; MARCHI, Mary Rosa Rodrigues de. OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA ANÁLISE DE DIURON E SEUS METABÓLITOS DE DEGRADAÇÃO POR HPLC-DAD. In: IV Encontro Nacional de Química Ambiental, Sergipe. **IV Encontro Nacional de Química Ambiental**. Sergipe, 2008.
6. ZOCOLO, Guilherme Julião; MARCHI, Mary Rosa Rodrigues de. Análise de Fitoestrógenos por HPLC-DAD: Limites de Detecção, Quantificação e Linearidade In: 14 Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa. **14 Encontro Nacional de Química Analítica**. João Pessoa, 2007.
7. ZOCOLO, Guilherme Julião; CAVALHEIRO, Alberto J.; BOLZANI, V. S.; MARCHI, Mary Rosa Rodrigues de; OLIVEIRA, J. E. Comparação da Análise Qualitativa de Substâncias Sulfuradas em *Petiveria alliacea* L In: II Congresso Iberoamericano Y IV Congresso Argentino de Química Analítica, 2007, Buenos Aires. **II Congresso Iberoamericano Y IV Congresso Argentino de Química Analítica**, 2007.
8. ZOCOLO, Guilherme Julião; BIZI, R. S.; GALVÃO, D.; SILVA, F. S., CRISTRALÉ, J.; MARCHI, Mary Rosa Rodrigues de. Desenvolvimento de Método em LC-ESI-MS/MS para a análise de Fitoestrógenos em Palha de Soja In: 2º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas-BrMASS, 2007, Campinas. **2º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas-BrMASS**. Campinas, 2007.

9. SILVA, F. S.; CRISTRALÉ, J.; ZOCOLO, Guilherme Julião; MARCHI, Mary Rosa Rodrigues de. Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs) por GC-MS/MS In: 2º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas-BrMASS, 2007, Campinas. **2º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas-BrMASS**, 2007.

10. NASSER, A. L. M.; ZOCOLO, Guilherme Julião; SANTOS, L. C.; MARCHI, Mary Rosa Rodrigues de; VILEGAS, Wagner. Identification of the Triterpenes and Sterol Presents in Qualea Species by GC-MS In: 6º International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2007, Ribeirão Preto. **6º International Congress of Pharmaceutical Sciences**. Ribeirão Preto, 2007.

11. NAVICKIENE, H. D.; CARVALHO, L. R.; LAGO, J. H.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, Alberto J.; ALÉCIO, A. C.; ZOCOLO, Guilherme Julião, NUNES, J. M. C. TRITERPENIC COMPOUND CORROBORATES TAXONOMIC POSITION OF CHONDROPHYCUS FURCATUS (CERAMIALES, RHODOPHYTA) FROM BRAZIL In: XIX th International Seaweed Symposium, 2006, Kobe. **XIX th International Seaweed Symposium**, 2006.

12. ZOCOLO, Guilherme Julião; BANDEIRA, Karin F.; WANCZINSKI, Ana Elisa; TININIS, Aristeu G.; MARCHI, Mary Rosa Rodrigues de; CAVALHEIRO, Alberto J. Desenvolvimento de Método em CG-PFPD para Análise de Substâncias Sulfuradas em Petiveria alliacea L In: 13º Encontro Nacional de Química Analítica e 1º Congresso Ibero -Americano de Química Analítica, 2005, Niterói. **13º Encontro Nacional de Química Analítica e 1º Congresso Ibero -Americano de Química Analítica**, 2005.

13. TININIS, Aristeu Gomes; PERES, Carla Cristina; ASSONUMA, Murilo; BANDEIRA, Karin; ZOCOLO, Guilherme Julião; CAVALHEIRO, Alberto J. Desenvolvimento, otimização e utilização de metodologia analítica cromatográfica para a análise de casearinas. In: **13º Encontro Nacional de Química Analítica e 1º Congresso Ibero -Americano de Química Analítica**, 2005, Niterói.

14. ZOCOLO, Guilherme Julião; MANTOVANI, Simone M.; PASCOLI, Inara C.; BANDEIRA, Karin F.; CAVALHEIRO, Alberto J. Novo ácido olefínico policíclico de frutos de Cryptocaria moscata. In: Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas. **28º Reunião anual da SBQ**, 2005.

15. BANDEIRA, Karin F.; TELASCREA, Marcelo; TININIS, Aristeu G.; ZOCOLO, Guilherme Julião; ASSONUMA, Murilo; CAVALHEIRO, Alberto J. Otimização de Condição Cromatográfica para Análise Simultânea de Alcalóides, Flavonóides e Estirilpironas. In: **13º Encontro Nacional de Química Analítica e 1º Congresso Ibero -Americano de Química Analítica**, 2005, Niterói, 2005.

16. ZOCOLO, Guilherme Julião; WANCZINSKI, Ana Elisa; MARCHI, Mary Rosa Rodrigues de; VILEGAS, Wagner; BRITO, Alba Regina Souza M. Avaliação de alguns parâmetros de validação para a determinação de SCFAS In: 10º Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Afins, 2004, Campos do Jordão. **10º Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Afins**, 2004.

17. ZOCOLO, Guilherme Julião; DARDENGO, Raquel Pellanda; RIBEIRO, Robson; BADJI, César Auguste; QUEIROZ, Maria Eliana Lopes de; NEVES, Antônio Augusto; GUEDES, Raul Narciso Carvalho. Degradação do piretróide deltametrina em amostra de solo tropical In: XII SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2002, Viçosa. **XII SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 2002.

18. ZOCOLO, Guilherme Julião; FARIA, Anisio Márcio de; QUEIROZ, Maria Eliana Lopes Ribeiro de; JORDÃO, Cláudio Pereira. Determinação de metais em água por espectrometria de absorção atômica de chama ,empregando extração por surfactante In: **XII SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 2002, VIÇOSA., 2002.

19. ZOCOLO, Guilherme Julião; PIMENTEL, Marco Aurélio Guerra; FARONI, Lêda Rita D'antonino; SILVEIRA, Rodrigo Diniz; CARDOSO, Flávio. Efeito da temperatura do grão de milho no momento da pulverização sobre a eficácia biológica de pirimifos-etilíco, bifenthrin e da mistura deles In: XII SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2002, Viçosa. **XII SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 2002.

20. ZOCOLO, Guilherme Julião; BADJI, César Auguste; QUEIROZ, Maria Eliana Lopes Ribeiro de; GUEDES, Raul Narciso Carvalho; NEVES, Antônio Augusto. Extração de deltametrina em amostra de solo In: XV Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química-MG, 2002, Viçosa. **XV Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química-MG**, 2002.

21. ZOCOLO, Guilherme Julião; PIMENTEL, Marco Aurélio; QUEIROZ, Maria Eliana Lopes Ribeiro de; NEVES, Antônio Augusto; FARONI, Lêda Rita. Extração de deltametrina em amostras de milho In: XII SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2002, Viçosa. **XII SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 2002.

22. ZOCOLO, Guilherme Julião; QUEIROZ, Maria Eliana Lopes Ribeiro de; DINIZ, Rodrigo; NEVES, Antônio Augusto; FARONI, Lêda Rita D'antonino. Otimização da extração do piretróide bifenthrin em amostras de milho In: XI SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2002, Viçosa. **XI SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 2002.

23. ZOCOLO, Guilherme Julião; PIMENTEL, Marco Aurélio; FARONI, Lêda Rita D'antonino; QUEIROS, Maria Eliana Lopes Ribeiro de. Persistência do inseticida deltametrina aplicado em grãos de milho sob diferentes temperaturas do ar ambiente In: XII SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2002, Viçosa. **XII SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 2002

ORIENTAÇÕES

FRANCO, Stephane. Otimização e validação de método para determinação de Diuron e seus metabólitos DCA e DCPMU em urina. Início:2007. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. (Co-orientador).

MANTOVANI, Simone M. Perfil fitoquímico de frutos e de plântulas de *Cryptocarya moschata* germinadas em condições de luz e substrato controladas. Início:2004, fim 2004. Monografia (Química) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. (Co-orientador).

ESTÁGIO NO EXTERIOR

Realizado no Instituto de Química de Alimentos da Universidade de Münster – Alemanha sob orientação do Prof. Dr. Hans-Ulrich Humpf (trabalhando com ESI-MS/MS - orbitrap alta resolução e também com sistemas ESI-MS/MS de baixa resolução). Além dos métodos espectrométricos trabalhei também com o teste biológico *Pig cecum* model que descreve a metabolização intestinal de flavonóides e outros metabólitos secundários. (Período: de setembro a dezembro de 2009).

Dedico esse trabalho a minha mãe, Edelzia Julião Zocolo (*in memoriam*), que enxergou esse momento antes de todos. Obrigado por acreditar em mim, por me mostrar os caminhos da vida pela educação e por estar ao meu lado durante todas as adversidades, mesmo estando tão distante.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida.

À Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi por ter me dado tantas oportunidades e por ter acreditado e investido nos meus sonhos, por todo o conhecimento que adquiri nesse período tão importante, por ter dado a mim a chance de ser um ser humano melhor. Meu profundo agradecimento pela orientação, amizade, confiança, respeito e todo o aprendizado e crescimento que me foi proporcionado durante o doutorado. Mesmo que a palavra obrigado signifique tanto, não expressará por inteiro o valor da sua contribuição para minha formação.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes da USP de Ribeirão Preto, que mesmo sem me conhecer, sem saber quem eu era me abriu as portas para uma das grandes experiências de minha vida, que foi realizar um estágio na Alemanha. Minha gratidão eterna. Registro aqui minha sincera admiração e apreço por essa grande pessoa e profissional muito especial.

Ao Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro que também acreditou em mim, me aceitando como aluno de mestrado sem também ter nenhuma referência ao meu respeito e por estar sempre pronto a me ajudar com seus conhecimentos, meu muito obrigado.

À Profa. Dra. Eliana Varanda da Faculdade de Ciência Farmacêuticas da UNESP, Campus Araraquara, e sua equipe, em especial, Flávia Resende pela atenção, competência e disponibilidade do laboratório para realização dos testes de estrogenicidade (RYA).

À Profa. Dra. Mara Nilza Teodoro Lopes da UFGD, por toda dedicação, atenção e apoio durante a realização das coletas em Dourados (MS).

Ao Prof. Dr. Jonas da Silva Mota da UEMS, grande amigo, que sempre me ajudou, e agora mais uma vez no doutorado. Obrigado pela sua grande colaboração me recebendo em Dourados e cedendo seu laboratório.

À Profa. Dra. Cláudia Andrea Lima Cardoso da UEMS pela disponibilização do laboratório para realização do processamento das amostras, muitíssimo obrigado por tudo.

Ao Prof. Msc. Abramo Loro Neto da UFGD que teve uma participação fundamental na etapa de coleta de amostras disponibilizando o barco e conhecimento da região que foram estratégicos para a determinação correta das áreas de coleta, meu muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Hans-Ulrich Humpf por ter me acolhido tão bem no período em que morei na Alemanha, por ter disponibilizado toda a infra-estrutura possível para que eu realizasse meu trabalho, meu muito obrigado.

À Profa. Dra. Marisa Spirandeli Crespi e suas valiosas contribuições dadas na qualificação e durante a realização do trabalho.

À Profa. Dra. Maria Lúcia Ribeiro (Bilu) também por toda a valiosa colaboração dada na qualificação, meu muito obrigado.

À Prof. Dra. Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiros e ao Prof. Dr. Antônio Augusto das Neves do Laboratório de Química Analítica da UFV, por todos os ensinamentos e pela oportunidade de começar a aprender como fazer Ciência. Obrigado.

À FAPESP, pela bolsa concedida e todo apoio necessário para o desenvolvimento deste trabalho, inclusive o custeio de meu estágio na Alemanha no Instituto de Química de Alimentos de Münster.

Ao DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst–Serviço Alemão de Intercâmbio Acadêmico) também pela bolsa e pela oportunidade de estudar e aprender mais sobre ciência e sobre a tão rica cultura alemã.

À FAPESP pelo apoio financeiro na execução deste projeto.

Ao Programa de Pós-graduação em Química, bem como, a todos do Instituto de Química da UNESP–Araraquara (professores, equipe administrativa, bibliotecárias) pelo apoio e organização – parabéns pela excelência e qualidade.

Ao Grupo do Professor Dr. Joan O. Grimalt, Dra. Silvia Lacort e Dr. Benjamin Piña do Consejo Superior de Investigaciones Científicas – CSIC em Barcelona.

A Varian instrumentos analíticos que me forneceu gratuitamente um excelente treinamento na área de LC-MS/MS por um período de três semanas, meu muito obrigado.

A todos os amigos do GRESCO e, meu muito obrigado em especial a grande amiga Stephane Franco por toda a colaboração e profissionalismo característicos, você sempre esteve presente e sempre pude contar com você.

Aos meus queridos amigos José Antonio de Moura, Dayana Moscati, Flávio Soares Silva e Joyce Cristale, ao João Batista Gomes de Souza e Laudicéia Giacometti Lopes. Ao Luciano e Mariele Baratto, Eduardo e Cristiane Martins, Thiago Gianeti, Marcos e Bráulio amigos de todas as horas. Também aos amigos, Eduardo Canaver, Jéssica.

Ao Grupo do Professor Dr. Hans-Ulrich Humpf Instituto de Química de Alimentos de Münster pelo acolhimento e apoio durante meu estágio, onde parte desse trabalho foi desenvolvido. Agradeço em especial a Florian Hubner, Gordon van' t Slot, Anna Engemann, Benedikt Cramer, Nina Blaas, Henning Harrer, Tanja Welsch, acima de tudo pela amizade de todos.

A banca examinadora deste trabalho pela disponibilização e contribuições.

A minha namorada Vanessa, pela compreensão e apoio. Você é fundamental para minha vida. Sei que não foi fácil suportar toda minha rabugice própria de final de tese, te amo.

A todos da minha família (Meu pai Paulo Zanin Zocolo, meu irmão David Julião Zocolo, minha querida prima Marília Altoó e Mauro Altoó, tias Nenzinha, Amália, Helena) pelo apoio, carinho e compreensão.

Ao meu sogro e sogra Antônio Carlos Antonini e Maria Aparecida Lara Antonini, e cunhados Verônica, Mariane, Daniel pelo apoio, incentivo e confiança que sempre me foi depositada.

A Sra. Marilei por ter desempenhado o seu trabalho de técnica do nosso laboratório com tanto carinho, responsabilidade e grande competência.

Ao Vinícius da UFGD por todo apoio e ajuda na realização de coletas e extração, mesmo quando estive ausente do país.

Aos grandes amigos que conquistei nesse período: José Antônio, Magno, Adriana Pimentel, Janaina Conrado, Juliana Severi, Dayana, Diógenes, Sônia Almeida, Evaneide, Adreia, Felipe, e todos os demais que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho. Aos amigos da família Boseja (Carlinhos, Tucho, Marcelo, Liliane, Dona Nilde que me acolheram e ajudaram na minha adaptação quando cheguei a Araraquara).

Ao apoio da empresa de Tratamento de Água e Esgoto de Araraquara - DAAE, que muito gentilmente nos apoiaram fornecendo amostras para este estudo de validação analítica, sem essa valiosa contribuição esse estudo seria inviabilizado.

Aos trabalhadores brasileiros e do grande Estado de São Paulo que através do seu suor contribuem para que haja recursos, que diretamente financiaram esse e que financiam outros importantes trabalhos. Meu muito obrigado, meu sincero respeito a todos vocês. Espero que meu trabalho esteja à altura do que vocês representam.

A gratidão é uma forma singular de reconhecimento e o reconhecimento é uma forma sincera de gratidão. Muito obrigado a todos.

“Não é a terra que constitui a riqueza das nações, e ninguém se convence de que a educação não tem preço”.

Rui Barbosa

RESUMO

Esta tese apresenta o desenvolvimento e a validação de um procedimento analítico, que permite a quantificação simultânea de sete fitoestrógenos (alteradores endócrinos - AEs) em água de rio e água sub-superficial em uma área rural com grande produção de soja. Os compostos selecionados para este estudo foram (genistina - GENIS, daidzina - DAID, equol - EQ, daidzeína - DAI, a genisteína - GEN, formononetina - FOR e biochanina - A - BIO). Este método consiste na pré-concentração de amostras de água (1 L) em cartuchos Strata X de 200 mg, seguido por análise de todos os AEs por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultra - violeta (CLAE-UV). Do ponto de vista analítico, estabeleceu-se um método simples e de confiabilidade conhecida (exatidão, precisão, seletividade e robustez) para análise de sete fitoestrógenos de soja em água de rio e subsuperficial. Os limites de detecção e quantificação do método validado foram de $3,5 \text{ ng L}^{-1}$ e 10 ng L^{-1} respectivamente para todas as moléculas estudadas e em ambas as matrizes. O método foi aplicado a amostras de água da região de Dourados (MS). Foram coletadas 92 amostras de água de rio e 16 de água sub-superficial, em quatro campanhas de amostragem ao longo de 1 ano. GENIS e DAID não foram detectadas em nenhuma das amostras. GEN e FOR foram os fitoestrógenos mais detectados, estando presentes em 50 e 34% das amostras, respectivamente. As concentrações individuais de fitoestrógenos situaram-se entre 12 e 1957 ng L^{-1} , sendo que as maiores concentrações foram obtidas para o EQ e GEN para amostras coletadas em meses chuvosos na região de estudo. Amostras de água do rio Dourados e de água sub-superficial foram testadas para o efeito de alteração endócrina com o ensaio de levedura recombinante (RYA). O ponto de coleta de água sub-superficial (afloramento do lençol freático) apresentou altos valores de estrogenicidade de 0,35 e $0,50 \text{ ng L}^{-1}$ de equivalente de estradiol nos meses de abril e agosto de 2009, respectivamente. Métodos quimiométricos de análise demonstraram uma boa correlação entre as concentrações de equol com a atividade estrogênica na primeira coleta (abril de 2009). De maneira geral a atividade estrogênica pode ser explicada pela contaminação por EQ na primeira coleta (período de safra de soja) e de 17β - estradiol na segunda coleta (período de entre-safra da soja, onde prevalece à pecuária), tendo como fonte de contaminação a excreta do gado neste período do ano. Propõe - se que esses contaminantes podem ser os principais fatores responsáveis pelo efeito estrogênico observado pelo teste RYA. No entanto, não se pode descartar o impacto das altas concentrações medidas nos demais pontos de coleta, pois a literatura relata para essas concentrações efeitos como *intersex* em peixes. Em suma, os resultados obtidos indicam que a plantação de soja é fonte de isoflavonas para água de rio e sub-superficial, que a estrogenicidade (medida pelo teste RYA) é significativa e que na época da safra correlaciona-se com as isoflavonas de soja, enquanto que na entre-safra é melhor explicada pelos hormônios estrogênicos presentes na excreta de animais.

ABSTRACT

This thesis presents the development and validation of an analytical procedure that allows the simultaneous measurement of seven phytoestrogens (endocrine disruptors - EDs) in river water and water sub-surface in a rural area with large soybean production. The compounds selected for this study were (genistin - GENIS, daidzin - DAID, equol - EQ, daidzein - DAI, genistein - GEN, formononetin - FOR and biochanin - A - BIO). This method consists of preconcentration of water samples (1 L) on Strata X cartridges of 200 mg, followed by analysis of all EDs by high performance liquid chromatography with detection by ultra - violet (HPLC-UV). From the analytical point of view, it was established a simple and known for reliability (accuracy, precision, selectivity and robustness) for consideration of seven phytoestrogens in soy and river water sub-surface. The limits of detection and quantification of the validated method were 3.5 ng L^{-1} and 10 ng L^{-1} respectively for all the molecules studied on both matrices. The method was applied to water samples from the region of Dourados (MS). We collected 92 samples of river water and 16 sub-surface water in four sampling campaigns over 1 year. GENIS and DAID were not detected in any sample. The phytoestrogens FOR and GEN were detected in most cases, present in 50 and 34% of samples respectively. Individual concentrations of phytoestrogens were between 12 and 1957 ng L^{-1} , and the highest concentrations were obtained EQ and GEN for samples collected in the rainy months in the study area. Samples of river water Dourados and sub-surface water were tested for the presence of endocrine changes with recombinant yeast assay (RYA). The point of collecting subsurface water (groundwater upwelling) showed high estrogenicity values of 0.35 and 0.50 ng L^{-1} equivalent of estradiol in the months of April and August 2009 respectively. Chemometric methods of analysis showed a good correlation observed between the concentrations of equol with estrogenic activity in the first sampling (April 2009). In general, the estrogenic activity can be explained by contamination with EQ in the first collection (from soybean crop) and 17β - estradiol in the second collection (period between harvests of soybean, where prevailing livestock), and as a source of contamination from the excreta of cattle at this time of year, suggesting that these contaminants may be the main factors responsible for estrogenic effects observed by the RYA test. However, we can not dismiss the impact of high concentrations measured in the other collection sites, since the literature reports for these purposes as intersex concentrations in fish. In summary, the results indicate that the planting of soybean is a source of isoflavones for river water and sub-surface, that the estrogenicity (measured by test RYA) is significant and that during harvest time correlates with soy isoflavones while in no harvests season is better explained by estrogenic hormones present in the excreta of animals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Alterações endócrinas: (a) resposta natural, (b) Efeito agonista e (c) Efeito antagonista. Adaptado de SUMPTER, 1998.	32
Figura 2: Estruturas de alguns alteradores endócrinos	35
Figura 3: Estruturas de alguns fitoestrógenos.	38
Figura 4: Estruturas químicas do 17 β -estradiol (E2) e das três principais isoflavonas encontradas na soja.	39
Figura 5: Evolução da produção de soja nos principais estados produtores, no Brasil (EMBRAPA SOJA, 2003).	54
Figura 6: Abrangência da cultura de soja no Brasil (EMBRAPA SOJA, 2003).	55
Figura 7: Curvas de decomposição no solo dos principais constituintes orgânicos vegetais. Adaptado de MINDERMAN <i>et al.</i> (1960).	57
Figura 8: a) Principais Bacias Hidrograficas Brasileiras; b) Detalhamento da Bacia do Rio Tietê.	58
Figura 9: Microbacia do Rio Dourados.	59
Figura 10: Distribuição espacial da precipitação média anual na Bacia do Rio Dourados, considerando o período de 1973 a 2002	60
Figura 11: Precipitação média mensal na área de drenagem da Bacia do Rio Dourados, considerando o período de 1973 a 2002 (PEREIRA <i>et al.</i> , 2007).	61
Figura 12: Vazão média mensal na área de drenagem da Bacia do Rio Dourados, considerando o período de 1973 a 2002. (PEREIRA <i>et al.</i> , 2007).	62
Figura 13: Sistema de plantio direto (a) e palha de soja em processo de decomposição (b).	65
Figura 14: Isoflavonas estudadas. Genisteína e daidzeína (agliconas) e os outros dois glicosídeos, genistina e daidzina.	68
Figura 15: Sistema de extração da palha da soja. Solvente. A: Hexano, US: Ultrassom, solvente. B: ACN:/H₂O (1:1). Método baseado na proposta de NEHME, 2001.	71
Figura 16: Visão geral e ampliada de todos os sítios de amostragem. O ponto A é correspondente à fazenda da UFGD, ponto de afloramento do lençol freático, e o ponto B aos pontos de coleta no Rio Dourados.	76
Figura 17: Local da realização das coletas de amostras de água, nos pontos do Rio Dourados (ponto B).	77
Figura 18: Local da realização da coleta de amostras de água de afloramento do lençol freático na fazenda da UFGD (ponto A).	77
Figura 19: Fotos dos sítios de coleta de amostras.	78
Figura 20: Procedimento utilizado na extração das amostras de água de rio.	79
Figura 21: Suporte desenvolvido para a utilização completa do <i>Manifold</i> .	79

- Figura 22:** Espectros de Massas em *full-Scan* para os padrões de: (A) genistina, (B) genisteína, (C) daidzeína, (D) daidzina. 83
- Figura 23:** (A) cromatograma de íons totais (TIC) e cromatogramas dos íons extraídos do TIC, adquiridos com a técnica de MRM. Os valores indicados nos picos cromatográficos ilustram os tempos de retenção dos padrões (B-E). 84
- Figura 24:** (A) Cromatograma (TIC) do extrato aquoso da palha da soja; cromatogramas dos íons extraídos (MRM) para a: (B) daidzeína: 252>208; (C) genisteína: 269>133; e (D) genistina 431>269. 85
- Figura 25:** Cromatograma injeção direta: (A) TIC do extrato aquoso da palha da soja; (B) Espectro de massas obtido por injeção direta do extrato aquoso da palha da soja e adquirido em modo negativo e em *full-scan*. 86
- Figura 26:** Cromatograma LC/MS dos íons monitorados das substâncias desconhecidas presentes no extrato aquoso da palha da soja: (A) TIC do extrato aquoso da palha da soja; *Scan-ES* dos íons monitorados: (B) 431, (C) 227, (D) 241. (E) 253, (F) 255, (G) 269. 87
- Figura 27:** Cromatograma apresentando os canais dos íons extraídos (MRM) para as substâncias desconhecidas presentes no extrato aquoso da palha da soja. 88
- Figura 28:** (A) Espectros de Massas *Full-Scan* dos íons detectados no extrato aquoso da palha da soja: (B) m/z 286; (C) m/z 284; (D) m/z 282; (E) m/z 255; (F) m/z 242 Da. 88
- Figura 29 A:** Estrutura das isoflavonas utilizadas como padrões para análise do extrato aquoso da palha da soja por LC-MS/MS. 90
- Figura 29 B:** Proposta de estrutura das substâncias detectadas no extrato aquoso da palha da soja por LC-MS/MS. 90
- Figura 30:** Fragmentos propostos para a genistina MM 432 Da. Propostas de fragmentações baseadas em Wu *et al.*, (2004). 93
- Figura 31:** Fragmentos propostos para a daidzeína MM 254 Da. Propostas de fragmentações baseadas em Wu *et al.*, (2004). 94
- Figura 32:** Otimização da sensibilidade pelo ajuste da pressão do gás de nebulização da genisteína m/z –268,6 Da. 96
- Figura 33:** Otimização da sensibilidade pelo ajuste da pressão do gás de nebulização da genistina m/z – 431,2 Da 96
- Figura 34:** Otimização da sensibilidade pelo ajuste da pressão do gás de nebulização da daidzina m/z –415 Da 96
- Figura 35:** Otimização da sensibilidade pelo ajuste da pressão do gás de nebulização da daidzeína m/z – 252,4 Da 96
- Figura 36:** Teste de supressão iônica realizado com a injeção do extrato de palha de soja diluído em ACN/H₂O (50:50). 97
- Figura 37:** Teste de supressão iônica realizado com a injeção do extrato de palha de soja enriquecida com padrões de isoflavonas a concentração de 1,0 µg mL⁻¹ em ACN/H₂O (50:50). 97

Figura 38: Daidzina m/z - 415 – energia de colisão 25,0 V.	98
Figura 39: Genistina m/z – 431,2 – energia de colisão 25 V.	98
Figura 40: Daidzeína m/z – 252,4 – energia de colisão 26,0 V.	98
Figura 41: Genisteína m/z – 268,6 – energia de colisão 27,0 V.	98
Figura 42: Cromatograma (LC-MS/MS) em sete concentrações diferentes dos fitoestrógenos estudados: genistina ($t_r= 4,650$ min), daidzina ($t_r= 5,784$ min), daidzeína ($t_r= 7,388$ min) e genisteína ($t_r= 8,815$ min).	99
Figura 43: Intervalo de linearidade da daidzina.	100
Figura 44: Curva analítica da daidzina.	100
Figura 45: Intervalo de linearidade da genistina.	101
Figura 46: Curva analítica da genistina.	101
Figura 47: Intervalo de linearidade da daidzeína.	101
Figura 48: Curva analítica da daidzeína.	102
Figura 49: Intervalo de linearidade da genisteína.	102
Figura 50: Curva de linearidade da genisteína.	102
Figura 51: Cromatogramas HPLC-UV/DAD para genisteína ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) e daidzeína ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) ambas a. Sistema de solvente ACN/H ₂ O (10 a 65% ACN em 10 min).	104
Figura 52: Intervalo de linearidade da daidzeína	105
Figura 53: Curva analítica da daidzeína	105
Figura 54: Intervalo de linearidade da genisteína.	106
Figura 55: Curva analítica da genisteína.	106
Figura 56: Cromatograma (HPLC-UV) de padrões de daidzeína e genisteína injetados em concentrações iguais a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.	108
Figura 57: Gráfico de linearidade para genisteína no sistema LC920 Varian	109
Figura 58: Curva analítica para genisteína no sistema LC 920 Varian	109
Figura 59: Gráfico de linearidade para daidzeína no sistema LC 920 Varian	109
Figura 60: Curva analítica para daidzeína no sistema LC 920 Varian	110
Figura 61: Cromatogramas dos padrões ($0,01$ a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$). Fitoestrógenos daidzina ($t_r= 5$ min), genistina ($t_r= 6,8$ min), daidzeína ($t_r= 10,64$ min), equol ($t_r= 11,38$ min), genisteína ($t_r= 12,38$ min), formononetina ($t_r= 14,07$ min) e biochanina A ($t_r= 15,36$ min).	113
Figura 62: Intervalos de linearidade e curva de linearidade para as demais isoflavonas.	114
Figura 63: Estrutura química do sorvente Strata X	116
Figura 64: Cromatogramas que ilustram os melhores resultados de recuperação dos analitos. Testes realizados no sistema HPLC-UV-DAD.	118

Figura 65: Comparação dos cromatogramas do branco, testemunha, padrão ($1\mu\text{g mL}^{-1}$) e amostra enriquecida (350 ng L^{-1}) . Análises efetuadas no sistema LC920, Varian.	119
Figura 66: Comparação dos cromatogramas do padrão ($0,1\ \mu\text{g mL}^{-1}$) e amostra enriquecida (35 ng L^{-1}) com respectiva ampliação da região de interesse. Análises efetuadas no sistema LC920, Varian.	120
Figura 67: Comparação dos cromatogramas do padrão ($0,05\ \mu\text{g mL}^{-1}$) e amostra enriquecida ($17,5\text{ ng L}^{-1}$) com respectiva ampliação da região de interesse. Análises efetuadas no sistema LC920, Varian.	121
Figura 68: Comparação dos cromatogramas do padrão ($10\ \mu\text{g mL}^{-1}$), branco, testemunha e amostras enriquecidas com os fitoestrogenos daidzina ($t_r= 5\text{ min}$), genistina ($t_r= 6,8\text{ min}$), daidzeína ($t_r= 10,64\text{ min}$), equol ($t_r= 11,38\text{ min}$), genisteína ($t_r= 12,38\text{ min}$), formononetina ($t_r= 14,07\text{ min}$) e biochanina A ($t_r= 15,36\text{ min}$).	123
Figura 69: Nível de conservação para a daidzeína.	125
Figura 70: Nível de conservação para a genisteína.	126
Figura 71: Pontos de coleta de amostra nos anos de 2009 e 2010.	127
Figura 72: Sugestão para a distribuição ambiental das isoflavonas: os compartimentos na cor vermelha indicam o foco deste estudo. As linhas vermelhas pontilhadas: indicam onde a contaminação por isoflavonas provavelmente não ocorre. As linhas em verde e azul: não foram investigados principalmente porque se trata de um estudo em área rural (adaptado de HARTMANN et al, 2008).	128
Figura 73: Visão geral da contaminação por isoflavonas levando-se em consideração as concentrações das isoflavonas e os fatores sazonais envolvidos.	130
Figura 74: Taxas diárias de precipitação, evapotranspiração e temperaturas (T_{mx} =temperatura máxima, T_{mn} = temperatura mínima e T_{md} = temperatura média) para o mês de abril de 2009	131
Figura 75: Taxas diárias de precipitação, evapotranspiração e temperaturas (T_{mx} =temperatura máxima, T_{mn} = temperatura mínima e T_{md} = temperatura média) para o mês de agosto de 2009.	135
Figura 76: Taxas diárias de precipitação, evapotranspiração e temperaturas (T_{mx} =temperatura máxima, T_{mn} = temperatura mínima e T_{md} = temperatura média) para o mês de dezembro de 2009 (MATO GROSSO DO SUL, 2009).	137
Figura 77: Taxas diárias de precipitação, evapotranspiração e temperaturas (T_{mx} =temperatura máxima, T_{mn} = temperatura mínima e T_{md} = temperatura média) para o mês de abril de 2009	140
Figura 78: Dendograma da análise de cluster entre as amostras, ocorrendo o agrupamento das amostras coletadas em diferentes períodos.	143
Figura 79: Dendograma da análise de cluster entre as variáveis, ocorrendo o agrupamento das isoflavonas coletadas em diferentes períodos.	144

- Figura 80:** Análise de componentes principais (PCA) entre as variáveis, análise da influência ambiental na disponibilização desses metabólitos no ambiente 145
- Figura 81:** Rotação varimax normalizada entre as variáveis, análise da influência ambiental na disponibilização desses metabólitos no ambiente. 147
- Figura 82:** Teste de estrogénicidade (RYA) para os quatro períodos de coleta. 148
- Figura 83:** Análise de componentes principais. As três PCs acumulam 73,43 % da variância explicada. 149
- Figura 84:** Rotação varimax normalizada extraída da análise de componentes principais (PCA) entre as variáveis, análise da influência ambiental na disponibilização desses metabólitos no ambiente. 151
- Figura 85:** Teste de estrogénicidade (RYA) para os quatro períodos de coleta. No eixo x log da concentração em ng L^{-1} . 152

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividades estrogênica/androgênica de fitoestrógenos em diferentes bioensaios (LIU, <i>et al.</i> , 2009).	43
Tabela 2: Propriedades físico-químicas das principais isoflavonas (HOERGER <i>et al.</i> , 2009)	48
Tabela 3: Fontes de contaminação por fitoestrógenos e respectivas concentrações	52
Tabela 4: Gradiente utilizado nas análises do extrato aquoso da palha da soja e dos padrões de isoflavonas	66
Tabela 5: Condições cromatográficas otimizadas	69
Tabela 6: Condições cromatográficas para os sistemas HPLC utilizados	72
Tabela 7: Condições de condicionamento e extração com a amostra acidificada	74
Tabela 8: Identificação dos pontos de coleta de amostras de água e sua correspondência nas Figuras 16 a 18	75
Tabela 9: LC-ESI-MS/MS: Transições monitoradas e condições utilizadas dos íons presentes nos padrões de isoflavonas e no extrato aquoso da palha da soja.	90
Tabela 10: ESI/MS/MS dos íons produtos da genistina e daidzeína	94
Tabela 11: Parâmetros de otimização de resposta no LC-MS/MS	95
Tabela 12: Limites de detecção, quantificação e coeficientes de correlação linear obtido a partir dos parâmetros das curvas analíticas para o sistema LC/MS-MS.	103
Tabela 13: Concentração de fitoestrógenos na palha de soja (n = 3).	103
Tabela 14: Limites de detecção, quantificação e coeficientes de correlação linear obtidos a partir dos parâmetros das curvas analíticas. Para o sistema HPLC-UV-DAD.	106
Tabela 15: Resposta dos sistemas analíticos (HPLC-UV e HPLC-UV-DAD).	111
Tabela 16: Resposta do sistema analítico (HPLC-UV).	115
Tabela 17: Valores de recuperação, precisão e exatidão (n= 3) obtidos para os dois sorventes, em ensaios com amostra de água superficial enriquecida.	117
Tabela 18: Recuperação média obtida a partir da análise de água de rio fortificada com os analitos (n=3).	122
Tabela 19: Comparação entre métodos descritos na literatura com método proposto para determinação de genisteína e daidzeína em água superficial.	125
Tabela 20: Rotação varimax normalizada.	146
Tabela 21: Rotação varimax normalizada.	150

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAE – afastado da margem
AAQ – próximo à margem
ACN – acetonitrila
AEs – Alteradores endócrinos
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APE – Alquilfenóis etoxilados
AR – receptor androgênio
ARCEM – “Austrian Research Cooperation on Endocrine Modulators
BFP – bisfenol A
BIO – biochanina – A
C18 – Octadecil silano
CG/MS – Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas
CID – dissociação por colisão induzida
COM – Community Strategy for Endocrine Disrupters
COMPREHEND – Community Programme of Research on Endocrine
CSTEE – Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment
CV – coeficiente de variação
Da – Dalton
DAD – Detector por Arranjo de Diodos
DAE – afastado da margem
DAI – daidzeína
DAID – daidzina
DAQ – próximo à margem
DDT – Dichloro Diphenyltrichloroethane - dicloro-difenil-tricloroetano
DES – dietilestilbestrol
E1 – Estrona
E2 – Estradiol
EC₅₀ – Concentração de substância que causa efeito negativo mensurável em 50% da população teste
EDs ou EDCs – Endocrine Disruptors - Alteradores Endócrinos
EDSP – Environmental Disruptor Screening Program
EDSTAC – Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee
EDTA – Endocrine Disrupter Testing and Assessment Task Force
EE2 – Etililestradiol
EEQ – Equivalente grama de estradiol
EEQ – equivalentes de estradiol
EPA – environmental protection agency
EQ – equol
ESI – *electrospray*
ETA – Estação de tratamento de água – WTP – water treatment plant
ETE – Estação de tratamento de esgoto - WWTP – wastewater treatment plant
FOR – formononetina.
GEN – genisteína
GENIS – genistina
Glc – glicose
GRESKO – Grupo de Estudo em Saúde e Contaminantes Orgânicos
hAR – receptor humano de androgênio
HCA – análise hierárquica por cluser

hER – receptor humano de estrogênio
HPLC/FLU – Cromatografo líquido com detector de fluorescência
HPLC – High Performance Liquid Chromatography
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
Kow – constante de partição octanol/água
LC-MS/MS – Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LD – limite de detecção
Leu – leucina
LQ – limite de quantificação
 m/z – relação carga massa
MeOH – metanol
MM – massa molecular
MP – material particulado
MRM – *Multiple Reaction Monitoring*
MuGal – 4-metilumbeliferona b-D-galactopiranosídeo
n.d – não detectado
N.L – não ligante
NITE – National Institute of Technology and Evaluation, Japan
nm – nanômetros
NP – nonilfenol
NPE – Nonilfenol etoxilado
PAE – afastado da margem
PAQ – próximo à margem
PCA – análise de componentes principais
PCBs – bifenilaspolicloradas
pKa – constante de dissociação ácida
POP – Poluentes Orgânicos Persistentes
rAR – receptor de androgênio do rato
RBA – afinidade relativa de ligação
RE – Receptores estrogênicos
RGA – ensaio de gene
RYA – Recombinant yeast assay - ensaio de levedura recombinante
SD – desvio padrão
SIM – Monitoramento de íon seletivo
SPE – Solid-phase extraction - extração em fase sólida
TBT – Tributilestanho
Te – Testosterona
TGEA – ensaio de expressão de gene transiente
TGEA – ensaio de expressão do gene transiente
TIC - cromatograma de íons totais
 T_{md} – temperatura média
 T_{mn} – temperatura mínima
 T_{mx} – temperatura máxima
TQ – Triplo quadrupolo
 t_r – tempo de retenção
UFGD – Universidade Federal da Grande Dourados
Ura – uracila
US – Ultrassom
UV – detector de ultravioleta
X – valor inicialmente encontrado da variável para cada amostra

\bar{X}_m – valor médio da variável
Z - valor padronizado da variável
 σ - desvio padrão da variável na amostra.

SUMÁRIO

1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
1.1 Alteradores endócrinos	29
1.1.2 O sistema endócrino	31
1.1.3 Alteradores endócrinos no ambiente	33
1.2 Estrógenos naturais e sintéticos	34
1.3 Fitoestrógenos e seus efeitos biológicos	36
1.4 Teste de estrogenicidade: RYA - Ensaio com levedura recombinante	44
1.5 Ocorrência e dispersão ambiental de fitoestrógenos	46
1.6 Produção de soja no Brasil (compilado de EMBRAPA SOJA, 2003; 2004).	52
1.6.1 A palha da soja e o plantio direto	55
1.7 A microbacia do Rio Dourados (MS)	57
2 Objetivos	63
3 Parte Experimental	64
3.1 Análise qualitativa do extrato aquoso da palha da soja	65
3.1.1 Preparo do extrato	65
3.1.2 Condições cromatográficas para o sistema LC-MS/MS	66
3.2 Análise quantitativa dos fitoestrógenos na palha de soja	67
3.2.1 Preparo das soluções padrão	68
3.2.2 Condições cromatográficas	68
3.2.3 Avaliação do desempenho de cada sistema cromatográfico	69
3.2.4 Preparo do extrato	70
3.3 Otimização e validação de método para análise das isoflavonas em água de rio e sub-superficial	71
3.3.1 Preparo das soluções padrão	71
3.3.2 Condições cromatográficas para o sistema HPLC-UV Varian LC 920	72
3.3.3 Estudo de recuperação – água superficial enriquecida com os padrões	72
3.3.4 Estudo da estabilidade da amostra	74
3.4. Estudo ambiental	75
3.4.1 Pontos de amostragem	75
3.4.2 Preparo das amostras ambientais	78
3.5 Testes de estrogenicidade - RYA (<i>Recombinant Yeast Assay</i>)	80
3.6 Avaliação estatística dos dados	81
4 Resultados e discussão	83
4.1 Estudo do perfil químico da palha da soja	83
4.2 Análise quantitativa dos fitoestrogenos da palha de soja	95
4.2.1 Otimização dos parâmetros para análise por LC/MS-MS	95
4.2.2 Avaliação do desempenho do sistema LC/MS-MS	99
4.2.3 Análise por LC - MS/MS de fitoestrógenos na palha de soja	103
4.3 Otimização e validação de método para análise das isoflavonas em água de rio e sub-superficial	104
4.3.1 Avaliação do desempenho do sistema HPLC-UV (LC-920, Varian) seleção do comprimento de onda para as análises por HPLC-UV-DAD	104
4.3.2 Avaliação do desempenho do sistema HPLC-UV-DAD	105
4.3.3 Resultados da avaliação do desempenho sistema HPLC-UV (LC-920, Varian)	107

4.3.4 Avaliação do desempenho do novo sistema HPLC-UV para as demais isoflavonas.	112
4.3.5 Estudo de recuperação – água superficial enriquecida com os padrões	115
4.3.6 Estudo de conservação da amostra	125
4.4 Estudo ambiental: análises químicas e testes biológicos - Análise das amostras ambientais	126
4.4.1 Primeira coleta	130
4.4.2 Segunda coleta	134
4.4.3 Terceira coleta	137
4.4.4 Quarta coleta	139
4.5 Análises Multivariadas - Análise hierárquica por cluster	142
4.5.1 Análise de componentes principais	144
4.5.2 Testes de estrogenicidade (RYA)	147
4.5.3 Relevância ecotoxicológica	151
5 Conclusões	155
Referências	157
Apêndices	175

1 Revisão bibliográfica

Atualmente, as maiores preocupações relacionadas com a exposição dos ecossistemas aos alteradores endócrinos podem ser resumidas nas seguintes dúvidas: - se essas substâncias podem produzir efeitos tóxicos em baixas concentrações; - quais substâncias estão associadas aos efeitos tóxicos e se essas substâncias estão presentes em concentrações ambientalmente relevantes, para que possam ser uma ameaça à saúde de seres humanos e animais; - se existe uma concentração limiar abaixo da qual essas substâncias químicas podem ser consideradas como seguras; - se os novos tipos de ensaios, usados para prever os efeitos causados em organismos expostos, podem realmente fornecer ferramentas para o entendimento do mecanismo de ação dessas substâncias e, por fim, - se esses ensaios podem ser facilmente usados em larga escala para monitorar seus efeitos no meio ambiente.

Várias são as substâncias que possuem a capacidade de afetar o sistema endócrino, tais como, as sintéticas (alquilfenóis, agrotóxicos, ftalatos, bifenilaspoliocloradas (BFP), bisfenol A, substâncias farmacêuticas, dentre outras) e substâncias naturais (estrógenos e fitoestrógenos).

O comportamento dos alteradores endócrinos nas estações de tratamento de esgoto (ETE), solo e sedimentos marinhos tem sido investigado, bem como, seu transporte e destino no meio ambiente (CLARA *et al.*, 2004; COLUCCI; TOPP, 2001, COLUCCI *et al.*, 2001). Constata-se que o conhecimento do destino e dos processos de transporte desses poluentes no meio ambiente é essencial para avaliar seus impactos potenciais no solo e nas águas naturais.

Muitos grupos foram criados ao redor do mundo com o objetivo de avaliar a complexa situação dos alteradores endócrinos e são exemplos da crescente

preocupação mundial com essas substâncias. Diversos assuntos são abordados e investigados, tais como o monitoramento de substâncias estrogênicas em amostras de águas naturais (ARCEM – “Austrian Research Cooperation on Endocrine Modulators”); a validação dos métodos de ensaios que determinam as substâncias com potencial de alteração endócrina (EDSTAC – “Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee”, EDTA – “Endocrine Disrupter Testing and Assessment Task Force”); a identificação e caracterização de todos os efeitos relatados (EDSP – “Environmental Disruptor Screening Program”; Programa COMPREHEND – “Community Programme of Research on Endocrine Disrupters and Environmental Hormones”; CSTE – “Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment”); organização do conhecimento científico disponível sobre os alteradores endócrinos (SPEED’98/JEA – “Exogenous Endocrine Disrupting Chemical Task Force” e COM – “Community Strategy for Endocrine Disrupters”), dentre outros (BILA; DEZOTTI, 2007).

1.1 Alteradores endócrinos

Animais e plantas possuem um sistema de controle do organismo baseados em mensageiros químicos, que regulam algumas funções, tais como: reprodução, crescimento e manutenção. Nos animais estes sistemas utilizam várias glândulas que produzem tais mensageiros químicos (hormônios), os quais são transportados pelo organismo. Embora existam similaridades entre as espécies (na utilização de hormônios), diferentes rotas evolutivas podem produzir complexas variações, resultando num sistema regulatório multifacetado.

Sabe-se que certas moléculas podem interferir em rotas do sistema endócrino produzindo uma resposta indesejada, também chamada de alteração, a qual pode afetar a saúde, o crescimento e a reprodução de um grande número de organismos.

Essas substâncias são coletivamente conhecidas como alteradores endócrinos (AEs). A ocorrência e ação dos alteradores endócrinos (AEs) têm sido evidenciada desde o início do Século XX (DODDS *et al.*,1938), mas apenas recentemente, esse fenômeno tem emergido como um problema ambiental maior quanto aos efeitos sobre a saúde humana, gerando uma grande mobilização da comunidade científica do mundo todo e considerável interesse por parte da mídia.

Durante as décadas de 1950 e 1960, o pesticida DDT foi usado amplamente em todo o mundo em vasta quantidade, apesar do fato de que já havia sido demonstrado o efeito estrogênico desse inseticida no sistema reprodutivo de mamíferos e pássaros (BURLINGTON; LINDEMAN.,1950; BITMAN *et al.*,1968). Esses compostos são altamente persistentes no meio ambiente e mesmo assim são usados até hoje em algumas partes do mundo. Essas descobertas foram publicadas em 1962, no livro de Rachel Carlson (1962) “Primavera Silenciosa”, que expôs ao mundo os problemas de saúde que estavam ocorrendo em animais (tais como: deformidades, declínio populacional, etc), os quais foram relacionados à exposição dos animais a agrotóxicos e outras substâncias químicas sintéticas. Pesquisas têm indicado que a exposição precoce a hormônios pode produzir graves efeitos à saúde, tais como câncer em populações de jovens e adultos (DUNN; GREEN., 1963; TAKASUGI; BERN., 1964; FORESBERG., 1969).

Um exemplo das conseqüências devastadoras da exposição aos alteradores endócrinos foi o uso de uma potente droga: o dietilestilbestrol (DES), um estrógeno sintético. Antes de ser banido no início da década de 1970, médicos prescreveram DES para mais de cinco milhões de gestantes com o objetivo de conter abortos espontâneos. O DES foi prescrito com base na crença equivocada de que este evitaria o aborto e contribuiria para o crescimento fetal. As crianças que resistiram

aos efeitos abortivos do DES vieram a sofrer suas conseqüências na puberdade, quando muitas delas foram diagnosticadas com problemas de desenvolvimento do sistema reprodutivo, causando principalmente, câncer vaginal (HERBST *et al.*, 1971, HERBST *et al.*, 1975; GILL *et al.*, 1976). Essas descobertas foram reforçadas por estudos em laboratório, os quais confirmaram que o DES provocava um desenvolvimento anormal em culturas de células do sistema reprodutivo de machos e fêmeas (McLACHLAN *et al.*, 1975, 1980).

As conseqüências da exposição ao DES são bem conhecidas (MELNICK *et al.*, 1987). Kaufman *et al.* (2000) mostraram que as mães expostas ao DES possuíam maiores chances de terem problemas relacionados a nascimentos prematuros, abortos espontâneos e uma longa lista de efeitos deletérios no sistema reprodutivo.

1.1.2 O sistema endócrino

Organismos multicelulares necessitam de sistemas que regulem e integrem o funcionamento de diferentes células. Os dois sistemas responsáveis por essas funções são: o sistema nervoso e o sistema endócrino. Sendo o último crucial para plantas e animais por ser responsável pelo crescimento, reprodução, manutenção, homeostase e metabolismo (ENVIRONMENTAL..., 1997).

O sistema endócrino é constituído de muitas glândulas em diferentes áreas do organismo que produzem hormônios com diferentes funções (GRIFFIN; OJEDA, 1996). As glândulas do sistema endócrino são o hipotálamo, a pituitária, a tireóide, a paratireóide, as glândulas adrenais e as gônadas. Os hormônios sintetizados por essas glândulas são transportados pela corrente sanguínea e seus alvos no organismo são os locais onde exista a necessidade de uma resposta natural.

Essas células contêm sítios de ligação (receptores) e sítios ativos (COLBORN *et al.*, 1993). Quando os hormônios atacam o receptor, o sítio ativo é alterado produzindo a resposta desejada. Algumas moléculas hormonais “livres” nunca alcançarão os receptores e são inativadas *a priori* por excreção, realizada pelos rins num processo chamado de “limpeza metabólica”. Esse processo varia com o tipo de hormônio, mas o “tempo de vida” efetivo dos hormônios no corpo varia entre minutos e horas. Portanto, se a taxa de limpeza é baixa, o hormônio permanecerá no corpo por um longo período e poderá interagir com mais receptores, resultando em uma resposta mais intensa.

Além disso, quando os AEs estão presentes, os mecanismos de limpeza metabólica podem não ser realizados, levando a persistência e a bioacumulação dessas moléculas no corpo.

A maior parte dos AEs são pequenas moléculas que mimetizam ou antagonizam hormônios (Figura 1) como esteróides ou hormônios da tireóide (SUMPTER, 1998). Eles podem perturbar a ação de hormônios naturais responsáveis pelos processos de regulação homeostática e do desenvolvimento reprodutivo (SADIK; WITT, 1999).

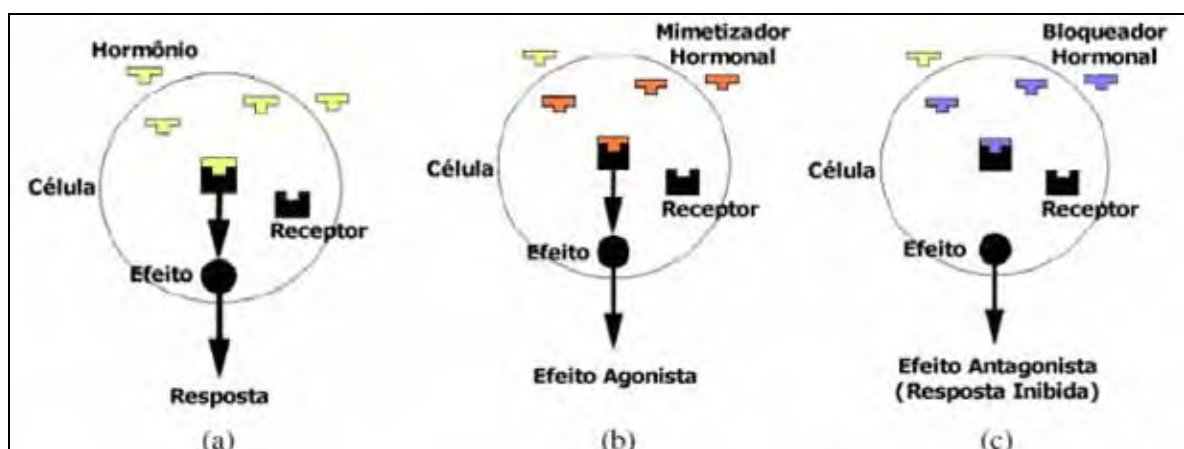


Figura 1: Alterações endócrinas: (a) resposta natural, (b) Efeito agonista e (c) Efeito antagonista. Adaptado de SUMPTER, 1998.

1.1.3 Alteradores endócrinos no ambiente

Talvez um dos exemplos mais representativos da atuação dos alteradores endócrinos na vida selvagem seja o uso do tributilestanho (TBT), como um componente antiincrustante presente na tinta que é usada nos cascos de embarcações (HERBST *et al.*, 1975; MORA, 1996).

Foi comprovado que esse composto possui propriedades androgênicas resultando na masculinização de fêmeas de moluscos (GIBBS; BRYAN, 1996), erradicando quase toda a população de algumas espécies dessa classe de organismos no Mediterrâneo. Os efeitos nas populações de ostras nas águas francesas também foram severos, levando o governo francês a criar uma legislação específica em 1982, restringindo a aplicação das formulações em embarcações maiores que 25 metros (ALZEIU, 1991). Em 1987, essa regulamentação foi seguida pelos Estados Unidos, pelo Reino Unido e outros países da União Européia. Desde então a presença de organoestânicos no meio ambiente (DOWSON; BUBB; LESTER, 1992; DOWSON *et al.*, 1992) vem sendo extensivamente estudada. Alternativamente, outros compostos antiincrustantes como os organocúpricos têm melhorado a eficácia na ação como antiincrustantes, exercendo um menor impacto ambiental, por serem usados em pequena escala (VOULVOULIS *et al.*, 1999).

Outro elucidativo estudo de alteradores endócrinos relacionados à vida selvagem foi realizado na Inglaterra e demonstrou o impacto de esteróides e substâncias estrogênicas (particularmente alquilfenóis) em peixes. Essas pesquisas apontaram para um grande número de estações de tratamento de esgoto cujos efluentes mostraram-se estrogênicos para peixes (PURDOM *et al.*, 1994; SUMPTER; JOBLING, 1995; SHEAHAN *et al.*, 2002).

Na literatura também se encontram relatos de alta prevalência de hermafroditismo em peixes e outros organismos que foram expostos a efluentes de estações de tratamento de esgoto (JOBILING *et al.*, 1998). Existem, ainda, alguns estudos que indicam uma possível correlação de efeitos sobre o poder reprodutivo humano com a exposição aos AEs. Os efeitos estudados em seres humanos incluem principalmente, redução na qualidade e quantidade de esperma, bem como, o aumento no número de casos de câncer de testículos (HANDELSMAN, 2001; CARLSEN *et al.*, 1992; SHARPE; SKAKKEBAEK, 1993; TOPPARI; SKAKKEBAEK, 2000). Existem ainda estudos que traçam um paralelo entre os efeitos estrogênicos sobre o sistema reprodutivo de animais selvagens desencadeados por poluentes tais como: agrotóxicos, estrógenos e surfactantes (FRY, 1995; MURK *et al.*, 1996; GUILLETTE, *et al.*, 1994; GUILLETTE, *et al.*, 1996; JOBILING *et al.*, 1998), com efeitos similares sobre os humanos (MATTHIESSEN, 2000).

Uma publicação considerada marco da preocupação com os alteradores endócrinos ambientais é o livro “O Futuro Roubado” (COLBORN *et al.*, 1996), o qual apresenta um grande conjunto de dados de alterações na vida selvagem e indica a possibilidade de que, tais alterações estivessem correlacionadas com a exposição a diversas classes de substâncias químicas, alertando para a possibilidade de esses mesmos efeitos atingirem o homem.

1.2 Estrógenos naturais e sintéticos

Estrógenos, como todos os esteróides, possuem estrutura similar à do colesterol e seus derivados Figura 2. Os estrógenos esteróidais são caracterizados por seu anel fenólico-A, contendo uma hidroxila na posição 3, que é essencial para a atividade biológica.

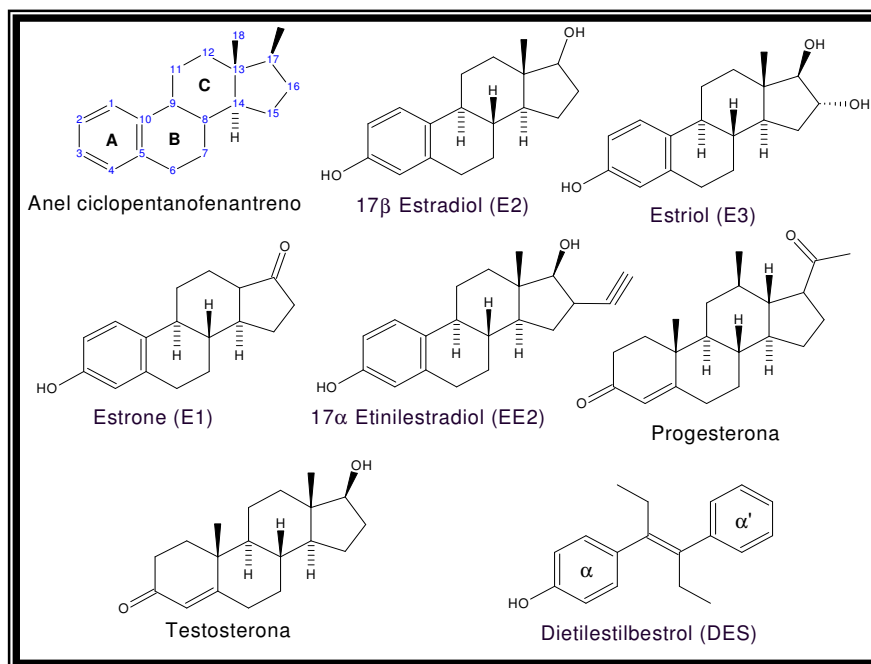


Figura 2: Estruturas de alguns alteradores endócrinos

O núcleo lipofílico do ciclopentanofenantreno representado na Figura 2 é constituído de grupos hidroxila e carbonila no caso de moléculas naturais, enquanto que nos esteróides sintéticos são geralmente adicionados grupos etinila em sua estrutura, como é o caso do 17 α -etinilestradiol, um dos princípios ativos mais utilizados em pílula anticoncepcional (MAKIN; HEFTMANN., 1988). Os grupos substituintes citados podem ser encontrados nas posições α e β sendo que a primeira configuração situa o grupo substituinte acima do plano e a segunda abaixo do plano.

Os estrógenos ambientais, também chamados xenoestrógenos, consistem num grupo diversificado de substâncias que não necessariamente possuem relações estruturais com os estrógenos naturais tal como o 17 β – estradiol, porém grande parte deles apresenta mecanismo de ação similar (JORDAN *et al.*, 1985).

Os estudos referentes às relações de estrutura-atividade (SAR) (DAUX; GRIFFIN., 1987) sugerem que quando o estradiol (E2) é ligado ao receptor estrogênico (RE) existe, preferencialmente, um reconhecimento do receptor ao anel

– A do esteróide. Os mais potentes antagonistas possuem anéis fenólicos capazes, na maioria das vezes, de mimetizar o efeito do anel – A de E2.

DAUX; GRIFFIN (1987) relataram que o potente estrógeno sintético DES possui atividade como alterador por se assemelhar estruturalmente a parte do anel – A do E2. Tal fato fortaleceu a hipótese de que a resposta de uma substância depende principalmente de sua configuração molecular que, neste caso, demonstrou ser a planaridade (caráter sp^2) condição fundamental. Portanto, os anéis de α e α' do DES cumpriram esse papel mimetizando a ação dos hormônios sintéticos e naturais.

1.3 Fitoestrógenos e seus efeitos biológicos

Fitoestrógenos são definidos como qualquer tipo de substância de origem vegetal, semelhantes estrutural e/ou funcionalmente aos estrógenos placentários do ovário e seus metabólitos ativos (WHITTEN; PATISAUL, 2001).

Nas plantas, os fitoestrógenos são metabólitos secundários que podem agir como fungicidas, reguladores hormonais e protetores contra radiação UV. Diversos tipos de plantas produzem essas substâncias que podem mimetizar ou interagir com estrógenos hormonais em animais. Existe uma lista de 20 fitoestrógenos que foram identificados em 300 plantas, de 16 diferentes famílias (COLBORN *et al.*, 1996). Esses fitocompostos possuem menor poder estrogênico que os estrógenos endógenos e sintéticos e estão presentes em concentrações elevadas em ervas, grãos, vegetais e frutas (LIGGINS *et al.*, 2000).

Alguns desses alimentos são comercializados mundialmente, especialmente a soja que é consumida em níveis elevados de forma direta ou indireta (ADLERCREUTZ *et al.*, 1991). Embora, as pesquisas sobre os fitoestrógenos, em

sua maioria, afirmem que esses produzem efeitos positivos sobre saúde humana (SETCHELL; CASSIDY, 1999; LISSIN; COOKE, 2000; KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002), algumas pesquisas têm mostrado o efeito dessas substâncias como alteradores endócrinos, o que poderia causar *intersex* em organismos aquáticos (KIPARISSIS *et al.*, 2003).

Cientistas têm focado sua atenção em dois principais grupos de fitoestrógenos: as isoflavonas e as lignanas. As isoflavonas são encontradas em soja (*Glycine Max* (L.) Merrill) e outros vegetais, enquanto as lignanas são produzidas por ação microbiana sobre grãos, fibras e estão presentes em diversas frutas e vegetais.

Os fitoestrógenos têm uma estrutura básica derivada do 2-fenilnaftaleno, a qual assemelha-se, no modo de ação, aos estrógenos endógenos. Eles têm sido encontrados ligados a receptores estrogênicos e pesquisas têm sugerido que podem atuar como agonistas ou antagonistas do sistema endócrino (THAM *et al.*, 1998). Os flavonóides, mais especificamente as isoflavonas, possuem uma atividade estrogênica relativamente alta quando comparadas às lignanas (WHITTEN; PATISAUL, 2001).

As estruturas de algumas destas substâncias estão apresentadas na Figura 3. As isoflavonas possuem uma estrutura difenólica que se assemelha à estrutura de potentes estrógenos sintéticos, como o dietilestilbestrol (DES). A daidzeína e a genisteína são dois isoflavonóides mais comumente encontrados na soja, enquanto que a formononetina e biochanina – A são majoritárias no trevo vermelho. A estrutura básica das lignanas provém do 2,3-dibenzilbutano e seus precursores essenciais são encontrados e produzidos pelas paredes celulares de plantas. No que tange as lignanas as fontes vegetais principais são as sementes, (linho,

abóbora, girassol e papoula), grãos inteiros (trigo e centeio), frutas (particularmente as cerejas e vegetais folhosos) (THAM *et al.*, 1998).

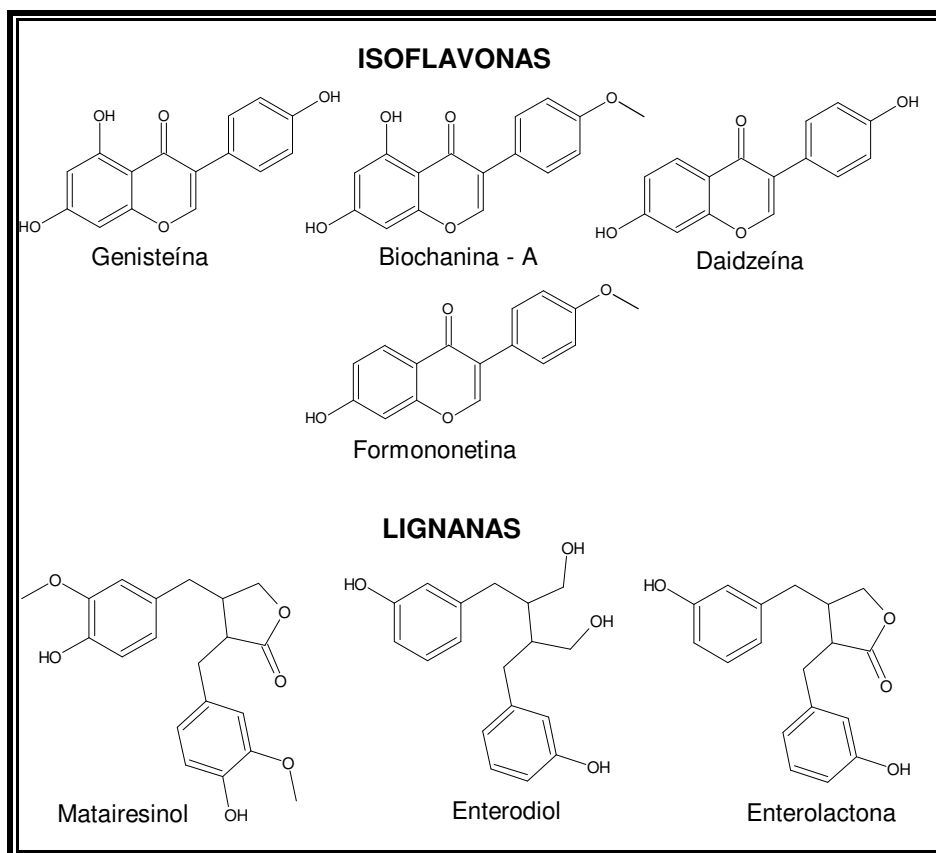


Figura 3: Estruturas de alguns fitoestrógenos.

As três isoflavonas mais abundantes na soja são a genisteína, daidzeína e gliciteína. Esses compostos são normalmente encontrados na soja na proporção de aproximadamente 1.3:1 (LC LABORATORIES, 2004).

Isoflavonas são estruturalmente semelhantes ao estrógeno E2 (Figura 4) e são conhecidas por apresentarem interações com receptores estrogênicos (RE) das enzimas que em geral desencadeiam efeitos biológicos em animais. Por exemplo, ratas alimentadas com dietas contendo uma relação 2:1 de genisteína/daidzeína revelaram inúmeros efeitos estrogênicos incluindo o alargamento do útero e queratinização do epitélio vaginal. Por outro lado, os machos apresentaram redução

plasmática das concentrações de testosterona e atrofia das glândulas sexuais (CLINE *et al.*, 2004).

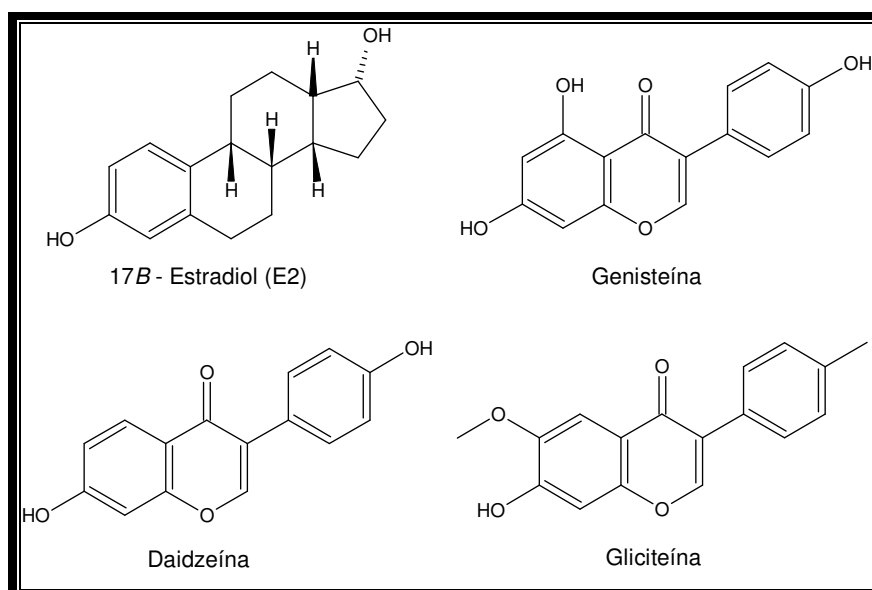


Figura 4: Estruturas químicas do 17β-estradiol (E2) e das três principais isoflavonas encontradas na soja.

Alguns trabalhos científicos relatam que a genisteína pode exercer efeito estrogênico em peixes. Por exemplo, KO *et al.* (1999) reportaram que a genisteína induz a produção de vitelogenina, com efeito semelhante ao do 17 β-estradiol (MALISON *et al.*, 1985; MALISON *et al.*, 1988).

Dietas a base de genisteína e daidzeína, também aumentaram as concentrações plasmáticas de vitelogenina em diferentes espécies de peixes tanto em machos quanto em fêmeas da espécie truta arco-íris (PELISSERO *et al.*, 2001), esturjão siberiano (*Acipenser baeri*) (PELISSERO; LE MENN; KAUSHIK, 1991; PELISSERO *et al.*, 1991), e *Morone saxatilis* (POLLACK *et al.*, 2003).

Um dado importante refere-se ao fato de que o efeito biológico da gliciteína, relacionado à atividade estrogênica, não é detectado em peixes, embora a gliciteína seja estruturalmente semelhante à genisteína e, portanto, passível de ser estrogênica (YULIANA *et al.*, 2006).

A genisteína exerce seus efeitos estrogênicos via mecanismo de ação por mimetização, ligando-se a receptores estrogênicos (RE), agindo como agonista, competindo com o hormônio E2 por tais sítios ativos das enzimas do sistema endócrino, sendo assim é razoável afirmar que tal mecanismo de ação que é válido para os mamíferos pode também se aplicar a outras espécies (KUIPER *et al.*, 1997; KUIPER *et al.*, 1998) tais como peixes (TOLLEFSON *et al.*, 2002; LATONNELLE *et al.*, 2002) mostrando que genisteína age ligando-se a RE.

Entretanto, estudos demonstraram que a genisteína liga-se de maneira mais fraca aos RE, se comparada com o hormônio E2, principalmente em espécies de peixes tais como a truta arco-íris, salmão do Atlântico e esturjão siberiano os quais apresentaram ligações com intensidades de 100 a 200 vezes menores que as realizadas pelo E2 (TOLLEFSON *et al.*, 2002; LATONNELLE *et al.*, 2002). Assim, é possível afirmar que pelo menos alguns dos potentes efeitos estrogênicos dos fitoestrógenos seriam vinculados e mediados por outros mecanismos além do relacionado à RE.

Dados da literatura indicam que mamíferos e peixes possuem um mecanismo alternativo, pelo qual esses compostos estrogênicos provocam a inibição da atividade de E2 no metabolismo periférico das enzimas. Especificamente, vários xenobióticos hidroxilados são associados a esse tipo de mecanismo tendo as hidroxilas papel fundamental, atuando como inibidores competitivos de conjugação de reações que normalmente inativam o E2. Em seres humanos, por exemplo, inúmeros xenoestrógenos hidroxilados, incluindo as formas hidroxiladas de bifenilspolioradas (PCBs), dibenzo-*p*-dioxinas e dibenzofuranos podem agir como potentes inibidores do estrógeno sulfotransferase resultando em atividade

estrogênica em concentrações subnanomolares (KESTER *et al.*, 2000; KESTER *et al.*, 2002).

Yuliana *et al.* (2006) pesquisaram os efeitos da genisteína sobre o metabolismo do E2 de três espécies de salmonícolas: truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), salmão do Atlântico (*Salmo salar*) e truta lacustres (*Salvelinus namaycush*). Demonstrou-se neste estudo que a genisteína, que possui três grupos hidroxila, e que é estruturalmente semelhante a E2 (Figura 3), é a responsável pela inibição da formação de metabólitos conjugados E2, porém ainda assim não existem dados suficientes que esclareçam completamente o papel das hidroxilas nesse mecanismo de ação alternativo. Percebe-se que o comportamento dessa molécula apresenta similaridades aos xenoestrógenos hidroxilados.

Nos últimos anos, a comunidade científica tem demonstrado interesse nos fitoestrógenos, como a genisteína e a daidzeína, principalmente devido aos seus possíveis efeitos benéficos. Entretanto, existem resultados conflitantes quanto a estes benefícios. Por exemplo, em estudos sobre o efeito da exposição de ratas em período pré-natal a genisteína, há o relato que esta exposição preveniu o câncer em glândulas mamárias (PHILLIPS *et al.*, 1999; HERTZ, 1985), enquanto outro estudo demonstra o aumento deste mesmo tipo de câncer (UKEA, 2000).

Hughes (1996) demonstrou um aumento nas taxas de síntese de colesterol em crianças que consumiam produtos derivados da soja. Enquanto que outros estudos demonstraram que a exposição á genisteína no período neonatal induziram a formação de adenocarcinoma uterino em ratos (OSPAR, 1998), similarmente à exposição ao DES.

Pesquisas adicionais sugerem efeitos adversos de genisteína em mulheres grávidas que consumiram produtos à base de soja, sendo que fora relatado um

aumento de incidência de hipospádia (má formação, de origem congênita, da uretra) em bebês (varões) nascidos destas mulheres (JAPAN ENVIRONMENT AGENCY, 1998). Corroborando com estes dados, outros estudos sugerem que os efeitos estrogênicos mais pronunciados das isoflavonas é sentido durante o desenvolvimento embrionário (COLBORN *et al.*, 1993; SUMPTER, 1998).

Estudos epidemiológicos relacionaram o alto consumo de produtos derivados da soja na infância ao aumento de problemas ligados a alergias em homens e mulheres, prolongado ciclo menstrual e um maior desconforto durante a menstruação (WWF, 2006; COMMISSION..., 2001).

Existem muitos dados disponíveis, utilizando diferentes bioensaios, que relacionam os fitoestrógenos às atividades estrogênicas e androgênicas. Na Tabela 1 estão sumarizados alguns destes dados. Nestes bioensaios, a substância padrão para o teste de estrogenicidade é o 17 β -estradiol (E2) e para o teste de androgenia é a testosterona (Te) ou a metiltrienolona (R1881).

Tabela 1: Atividades estrogênica/androgênica de fitoestrógenos em diferentes bioensaios (LIU *et al.*, 2009).

Fitoestrógeno	RBA (ER)		RBA (AR)		Potencial Estrogênico (EP)			
	hER(α) ^{ef}	hER(β) ^b	hAR(α) ^a	rAR(α) ^c	RGA ^a (ER(α))	YES ^d (ER(α))	TGEA ^b	
							ER(α)	ER(β)
Daidzeína	1,8e-3; 1e-3	5e-3	N.L.	–	6,67e-5	3e-6	0,97	0,8
Formononetina	2,65e-4; <1e-4	<1e-4	–	–	2,94e-5	–	0,06	0,02
Genisteína	1,2e-3; 4e-2	0,87	N.L.	3.6e-5	4,17e-4	3e-3	1,98	1,82
Biochanina-A	1,26e-5; <1e-4	<1e-4	–	–	9,09e-6	<3e-6	0,36	0,53
Gliciteína	2,8e-4 ⁱ	–	–	–	–	<3e-7	–	–
Equol	8,6e-3 ^f	0,02 ^f	–	4.1e-5	6,1e-4 ^f	3e-5	–	–

* **RBA**, afinidade relativa de ligação, receptor estrogênico (ER)/receptor androgênio (AR) ensaio de competição por ligação; **hER** - receptor humano de estrogênio; **hAR**, receptor humano de androgênio; **rAR** - receptor de androgênio do rato; **RGA**, ensaio de gene; **TGEA** - ensaio de expressão de gene transiente; –, **N.L.**, não ligante.

^a National Institute of Technology and Evaluation, Japan (NITE,2008).

^b Kuiper *et al.*, 1998.

^c Fang *et al.*, 2003.

^d Nishihara *et al.*, 2000.

^e Song *et al.*, 1999.

^f Matthews *et al.*, 2000

Analisando a Tabela 1 nota-se que os valores de estrogenicidade para os fitoestrógenos são relativamente baixos, exceto no ensaio de expressão do gene transiente (TGEA), no qual o potencial estrogênico de alguns fitoestrógenos apresenta-se no mesmo nível, ou maiores, que os encontrados para E2.

Comparados com substâncias de origem industrial tais como o bisfenol-A (*BPA*) ou o nonilfenol (*NP*), a maior parte dos fitoestrógenos possui potencial estrogênico da mesma ordem de magnitude. As concentrações na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$, tanto para os fitoestrógenos quanto para *BPA* e *NP* provocam altos níveis de atividades estrogênicas, dessa forma, a presença dessas substâncias não pode ser

negligenciada, principalmente quando encontradas em altas concentrações em amostras ambientais. Por outro lado, poucos fitoestrógenos possuem atividade androgênica (Tabela 1).

Para monitorar a atividade estrogênica dos fitoestrógenos em ambientes aquáticos, que em geral são de grande complexidade, é muito importante ter a estimativa das concentrações existentes nesses ambientes.

Ainda, em relação aos efeitos biológicos dos fitoestrógenos, cabe salientar que plantas produtoras de fitoestrógenos também podem causar impacto sobre outras espécies vegetais e à microbiota do solo. Isoflavonas extraídas de raízes de soja foram pesquisadas com foco na relação planta-microrganismo e foi constatado que essas substâncias causam a inibição do crescimento de microrganismos demonstrando assim o caráter alelopático dessas substâncias (PARK *et al.*, 2001), sendo também relatada a atividade nematicida para estas substâncias (AKHTAR; MAHMOD, 1994).

Têm sido relatado na literatura os efeitos adversos das isoflavonas que causam impacto por exercerem forte competição com outras espécies de plantas, sendo conhecidas como substâncias de alto efeito alelopático (BAIS *et al.*, 2004; SINGER *et al.*, 2004) e até mesmo sendo classificadas como tóxicas (WITTSTOCK; GERSCHENZON, 2002).

1.4 Teste de estrogenicidade: RYA - Ensaio com levedura recombinante

O ensaio com levedura recombinante (RYA) é um dos mais adequados para avaliação de alteração endócrina (AE) de uma substância ou amostra ambiental. Neste ensaio é usada uma levedura recombinante que contém dois elementos genéticos, um deles atuando como um sensor e o outro como repórter. O elemento

sensor consiste de um receptor de vertebrado (receptor de estrógeno humano-ER) ao qual o AE se liga com média a alta afinidade. O gene repórter codifica um produto que pode ser facilmente quantificado (em nosso caso codificando a enzima beta-galactosidase de *E.coli.*) e a expressão do qual é feita de modo dependente da ativação do ER pela presença de estrógenos (GARCÍA-REYERO *et al.*, 2001).

Nesse sistema, um estrógeno ou composto similar a estrógeno presente no meio de cultura da levedura poderia desencadear a seguinte cascata de eventos: a) Ligação aos receptores de estrógenos (ER) das células leveduriformes, b) o complexo resultante poderia promover a expressão do gene da betagalactosidase, c) a enzima correspondente seria fabricada pelos moldes de uma célula leveduriforme, d) a enzima produzida poderia tornar-se um substrato cromogênico (GARCÍA-REYERO *et al.*, 2001).

O sistema não fornece a medida direta da concentração molar (ou massa) dos agentes estrogênicos, mas a sua atividade. Para simplificar, os resultados são fornecidos em "estradiol equivalente", definido como a quantidade de estradiol presente na amostra responsável pela resposta observada. Esses equivalentes são calculados a partir da mais baixa diluição em que a atividade da betagalactosidase é similar a do controle negativo. A atividade estrogênica na diluição mais baixa é considerada o limite de detecção para o estradiol nessas condições, o que é similar ao limite de detecção do RYA (GARCÍA-REYERO *et al.*, 2001).

O gene repórter foi construído de maneira que essa enzima pudesse ser somente expressada na presença do complexo estrógeno-ER, regulados de uma maneira similar a muitos genes femininos em vertebrados (GREEN; CHAMBON, 1991; GARCÍA-REYERO *et al.*, 2001). A similaridade de todos os eucariotos

assegura que o mecanismo funciona da mesma maneira em vertebrados e em levedura.

O ensaio com leveduras recombinantes emprega células leveduriformes geneticamente modificadas para reproduzir a via natural do controle genético de dois estrógenos em vertebrados (COLDHAM *et al.*, 1997; GARCÍA-REYERO *et al.*, 2001). Este ensaio tem a vantagem de ser simples, sensível e com boa reprodutibilidade (KORNER *et al.*, 1999; QUIROS *et al.*, 2005; TASHIRO *et al.*, 2004; CESPEDES *et al.*, 2005).

1.5 Ocorrência e dispersão ambiental de fitoestrógenos

Como mencionado anteriormente, as isoflavonas ocorrem naturalmente em plantas como a soja (*Glycine Max (L.) Merrill*) e trevo vermelho (*Trifolium ssp.*), tais plantas contêm concentrações elevadas dessa substância, na ordem de g/kg.

O trevo vermelho é comumente usado na Europa como pastagem e como adubo orgânico nas plantações de milho e é conhecido por conter grandes quantidades de formononetina (FOR) e biochanina A (BIO). (BOLLER, 1996; SIVESIND; SEGUIN, 2005).

Por outro lado, a soja possui como metabólitos principais a daidzeína (DAI) e a genisteína (GEN) (FLETCHER., 2003; MORRISON *et al.*, 2008).

A DAI é facilmente reduzida a equol que, por sua vez, não é produzido pela planta e sim por um processo metabólico que ocorre no intestino de mamíferos. O equol também é formado pelo processo de degradação da DAI por microrganismos presentes nos solos e água (LUNDH, 1995; HEINONEN *et al.*, 2004).

A presença de isoflavonas em águas residuais e efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE), bem como água de rio e água tratada foi investigada

por vários autores (BESTER *et al.*, 2009; TERNES *et al.*, 2001; PAWLOWSKI *et al.*, 2004; LAGANÀ *et al.*, 2004; BALCONI *et al.*, 2005; KANG *et al.*, 2006; FARRÉ *et al.*, 2008). Esses estudos reportam a presença de GEN, DAI e BIO que foram encontradas em concentrações da ordem de centenas de ng L^{-1} , além de indicarem a remoção de 50 a 100% dessas isoflavonas.

Apesar de existirem diversos trabalhos investigando a presença de isoflavonas em ambientes urbanos (ETAs, ETEs, corpos d'água que sofrem influência de cidades, etc), poucos são os estudos enfocando a presença destas substância em ambiente rural.

Burnison *et al.* (2003) examinaram esterco de porco encontrando concentrações de equol na ordem de mg Kg^{-1} . Em outro estudo, porcos que foram alimentados com 20% de trevo vermelho (*Trifolium ssp.*) na ração, excretaram após 8 horas, 55% do total de isoflavonas ingeridas na forma de FOR e DAI (LUNDH *et al.*, 1995).

Em um trabalho desenvolvido na Suíça (SCHUBIGER *et al.*, 1998) estimou-se que o consumo de isoflavonas por vacas varia de 50 - 100 g por dia. Assumindo que 25 g de isoflavonas estão presentes em cerca de 50 – 60 L de estrume excretado por vaca ao dia. Considerando-se que a aplicação destes dejetos como melhoradores de solo é feita na proporção de $50\text{-}100 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$, então se pode inferir que cerca de $20 - 50 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ de isoflavonas são incorporados a solos agrícolas, naquele país. Sendo as isoflavonas solúveis em água (Tabela 2), pode-se inferir que o risco de que sejam lixiviadas pelas chuvas para corpos hídricos naturais é bastante alto e não deve ser negligenciado.

Tabela 2: Propriedades físico-químicas das principais isoflavonas (HOERGER *et al.*, 2009).

	Formononetina (FOR)	Daidzeína (DAI)	Equol	Biochanina A (BIO)	Genisteína (GEN)
Estrutura					
Massa molecular (g/mol)	268,3	254,2	242,3	284,3	270,2
log Kow	3,11 (estimado) ^a	2,55 (estimado) ^a 2,51 (experimental pH 7,4) ^b	3,60 (estimado) ^a 3,20 (experimental pH 7,4) ^b	3,41 (estimado) ^a	2,84 (estimado) ^a 3,04 (experimental, pH 7,4) ^b
pKa	7±1 ^c	7±1, 13±1 ^c	7±1, 10±1 ^c	7±1, 13±1 ^c	7,2, 10, 13,2 ^c
Tempo de meia-vida (dias) em águas naturais^d	4	36	29	26	32

^a Meylan; Howard. 1995.

^b Rothwell *et al.*, 2005.

^c Zielonka *et al.*, 2003.

^d Erbs *et al.*, 2007.

Os valores do coeficiente de partição octanol/água log Kow aumentam com o aumento da lipofilicidade que é inversamente proporcional a solubilidade em água. Altos valores de log Kow são característicos de grandes moléculas e de moléculas hidrofóbicas que tendem a associar-se com a matéria orgânica sólida possuindo assim menor potencial de lixiviação, enquanto moléculas menores, hidrofílicas, possuem baixos valores de log Kow. Este coeficiente também é considerado um excelente parâmetro para inferir o fator de bioconcentração de uma determinada substância química, que representa neste caso uma indicação mais precisa da extensão da adsorção das substâncias por microrganismos, sendo que substâncias com altos valores de log Kow possuem alto potencial de bioacumulação em

organismos devido ao maior potencial de permeabilidade na bicamada lipoprotéica dos organismos (BELL; TSEZOS,1987).

Quanto ao significado para o ambiente dos valores de log Kow, pode-se agrupá-los em faixas. Valores de log Kow > 4 são representativos de substâncias lipofílicas (apolares), nessa faixa as substâncias demonstram tendência de adsorção em partículas (solo ou material particulado em suspensão na coluna d'água) e bioacumulação. O intervalo de $1,5 < \log Kow < 4$ inclui substâncias moderadamente hidrofílicas que tendem a sofrer processos de lixiviação. A última faixa abrange os valores de log Kow < 1,5 que representa as substâncias de caráter hidrofílico (polares) e que possuem alto potencial de lixiviação. Outro fator que influencia a dispersão de contaminantes é o pH do meio. Água e solo possuem pH entre 5 e 8, substâncias com pKa >10 tendem a ficar retidas no solo ou em partículas da coluna d'água, enquanto que substâncias que apresentam pKa entre 3 e 9 tendem a sofrer maior efeito de lixiviação contaminando com maior frequência os corpos d' água, pois tornam-se mais solúveis em água, por estarem desprotonadas, o que contribui para uma maior solubilidade destas em água (ROGERS, 1996; BURGESS *et al.*,1999).

De acordo com os dados de meia-vida apresentados na Tabela 2 (p. 48) nota-se que o tempo de meia-vida das isoflavonas no ambiente aquático situa-se entre 26 e 41 dias, porém de acordo com Minderman (1960) a persistência de substâncias fenólicas no solo é alta e possui valor de meia-vida de aproximadamente sete anos. Desta maneira, as isoflavonas presentes no solo podem significar uma fonte de aporte constante destas substâncias para os recursos hídricos.

A contribuição das plantações para o aporte de substâncias, tais como as isoflavonas da soja, são muito pouco estudadas. Alguns dados iniciais foram

publicados por Erbs *et al.* (2007) que relataram concentrações de isoflavonas entre 4 e 157 ng L⁻¹ em águas de drenagem de campos de pastagem de trevo vermelho (*Trifolium pratense*), uma leguminosa forrageira de inverno, originária da Europa e Ásia. Na Suíça os bovinos são alimentados basicamente com este tipo de forragem e seu estrume é colocado diretamente nas pastagens com a finalidade de fechar o ciclo dos nutrientes necessários para a manutenção da fertilidade do solo. Concomitantemente, as áreas de pastagens e a produção de gado em uma determinada bacia hidrográfica são duas coisas que estão fortemente correlacionadas. Portanto, os autores concluem que é difícil distinguir se a fonte de emissão de isoflavonas é proveniente da planta, ou seja, após o seu corte inicia-se um processo de decomposição do material vegetal ou, se essa emissão está ligada diretamente à aplicação de estrume nas pastagens ou ainda, se há a contribuição de ambas as fontes.

Na literatura existem diversos trabalhos nos quais são apresentados dados para a ocorrência de fitoestrógenos, principalmente daidzeína e genisteína, em água, efluentes de ETE e solo, muitas vezes associando esta ocorrência à excreta humana ou animal.

A presença de isoflavonas em mananciais hídricos também pode ser atribuída a liberação, por lixiviação pela chuva ou irrigação, a partir de material vegetal degradado (LAGANÀ *et al.*, 2004). Estes compostos também têm sido detectados na enxurrada de áreas agrícolas tratadas com resíduos vegetais utilizados como adubo orgânico (BURNISON *et al.*, 2003).

Os fitoesteróis estroginicamente ativos (inclui-se aqui também os fitoestrógenos), tais como o β -sitosterol e a genisteína, são encontrados em plantas em níveis significativos e, por conseqüência, no processo de degradação desses

vegetais pode ocorrer a contaminação dos solos agrícolas com níveis de concentração preocupantes. Essas moléculas também estão presentes no tratamento de efluentes de indústrias de celulose (PAWLOWSKI *et al.*, 2003; PAWLOWSKI *et al.*, 2004; PUGLISI *et al.*, 2003).

O cerne de muitas espécies de árvores é rico em fitoesteróis, que foram encontrados em efluentes de fábricas de pasta de celulose em concentrações elevadas (COOK *et al.*, 1996; MAHMOOD-KHAN; HALL, 2003), tais concentrações foram capazes de causar disfunção reprodutiva e o aparecimento de anormalidades em peixes (DENTON *et al.*, 1985; HOWELL; DENTON, 1989; MacLATCHY; VAN DER KRAAK, 1995). As isoflavonas genisteína e daidzeína também foram detectadas em efluentes de fábricas de papel (KIPARISSIS *et al.*, 2001). Portanto, a contaminação dos ambientes aquáticos por fitoestrógenos constitui um problema potencialmente grave que deve ser investigado.

Na Tabela 3 estão sumarizados alguns dados sobre a ocorrência de fitoestrógenos em matrizes ambientais.

Tabela 3: Fontes de contaminação por fitoestrógenos e respectivas concentrações

Matriz	Substância	Concentração	Referência
Efluente de ETE	genisteína	Média= 12,6±4,39 ng L ⁻¹	Spengler <i>et al.</i> , 2001
		Faixa= 2,7 – 38,1 ng L ⁻¹	Lintelmann <i>et al.</i> , 2003
	daidzeína	Média < 10 ng L ⁻¹	
	β -sitosterol	Média=75±15 ng L ⁻¹	Pawlowski <i>et al.</i> , 2003
	β -sitosterol	Mediana= 519 ng L ⁻¹	Stumpf <i>et al.</i> , 1996
	β -sitosterol	Média= 1,05 ± 0,28 μ g L ⁻¹	Spengler <i>et al.</i> , 2000
Solos agrícolas	β -sitosterol	Faixa= 0,9 - 30 mg kg ⁻¹	Puglisi <i>et al.</i> , 2003
Estrume usado na adubação do solo	equol	6,9 μ g g ⁻¹ - 16,6 mg kg ⁻¹	Burnison <i>et al.</i> , 2003
Efluente de indústria de celulose	genisteína	13,1 μ g L ⁻¹ , 10,5 μ g L ⁻¹	Kiparissis <i>et al.</i> , 2001
	β -sitosterol	Faixa= 69 - 528 μ g L ⁻¹	Mahmood-Khan, 2003
	mistura de fitoesteróis	Faixa= 17 - 535 μ g L ⁻¹	Cook <i>et al.</i> , 1996
Afluente de ETE Efluente de ETE	daidzeína	Faixa= 75 - 20 ng L ⁻¹ Faixa= 7 - 16 ng L ⁻¹	
Afluente de ETE Efluente de ETE	genisteína	Faixa= 195 - 384 ng L ⁻¹ Faixa=15 - 83 ng L ⁻¹	Laganà <i>et al.</i> , 2004
Água superficial	genisteína	Faixa= 4 - 7 ng L ⁻¹	
Água superficial	daidzeína	Faixa= 43 - 143 μ g L ⁻¹	Kawanishi <i>et al.</i> , 2004
Água superficial	genisteína	Faixa= 3 - 5 ng L ⁻¹	Balconi <i>et al.</i> , 2005
	daidzeína	Faixa= 2 - 4 ng L ⁻¹	
Água superficial	genisteína	Faixa=4 - 157 ng L ⁻¹	Erbs <i>et al.</i> , 2007
	daidzeína	Média= 276 ng L ⁻¹	
Água superficial	genisteína	Média= 366 ng L ⁻¹	Kuster <i>et al.</i> , 2009
Água superficial	daidzeína	Média= 500 ng L ⁻¹	Ribeiro <i>et al.</i> , 2009
	genisteína	Média= 320 ng L ⁻¹	
	biochanina-A	Média= 170 ng L ⁻¹	

ETE: estação de tratamento de esgoto.

1.6 Produção de soja no Brasil (compilado de EMBRAPA SOJA, 2003; 2004).

A soja que é hoje cultivada mundo afora, é muito diferente das ancestrais que lhe deram origem: espécies de plantas rasteiras que se desenvolviam na costa da Ásia, principalmente ao longo do Rio Amarelo, na China.

Apesar de conhecida e explorada no Oriente há mais de cinco mil anos, o ocidente ignorou o seu cultivo até meados de 1920, quando os Estados Unidos (EUA) iniciaram a sua exploração comercial.

O primeiro registro do cultivo de soja no Brasil data de 1914 no município de Santa Rosa, RS. Mas foi somente nos anos de 1940 que ela adquiriu alguma importância econômica, merecendo o primeiro registro estatístico nacional, no anuário agrícola do RS: área cultivada de 640 ha, produção de 450 Mkg e rendimento de 700 kg/ha. Já em 1949, com produção de 25000 Mkg, o Brasil figurou, pela primeira vez, como produtor de soja nas estatísticas internacionais.

Mas foi a partir de 1960, impulsionada pela política de subsidio ao trigo, visando à auto-suficiência que a soja se estabeleceu como cultura economicamente importante para o Brasil. Nessa década a sua produção multiplicou-se por cinco (passou de 206 mil Mkg, em 1960, para 1,056 milhão de Mkg, em 1969) e 98 % desse volume era produzido nos três estados da Região Sul, onde prevaleceu o cultivo associado: trigo no inverno e soja no verão.

Apesar do significativo crescimento da produção durante os anos de 1960, foi na década seguinte que a soja consolidou-se como a principal cultura do agronegócio brasileiro, passando de 1,5 milhões de Mkg (1970) para mais de 15 milhões de Mkg (1979). Mais de 80% do volume produzido na época se concentrava nos três estados da Região Sul do Brasil. Em 1970, menos de 2% da produção nacional de soja era colhida no centro oeste.

Nas décadas de 1980 e 1990 houve, na região central do Brasil, o explosivo crescimento da produção semelhante ao ocorrido nas duas décadas anteriores na Região Sul. Em 1980, o percentual colhido na região centro-oeste saltou para 20%,

e em 1990 já era superior a 40%, em 2003 estava próxima dos 60% da produção nacional (Figura 5).

Com uma produção de mais de 58,1 milhões de Mkg e exportando mais de 30 milhões de Mkg em 2009, o Brasil tornou-se um dos maiores exportadores de soja do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos. A produção de soja movimenta cerca de 6% do PIB e emprega 5,5 milhões de pessoas em todo o país.

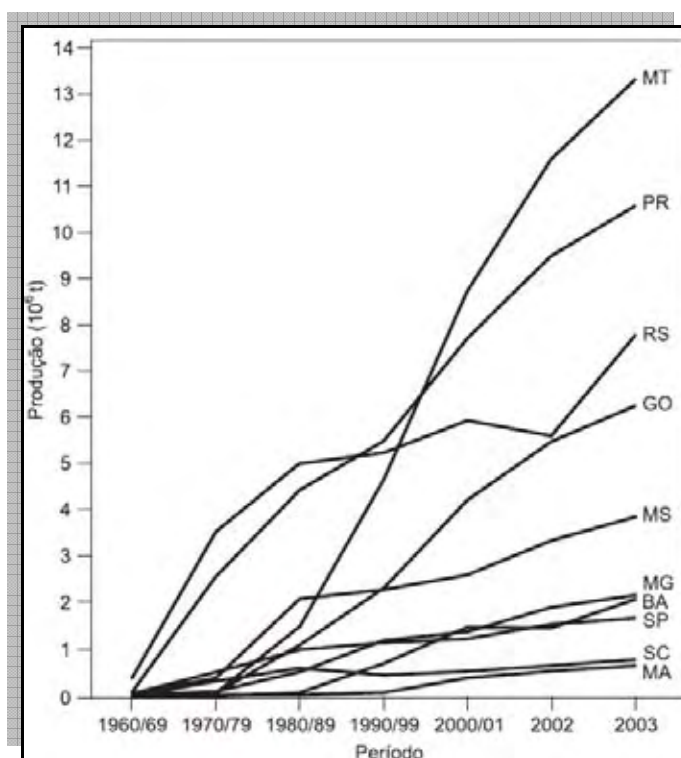


Figura 5: Evolução da produção de soja nos principais estados produtores, no Brasil (EMBRAPA SOJA, 2003).

Entretanto, atrás de todo esse sucesso econômico, existem problemas ambientais que se estendem desde o Sul até a Região Amazônica.

Um exemplo é a poluição das águas na região da Bacia hidrográfica do Paraguai resultante do uso inadequado do solo nas áreas de cultivo de soja. Nas áreas onde a agricultura foi implantada, os solos geralmente são mais resistentes a erosão. Porém, esses solos argilosos contribuem com uma carga expressiva de

sedimentos finos, os quais influenciam na turbidez da água e no transporte de produtos químicos, incluindo agrotóxicos (BRASIL. AGÊNCIA..., 2004).

A implantação da monocultura de soja propiciou o uso de insumos agrícolas, como fertilizantes e biocidas. Neste tipo de cultura pode-se chegar a utilizar mais de vinte biocidas diferentes, em uma mesma safra. (BRASIL. AGÊNCIA..., 2003).

A complexidade dos ecossistemas, o fato de que essa cultura se estende por grandes regiões do país (Figura 6), incluindo o cerrado, além do ritmo acelerado da expansão da cultura da soja, foram fatores que contribuíram para que os impactos dessa cultura no meio ambiente não tivessem sido estudados de forma completa até o momento.

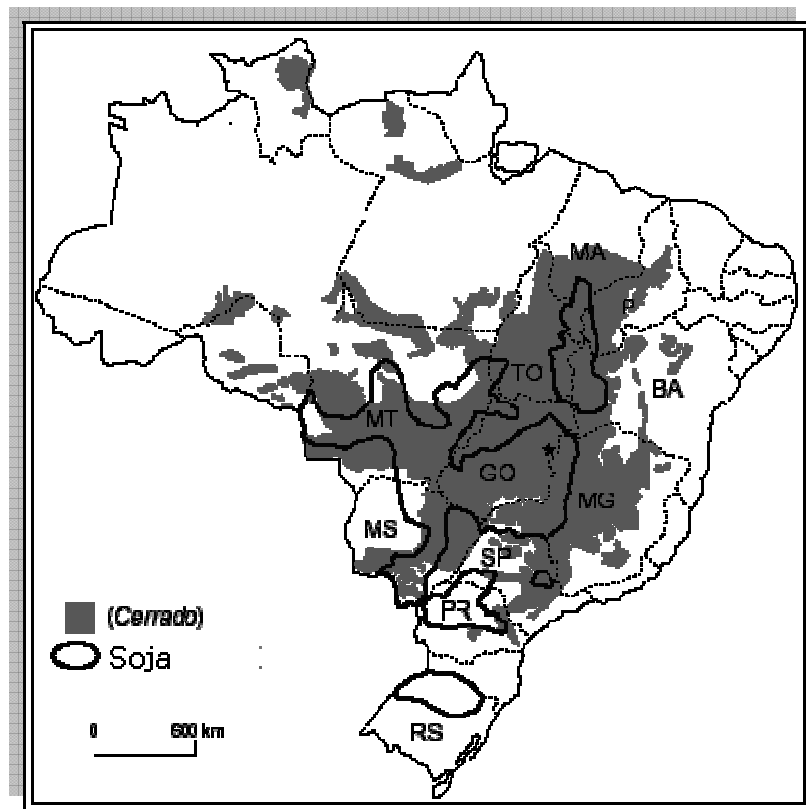


FIGURA 6: Abrangência da cultura de soja no Brasil (EMBRAPA SOJA, 2003).

1.6.1 A palha da soja e o plantio direto

O Sistema de Plantio Direto pressupõe a cobertura permanente do solo que, preferencialmente, deve ser de culturas comerciais ou, quando não for possível,

culturas de cobertura do solo. Tal cobertura resulta do cultivo de espécies que dispõem de certos atributos, como: produzir grande quantidade de massa seca, possuir elevada taxa de crescimento, ter certa resistência à seca e ao frio, não infestar áreas e ser de fácil manejo, ter sistema radicular vigoroso e profundo, ter elevada capacidade de reciclar nutrientes, ser de fácil produção de sementes (EMBRAPA, 2004).

A produção da palha pela soja, aliada à rápida decomposição dos seus resíduos, tornou viável a utilização desta no sistema de plantio direto (SPD), especialmente quando essa leguminosa é cultivada como monocultura. Conforme citado por CARVALHO (1992), a relação da palha da soja com o peso do grão varia de 120 a 150%, mostrando que anualmente ficam nas lavouras no mínimo 6.265.964 Mkg de palha de soja só no Rio Grande do Sul.

A decomposição dos restos vegetais no solo foi acompanhada, em clima temperado, por Minderman (1960), que propôs as curvas de decomposição apresentadas na Figura 7. Estas curvas podem ter desenhos diferentes dependendo do clima e tipo de solo, mas é importante salientar a relativa persistência dos compostos fenólicos, que tem a curva com menor inclinação dentre as classes de compostos estudados por estes autores. Desta maneira, os fitoestrógenos, que são compostos fenólicos, devem ter uma degradação lenta no solo e por isso e pela sua solubilidade em água, sua lixiviação para corpos hídricos pode ocorrer.

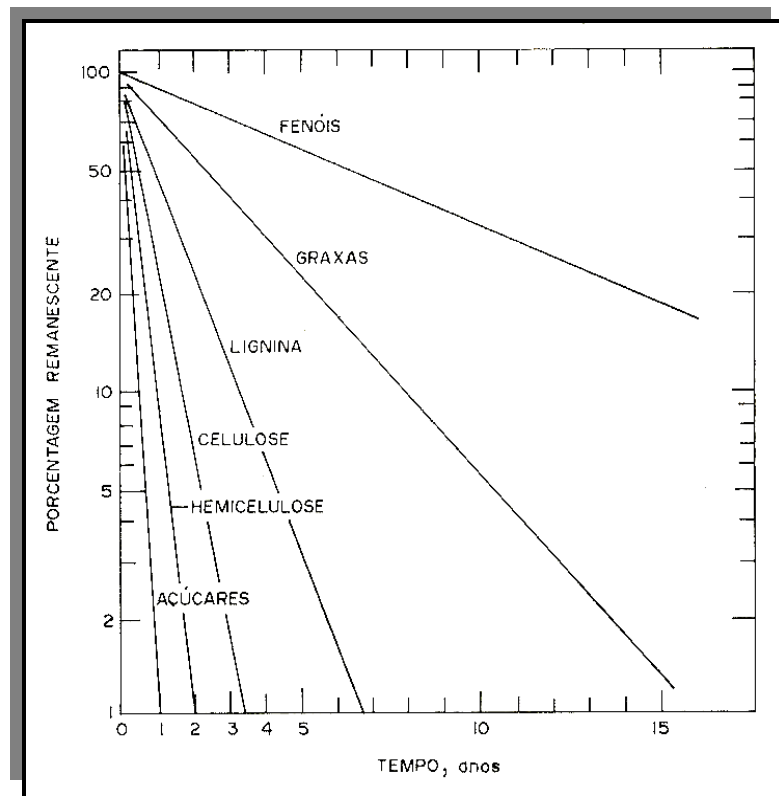


Figura 7: Curvas de decomposição no solo dos principais constituintes orgânicos vegetais. Adaptado de MINDERMAN (1960).

1.7 A microbacia do Rio Dourados (MS)

O Estado de Mato Grosso do Sul está configurado em duas bacias hidrográficas de grande porte, uma a oeste, a do Rio Paraguai e a outra a leste, do Rio Paraná (Figura 8). A microbacia do Rio Dourados faz parte da rede hidrográfica do Rio Paraná e situa-se em uma região de intensa exploração agropecuária, favorecida pelas condições edáficas e de relevo. Ali se concentra uma parcela significativa da população de Mato Grosso do Sul, quer pelas cidades inseridas na bacia, quer pela predominância dos estabelecimentos rurais. Trata-se, portanto, de uma região que vem exercendo forte pressão sobre os ecossistemas, em particular sobre os fatores e processos que interferem na qualidade das águas. Os riscos de degradação hídrica são diversificados, entre os quais se destacam: a ampla destruição da outrora exuberante cobertura vegetal, em especial, das matas ciliares;

a utilização generalizada de agrotóxicos nas lavouras e pastagens e a pequena quantidade de propriedades rurais com práticas de conservação de solo (MATO GROSSO DO SUL, 2000).

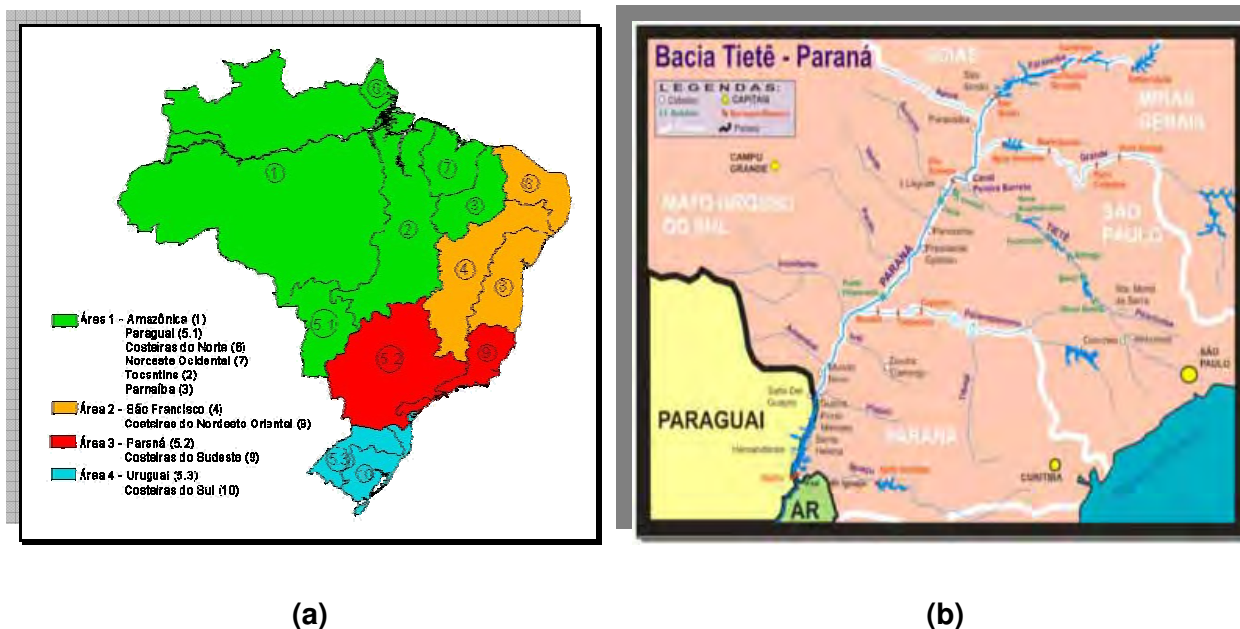


Figura 8: a) Principais Bacias Hidrográficas Brasileiras; b) Detalhamento da Bacia do Rio Paraná.

A microbacia do Rio Dourados possui uma área de 9.205,41 km² e faz parte da sub-bacia do Rio Ivinhema o qual é integrante da bacia do Rio Paraná. Esta bacia situa-se na região sul do Estado de Mato Grosso do Sul, entre as coordenadas geográficas 21°56'36" e 22°38'06" de Latitude Sul e 53°59'57" e 55°57'26" de Longitudes Oeste, ocupando uma faixa no sentido oeste-leste desde as imediações da serra de Maracaju até a foz do Rio Dourados no Rio Brilhante. O Rio Dourados nasce nas imediações da serra de Maracaju a uma altitude de aproximadamente 700 metros e percorre uma extensão de 374 quilômetros até a sua foz (Figura 9) (MATO GROSSO DO SUL, 2000).

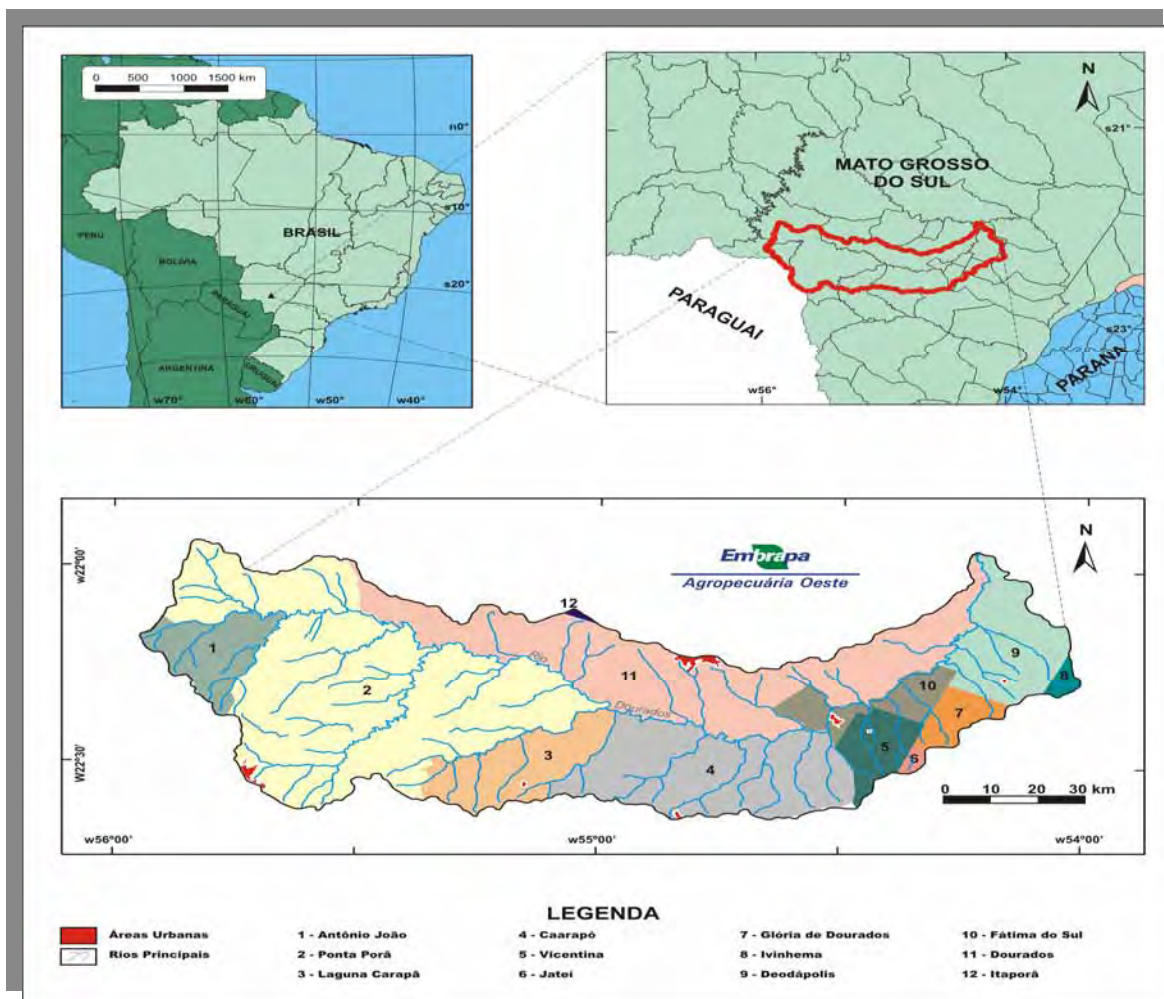


Figura 9: Microbacia do Rio Dourados.

O Rio Dourados é de suma importância para o município de Dourados (MS), pois suas águas superficiais abastecem 75% da população urbana do município. Os principais usos da água do Rio Dourados são para abastecimento público, irrigação, dessedentação de animais e industrial (AYRES, 2000).

O trabalho publicado por Pereira *et al.* (2007) é um dos mais completos a respeito da Microbacia do Rio Dourados e descreve a análise de mapas de precipitação média anual na bacia em estudo (Figura 10), os pesquisadores descreveram neste artigo que a precipitação na região de cabeceira chega a atingir valores superiores a 1.700 mm, decrescendo em direção à foz, onde se verificam precipitações médias anuais inferiores a 1.300 mm. Segundo os autores da pesquisa

essa redução equivale à variação da ordem de 28,6% para uma área de 8.887 km², evidenciando grande variação da precipitação na bacia.

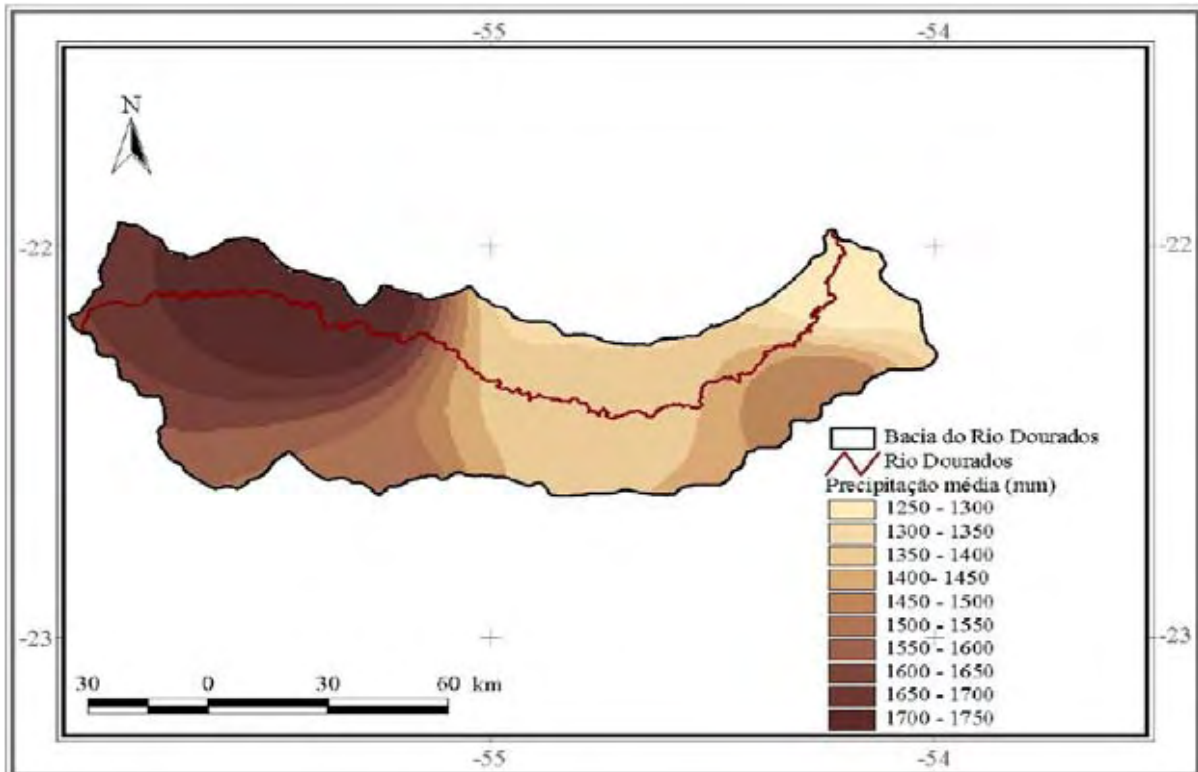


Figura 10: Distribuição espacial da precipitação média anual na Bacia do Rio Dourados, considerando o período de 1973 a 2002 (PEREIRA *et al.*, 2007).

A Figura 11 representa a distribuição da precipitação média mensal que foi obtida. Os autores verificaram que o regime de precipitação apresenta oscilação unimodal, sendo de outubro a março os meses mais chuvosos, superiores a 150 mm, correspondendo a 66% do total anual precipitado na bacia. As precipitações médias mensais variaram desde valores inferiores a 36 mm e superior a 186 mm, sendo a precipitação média anual na área de drenagem da bacia de 1.485 mm (PEREIRA *et al.*, 2007).

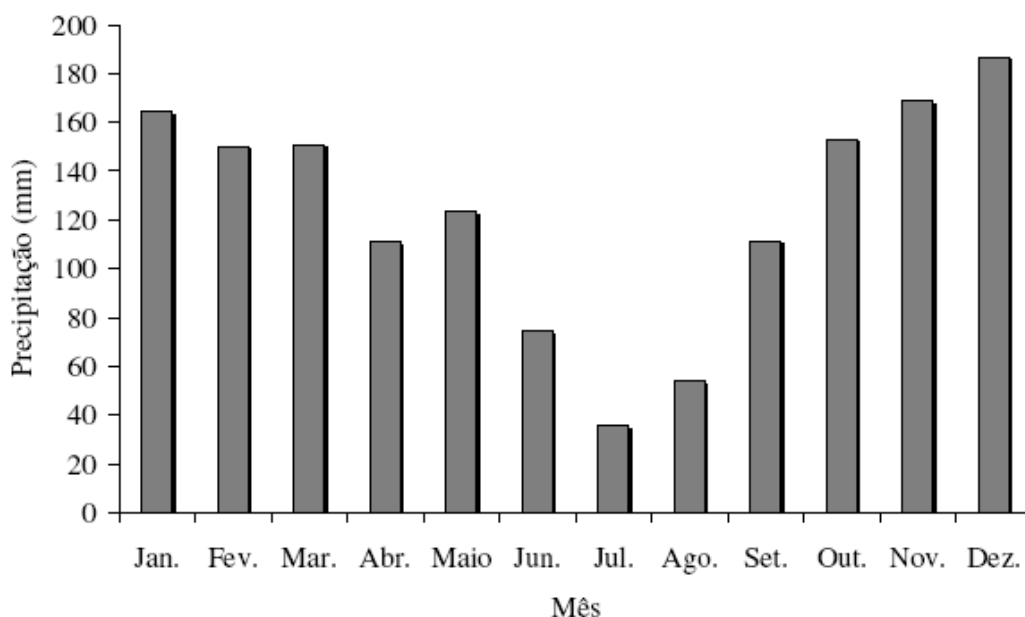


Figura 11: Precipitação média mensal na área de drenagem da Bacia do Rio Dourados, considerando o período de 1973 a 2002 (PEREIRA *et al.*, 2007).

Dando continuidade à descrição dos dados apresentados no trabalho de acordo com a Figura 12, que apresenta a vazão média mensal para a Bacia do Rio Dourados, é possível também observar a defasagem temporal entre a precipitação e a vazão escoada no rio. De acordo com os autores verifica-se que, enquanto a precipitação começa a aumentar em agosto, o aumento nas vazões médias mensais somente começa a ser percebido a partir de setembro. Assim, as precipitações ocorridas nesse período são, em sua maioria, convertidas em aumento da umidade do solo e em evapotranspiração real, a qual, durante o período mais seco, permanece com valores abaixo da evapotranspiração de referência em virtude da restrição decorrente da baixa umidade do solo (PEREIRA *et al.*, 2007).

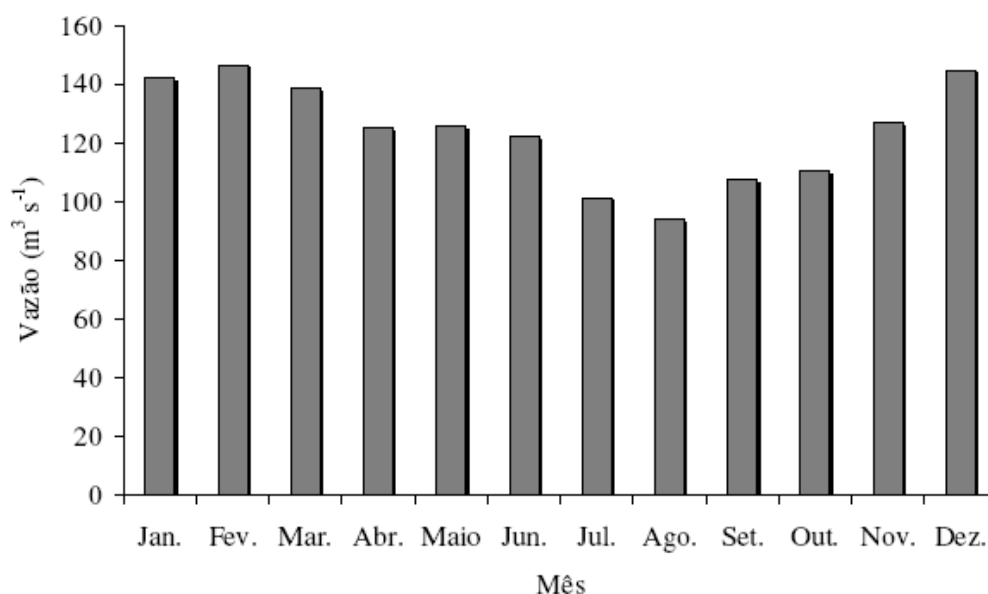


Figura 12: Vazão média mensal na área de drenagem da Bacia do Rio Dourados, considerando o período de 1973 a 2002. (PEREIRA *et al.*, 2007).

A vazão média mensal, para a Bacia do Rio Dourados, segundo Pereira *et al.* (2007) variou de $93,5 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ (agosto) a $146,5 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ (fevereiro), sendo a vazão média anual de $123,4 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$. A vazão específica média de longa duração foi de $13,9 \text{ L s}^{-1} \text{ km}^{-2}$. Em novembro, dezembro e janeiro, meses com as maiores precipitações pluviométricas, as vazões são superiores às encontradas em fevereiro, mês no qual, devido à elevada umidade do solo e à grande recarga do lençol freático advindos das precipitações anteriores, há maior contribuição do escoamento subterrâneo e, principalmente, maior propensão para a ocorrência do escoamento superficial (PEREIRA *et al.*, 2007).

2 Objetivos

Considerando que o Brasil é um dos maiores produtores de soja do mundo; que as plantações de soja estão predominantemente concentradas em áreas de rica rede hidrológica; que as isoflavonas apresentam atividade estrogênica e que por suas características físicas e químicas são solúveis em água. Este trabalho teve como objetivo geral contribuir para a investigação da ocorrência de isoflavonas de soja em águas naturais de regiões próximas as plantações desta cultura e inferir os possíveis impactos ambientais desta ocorrência. Como objetivos específicos destacam-se:

- Realizar o estudo qualitativo do perfil químico da palha de soja para saber se as isoflavonas estão presentes na palha. Realizar também análises quantitativas da palha para saber se as concentrações de isoflavonas encontradas são relevantes.
- Otimizar e validar método para análise de isoflavonas de soja em água de rio e sub-superficial.
- Aplicar o método validado na avaliação da ocorrência destas moléculas no Rio Dourados (MS) em trechos sob a influência das plantações de soja e a jusante e montante destes, investigando também a influência da sazonalidade.
- Aplicar o método validado na avaliação da ocorrência destas moléculas em água sub-superficial na região de Dourados (MS) em locais sob a influência direta das plantações de soja, avaliando também o efeito da sazonalidade.
- Avaliar a estrogenicidade das amostras coletadas, utilizando testes *in vitro* com levedura geneticamente modificada (Recombinant Yeast Assay).

3 Parte Experimental

Para maior clareza na leitura desta tese, o quadro a seguir sumariza as questões postuladas neste trabalho, os estudos efetuados e em que ítem estão detalhados.

Quadro 1: Estratégia experimental

Ítem	Questão	Estudo	Técnica / local
3.1.	As isoflavonas estão presentes na palha da soja que é deixada sobre o solo após a colheita? Estas isoflavonas persistem após a decomposição da palha? São solúveis em água, a partir da palha?	Análise qualitativa do extrato aquoso da palha da soja	LC-MS/MS – IDAEA/CSIC, Barcelona
3.2.	As concentrações encontradas na palha e no “lixiviado” são relevantes?	Análise quantitativa do extrato aquoso da palha da soja	LC-MS/MS – Laboratório (“show room”) da empresa Varian, São Paulo HPLC-DAD – Lab. Prof. Dr. Alberto Cavaleiro DQO-IQ/UNESP
3.3.	As isoflavonas de soja estão presentes no Rio Dourados e em água sub-superficial da região? Há influência da sazonalidade nesta ocorrência?	Otimização e validação de método para análise das isoflavonas em água de rio e sub-superficial	HPLC-UV Varian 920 – Lab. GRESCO
3.4.		Coleta e análise de amostras da região de Dourados em 4 períodos de acordo com a dinâmica de plantio da soja.	
3.5.	As amostras ambientais apresentam estrogenicidade?	Teste de estrogenicidade aplicado às amostras ambientais	RYA – Laboratório da Profa. Dra. Eliana Varanda (FCF/UNESP)

3.1 Análise qualitativa do extrato aquoso da palha da soja

A palha da soja proveniente do sistema de plantio direto (Figura 13a) utilizada foi obtida na região de Dourados (MS), proveniente da colheita de 2007. A palha estava depositada em uma pilha a céu aberto (Figura 13b) há cerca de 4 meses quando a amostra a ser analisada foi obtida. O material foi seco em estufa com aeração forçada, a 40 °C por 3 dias. Depois de seco foi moído e conservado em frasco de vidro tampado, a -20 °C até a extração.

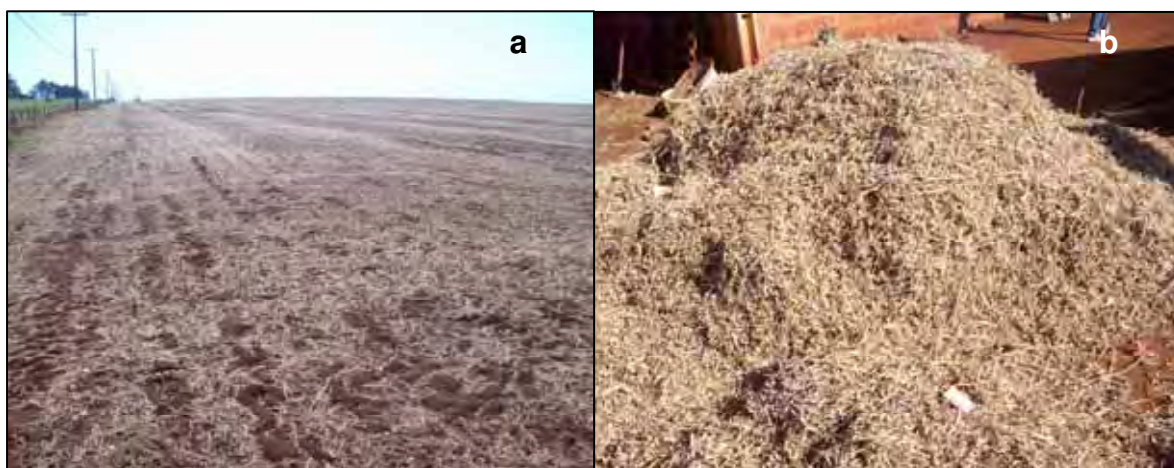


Figura 13: Sistema de plantio direto (a) e palha de soja em processo de decomposição (b).

3.1.1 Preparo do extrato

O material vegetal (100,00 g) foi extraído com 500 mL de água a 80 °C por 20 minutos. O sobrenadante obtido foi filtrado em papel de filtro e o extrato aquoso obtido da palha da soja foi liofilizado, obtendo-se 10,5 mg de extrato seco que foi pesado e solubilizado em 50,0 mL de acetonitrila/água (1:3, v/v), grau HPLC. Desse extrato foi retirado 1,0 mL sendo transferido para balão de 50,0 mL e completou-se o volume do balão com acetonitrila/água (1:3, v/v), obtendo-se uma solução contendo 4,2 µg mL⁻¹ do extrato para análise por LC-MS/MS.

3.1.2 Condições cromatográficas para o sistema LC-MS/MS

Estas análises foram efetuadas em um dos laboratórios do Departamento de Química Ambiental do Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua (IDAEA/CSIC), em Barcelona, pela Profa. Dra. Lourdes Campaner, do Departamento de Química Orgânica do IQ/UNESP.

Utilizou-se Cromatógrafo Líquido da Waters (Milford, MA, USA) 2695 equipado com uma coluna de fase reversa Xbridge C₁₈ 2,1 x 100 mm, 3,5 µm (Waters, Ireland) e pré-coluna, a temperatura do forno foi de 20 °C. Volume injetado: 20 µL, vazão: 0,7 mL min⁻¹. Foram utilizadas como fase móvel acetonitrila:água, condições do gradiente (Tabela 4).

Tabela 4: Gradiente utilizado nas análises do extrato aquoso da palha da soja e dos padrões de isoflavonas.

Tempo (min)	ACN (%)	H ₂ O (%)
0,00	5	95
0,10	5	95
5,00	27	73
15,0	100	0
20,0	100	0
25,0	5	95
30,0	5	95

A detecção foi realizada por um espectrômetro de massas, Micromass Quattro LC 4.0 (Manchester, UK) do tipo triplo quadrupolo, acoplado ao LC-Waters por uma interface electrospray Z-pray, operando em modo negativo. Para obtenção dos cromatogramas e espectros de massas utilizou-se Software MassLynx NT (versão 4.0).

Os parâmetros de operação instrumental para a aquisição dos dados foram: energia do capilar: 2,60 kV; temperatura da Fonte: 100 °C; temperatura de

desolvatação: 348 °C; fluxo de gás no cone: 23 L/h; fluxo de gás de desolvatação: 463 L/h; pressão de colisão na cela (mbar) $2,31 \times 10^{-3}$; as energias de colisões ótimas na escolha das transições para os experimentos que empregaram a técnica de *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) estão listadas na Tabela 9 p. 90.

3.2 Análise quantitativa dos fitoestrógenos na palha de soja

Nesta etapa do trabalho foram otimizadas as condições de análise, para daidzeína e genisteína e seus correspondentes glicosilados (daidzina e genistina) em dois sistemas cromatográficos: um LC-MS/MS (ESI, triplo quadrupolo) Varian 320MS e um HPLC-DAD, Varian ProStar.

A avaliação do perfil fitoquímico da palha da soja, foi utilizada para realizar a triagem dos marcadores de contaminação ambiental com potencial fitoestrogênico que foram monitorados posteriormente na água da Microbacia do Rio Dourados. Dos quatro fitoestrógenos escolhidos para dar início à triagem (Figura 14) dois pertencem à classe das agliconas e dois à classe dos glicosídeos. A escolha dos padrões se deve principalmente à presença destes na planta de soja (LUI *et al.*, 2003), a atividade biológica já descrita e também por serem os mais prováveis contaminantes das águas da microbacia em estudo, devido à solubilidade que apresentam em água.

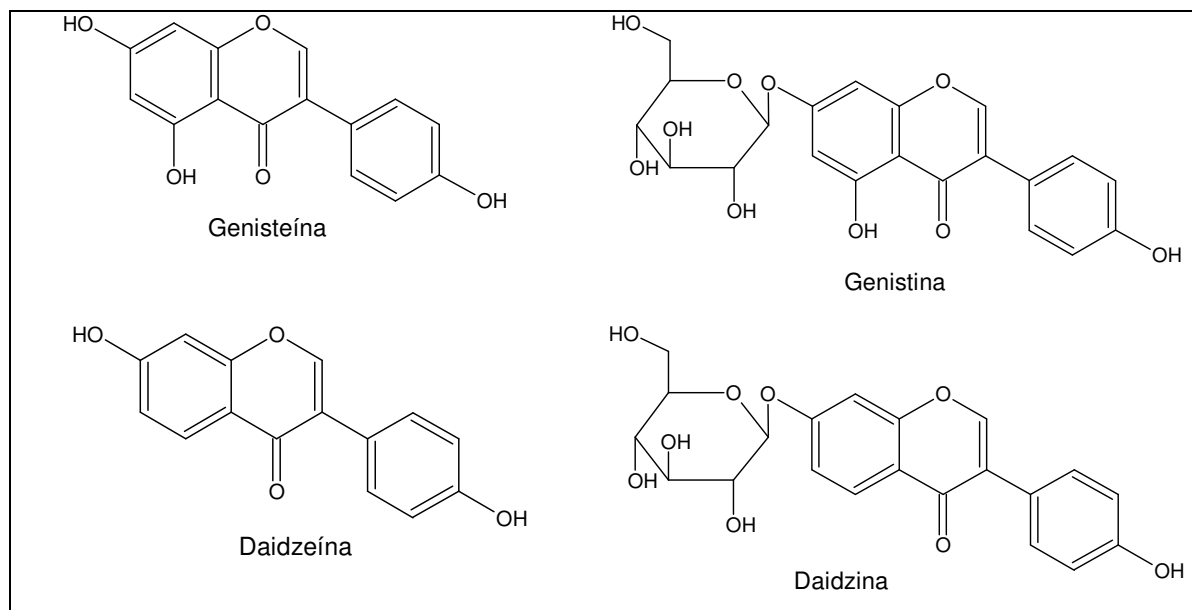


Figura 14: Isoflavonas estudadas. Genisteína e daidzeína (agliconas) e os outros dois glicosídeos, genistina e daidzina.

3.2.1 Preparo das soluções padrão

Os padrões com alto grau de pureza (>98%) foram obtidos da Sigma Aldrich (USA). As soluções estoque individuais dos fitoestrógenos foram preparadas pela dissolução de cada substância em metanol. Mediu-se 0,0010 g de cada substância e solubilizou-se, individualmente em 10,0 mL de solução obtendo-se uma solução estoque com concentração final de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. As misturas padrão foram preparadas por diluições adequadas para análise em LC-MS/MS TQ e HPLC-UV/DAD em concentrações de (1, 5; 10; 25; 100 e 200 ng mL^{-1}) e (0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10 e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$) respectivamente.

3.2.2 Condições cromatográficas

Como as análises foram realizadas em sistemas cromatográficos distintos, com colunas de dimensões distintas, foram estabelecidas duas condições de gradiente de separação desses fitoestrógenos, utilizando-se ACN/H₂O como fase

móvel, conforme apresentado na Tabela 5, juntamente com os demais parâmetros de cada um dos equipamentos.

Tabela 5: Condições cromatográficas otimizadas

	HPLC – UV/DAD Varian Pro Star	LC-ESI-MS/MS Varian 320MS TQ
Coluna	C18 (Phenomenex, 4,6 mm x 250 mm x 5 µm)	C18 (Varian, 3 µm 150 x 4.6 mm) (Pursuit XRs)
Fase Móvel	ACN/H ₂ O 30% a 65% ACN (10 min), e de 65% a 100 % de ACN em 5 min e vazão 1 mL min ⁻¹	ACN/H ₂ O 10% a 65% ACN (10 min.), e de 65% a 100 % de ACN em 5 min e vazão 300 µL min ⁻¹
Volume de injeção	20 µL (injeção automática)	10 µL (injeção automática)
Deteção	200 a 400 nm	Modo negativo As transições monitoradas foram: genisteína (<i>m/z</i> 268,6 >132,7) daidzeína (<i>m/z</i> 252,4 >207,6) genistina (<i>m/z</i> 431,2 > 267,7) daidzina (<i>m/z</i> 415 > 251,6)

3.2.3 Avaliação do desempenho de cada sistema cromatográfico

O estudo para avaliação do desempenho dos sistemas cromatográficos foi realizado utilizando a análise de soluções-padrão dos analitos de interesse em uma série de concentrações, sendo cada concentração analisada em triplicata.

Neste trabalho os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estabelecidos utilizando o teste de Huber. O diferencial desse método consiste na eliminação de valores discrepantes (*outliers*). Para rejeitar dados anômalos com base no intervalo de linearidade, para a realização do teste de Huber, é necessário: estabelecer um valor central (mediana), estabelecer intervalos de confiança com valores superiores e inferiores a mediana que definam quais os dados são aceitáveis – isto é, os que pertencem a esse intervalo de confiança. Por definição o primeiro valor que se situar fora do intervalo de confiança é considerado o limite de detecção

e o primeiro valor após este, representa o limite de quantificação. Esse teste evita a subjetividade visual e apresenta como vantagens a aplicação de parâmetros mais confiáveis para a determinação dos LD e LQ (VALENTE, 2006).

3.2.4 Preparo do extrato

A palha de soja foi obtida na região de Dourados (MS), tratando-se do mesmo material que fora utilizado na análise qualitativa, porém a diferença está no método de extração, pois nesta fase a informação mais importante para o estudo era saber qual é a concentração real das isoflavonas no material e, para isso o sistema de extração ACN/H₂O foi a melhor opção, pois apresentava melhor seletividade e maior grau de recuperação.

Para obtenção da amostra analisada foram tomadas sub-amostras em diversos pontos da pilha de palha de soja, que foram posteriormente misturados e do qual se retirou uma amostra de cerca de 3 kg. Este material foi seco em estufa a 40 °C por 3 dias. Depois de seco foi moído e conservado em frasco de vidro, a -20 °C, até a extração.

O método utilizado para extração baseou-se no procedimento desenvolvido por Nehme (2001). Este método consiste no preparo do extrato do material vegetal por extração sólido-líquido (Figura 15). Utilizou-se 200 mg da amostra que foi extraída com 3,0 mL de hexano por 30 minutos em banho de ultrassom e em seguida adiciona-se 3,0 mL de solução de ACN/H₂O (1:1) mantendo-se o sistema em ultrassom por mais 30 minutos. Na seqüência, o tubo contendo amostra e extratores foi centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos e uma alíquota de 2,0 mL de solução da ACN/H₂O (1:1) (fase inferior) foi retirada, filtrada e analisada por LC-ESI-MS/MS.

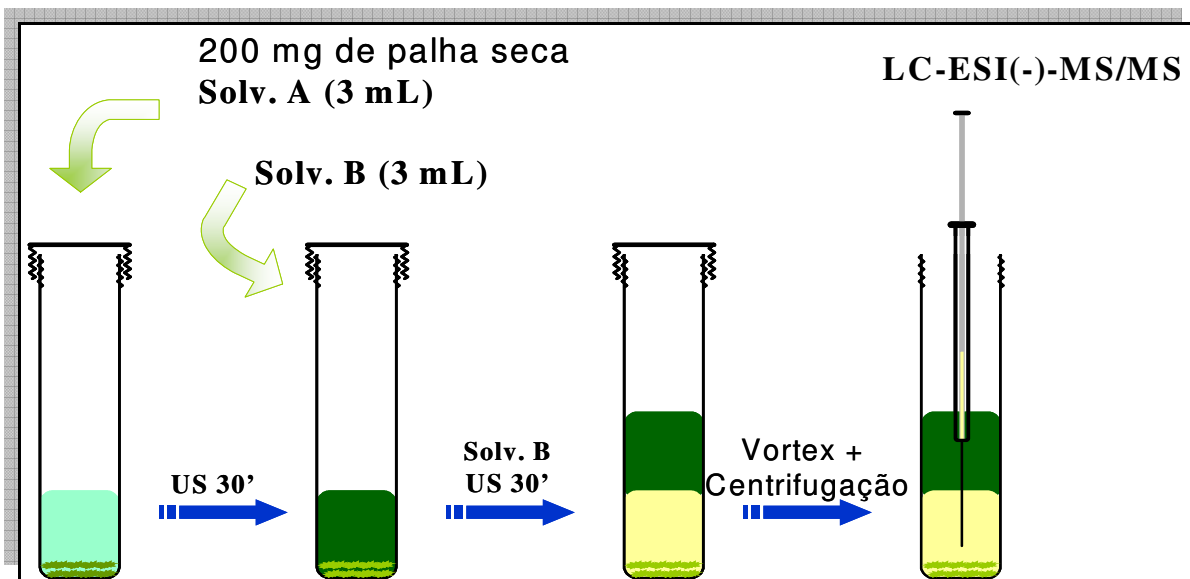


Figura 15: Sistema de extração da palha da soja. **Solvente A: Hexano**, US: Ultrassom, **solvente B: ACN:/H₂O (1:1)**. Método baseado na proposta de Nehme (2001).

3.3 Otimização e validação de método para análise das isoflavonas em água de rio e sub-superficial

Considerando que as concentrações esperadas para fitoestrógenos nas amostras ambientais deveriam ser bastante baixas e que a partir desta etapa do trabalho estava disponível no laboratório de pesquisa (GRESKO) um novo sistema HPLC-UV (Varian LC 920), toda a validação do método de análise foi efetuada utilizando este sistema cromatográfico. Para avaliação do desempenho deste método analítico foram preparadas novas soluções padrão, com concentrações mais baixas e contendo apenas genisteína e daidzeína, identificadas como as mais abundantes no extrato aquoso da palha de soja.

3.3.1 Preparo das soluções padrão

As soluções estoque individuais dos fitoestrógenos foram preparadas pela dissolução de cada substância em MeOH. Mediou-se 0,0010 g de cada substância e solubilizou-se, individualmente em 10,0 mL de solvente obtendo-se uma solução

estoque com concentração final de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções padrão de trabalho, contendo os dois analitos, foram preparadas por diluições adequadas das soluções estoque, sendo obtidas soluções nas concentrações de: 0,01; 0,02; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 5; 10 e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$

3.3.2 Condições cromatográficas para o sistema HPLC-UV Varian LC 920

As condições cromatográficas foram adaptadas do sistema (HPLC-DAD, Varian ProStar) para o (HPLC-UV, Varian LC920), sendo feitas algumas modificações no gradiente devido a troca de solventes, ao menor comprimento da coluna em uso e objetivando também mantê-la limpa para a perfeita realização da análise posterior. A troca do sistema eluente foi efetuada também por questões de custo, pois o valor da ACN se encontrava em um patamar elevado. Uma comparação entre as condições utilizadas está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6: Condições cromatográficas para os sistemas HPLC utilizados

	HPLC-UV-DAD Varian Pro Star	HPLC-UV Varian LC 920
Coluna	C18 (Phenomenex, 4,6 mm x 250 mm x 5 μm).	C18 (Phenomenex, 4,6 mm x 150 mm x 5 μm).
Fase Móvel	ACN/H ₂ O com 0,1 % de ácido acético seguindo programação 10 a 65% ACN (10 min.). De 65% a 100% ACN até 15 min. Vazão 1 mL min^{-1}	MeOH/H ₂ O com 0,1% de ácido acético seguindo a programação 35 a 65% de MeOH até 10 min. De 65% a 100% MeOH até 15 min. Vazão 1 mL min^{-1}
Volume de injeção	20 μL (injeção automática)	20 μL (injeção automática)
Deteção	200 a 400 nm	249, 260, 280 nm

3.3.3 Estudo de recuperação – água superficial enriquecida com os padrões

Para otimização e validação do método utilizou-se água de rio coletada na entrada da Estação de Tratamento de Água (ETA) de Araraquara.

As amostras foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar de 4 litros, no decorrer do transporte não foi mantida em refrigeração devido ao tempo de coleta até chegar ao laboratório ser muito pequeno, em torno de 10 minutos.

Inicialmente, para escolha da melhor condição de pré-concentração e *clean up*, utilizando-se SPE, uma alíquota de 1000 mL da amostra foi fortificada com 350 µL de solução padrão de genisteína e daidzeína, nas concentrações de 0,25; 5,0 e 10 µg mL⁻¹ sendo preparadas 3 amostras fortificadas para cada concentração e condição testadas. Também foram avaliados o branco (solvente de eluição ACN:MeOH 50:50) e testemunha (amostra de água sem adição de padrões) . Após adição do padrão agitou-se a amostra manualmente, para homogeneização. A amostra fortificada foi deixada em repouso sob refrigeração por cerca de 6 horas, após este período procedeu-se a extração dos analitos.

Devido à presença de material particulado (MP) em suspensão em águas naturais, a primeira etapa no preparo, após a realização da fortificação da amostra, foi a filtração para retirada deste MP, o que foi efetuado utilizando-se um conjunto de filtração com membrana de 0,45 µm de poro, Φ 47 (Schleicher & Schuell). Após a filtração, na extração em fase sólida, foram utilizados dois tipos de sorventes: C18 (Accubond, Baker, 500 mg) e poliestireno-divinilbenzeno-pirrolidona (Strata X, Phenomenex, 200 mg). Para maior controle na vazão durante a SPE, utilizou-se um sistema para eluição a vácuo (manifold) de 19 pontos (Waters). As triplicatas foram sempre feitas em paralelo.

As amostras de água em triplicatas (1000 mL) foram eluídas nos cartuchos de C18 e Strata X (com e sem adição de ácido acético), previamente condicionados. As condições utilizadas foram baseadas na literatura (ROSTAGNO *et al.*, 2005; KANG *et al.*, 2006) e estão explicitadas na Tabela 7.

Tabela 7: Condições de condicionamento e extração com a amostra acidificada.

	C18 (ACCUBOND C-18, Baker, 500 mg/6mL)	Strata-X (Phenomenex, 200 mg/ 6mL)
Condicionamento	10 mL MeOH	3 mL MeOH
Equilíbrio	10 mL água	3 mL água
Aplicação da amostra	1000 mL*	1000 mL*
Limpeza	10 mL MeOH/H ₂ O (5:95)	3 mL MeOH/H ₂ O (10:90)
Secagem a vácuo	2 min.	2 min.
Eluição	6 mL ACN/MeOH (50:50)	6 mL ACN/MeOH (50:50)
Secagem e Ressuspensão	Secagem com N ₂	Ressuspensão no volume final de 350 µL de MeOH

*O desempenho do método de extração foi avaliado com a amostra sem acidificação (pH ~7) e acidificada a pH 3 com ácido acético. As etapas de secagem e ressuspensão foram aplicadas em seqüência a ambos os cartuchos.

Todo o processo foi acompanhado por amostras testemunha (água superficial sem adição dos analitos) e brancos (solventes passados pelo cartucho, sem amostra), sempre em triplicata.

O método otimizado para a genisteína e daidzeína foi posteriormente aplicado para mais cinco isoflavonas: genistina, daidzina, equol, formononetina e biochanina-A. As sete isoflavonas foram adicionadas à água de rio em concentrações de 10,5, 350, 1750, 3500 ng L⁻¹, permitindo a ampliação da faixa de aplicabilidade do método, tanto em termos de concentrações quanto ao número de isoflavonas. Todos os parâmetros de validação foram contemplados de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003)

3.3.4 Estudo da estabilidade da amostra

Seguindo o mesmo procedimento descrito no estudo de recuperação, utilizou-se um volume de 1000 mL de amostra enriquecida pela adição de 350 µL de padrões nas concentrações de 0,02, 0,1, 0,5 e 1,0 µg mL⁻¹, para obtenção de amostras em concentrações similares às reportadas na literatura (ERBS *et al.*, 2007).

Esse processo foi acompanhado de uma amostra testemunha, (sem a fortificação) e de um branco (eluição de um cartucho Strata X condicionado).

As amostras passadas pelo cartucho Strata X foram devidamente armazenadas a -20 °C, eluídas e analisadas em diferentes intervalos de tempo (0, 3 e 15 dias) para que pudesse ser avaliada a conservação das mesmas, num período de tempo semelhante à realidade da coleta de amostras de água no Rio Dourados.

3.4. Estudo ambiental

3.4.1 Pontos de amostragem

Os dados de vazão do Rio Dourados, pluviosidade da região apresentados na parte introdutória deste trabalho, orientaram a estratégia de amostragem adotada. Também foram levadas em consideração as épocas de plantio e colheita da soja, tempo suficiente para que houvesse a completa degradação do material vegetal (palha da soja). A área de amostragem também foi definida por critérios logísticos (acessibilidade e permissão) e pela proximidade das plantações de soja. Outra ferramenta muito útil foi o *software Google Earth™* para localizar os pontos mais relevantes a serem estudados, como se pode visualizar na Figura 16.

As amostras de água foram coletadas nos meses de abril, agosto e dezembro de 2009 e abril de 2010 totalizando 108 amostras divididas em quatro diferentes sítios de coleta (Figuras 16 a 19), os locais de coleta estão identificados na Tabela 8.

Tabela 8: Identificação dos pontos de coleta de amostras de água e sua correspondência nas Figuras 16 a 18

Código do ponto amostral	Coordenadas geográficas*	Figura onde está representado
Antes da plantação AAQ – próximo à margem AAE – afastado da margem	S 22° 23' 753 W 54° 48' 210	Figuras 16 e 17
Plantação PAQ – próximo à margem PAE – afastado da margem	S 22° 23' 814 W 54° 48' 221	
Depois da plantação DAQ – próximo à margem DAE – afastado da margem	S 22° 23' 897 W 54° 47' 564	
Água sub-superficial (Fazenda UFGD)	S 22° 14' 234 W 54° 59' 224	Figuras 16 e 18

*Determinadas pelo uso de um equipamento GPS, marca Garmim, modelo GPS 12 *chanel*.



Figura 16: Visão geral e ampliada de todos os sítios de amostragem. O ponto A é correspondente à fazenda da UFGD, ponto de afloramento do lençol freático, e o ponto B aos pontos de coleta no Rio Dourados.



Figura 17: Local da realização das coletas de amostras de água, nos pontos do Rio Dourados (ponto B).



Figura 18: Local da realização da coleta de amostras de água de afloramento do lençol freático na fazenda da UFGD (ponto A).



Figura 19: Fotos dos sítios de coleta de amostras.

3.4.2 Preparo das amostras ambientais

As amostras foram preparadas de acordo com o método otimizado e validado (Figura 20). No entanto, para agilizar o tratamento das amostras foi desenvolvido, pelo doutorando, um dispositivo que permite a extração por SPE de 20 amostras ao mesmo tempo (Figura 21). O uso deste dispositivo permitiu a economia de cerca de cinco dias de trabalho no processamento inicial das amostras.

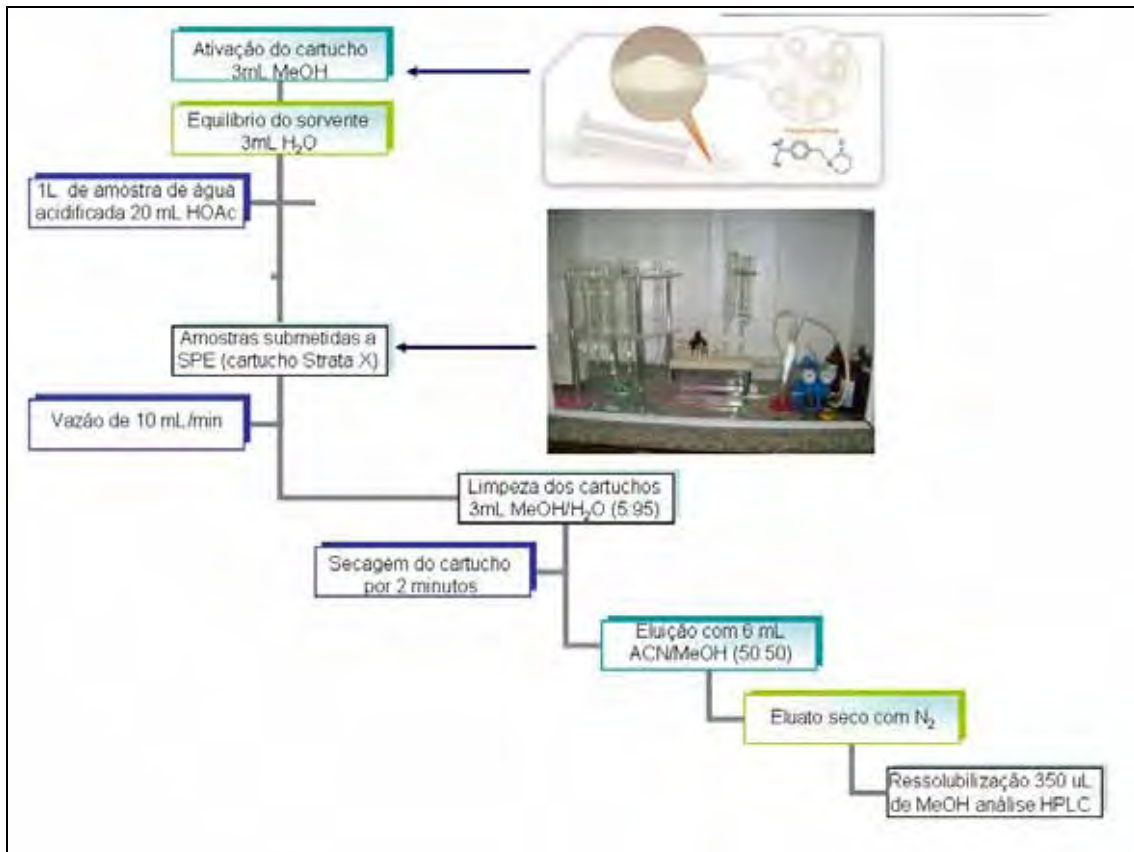


Figura 20: Procedimento utilizado na extração das amostras de água de rio.



Figura 21: Suporte desenvolvido para a utilização completa do *Manifold*.

3.5 Testes de estrogenicidade - RYA (*Recombinant Yeast Assay*)

Os testes foram realizados no laboratório de genética da Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda da Faculdade de Farmácia da UNESP – Araraquara.

O procedimento consistiu no uso de levedura, da linhagem BY4741, transformada com os plasmídeos pH5HEO e pVITB2x. A levedura foi descongelada do estoque à 70 °C e crescida a 30 °C, por 2-3 dias, em meio mínimo SD (base nitrogenada sem aminoácidos 6,0 g L⁻¹, glicose 20 g L⁻¹) com ausência de uracila e leucina (-Ura-Leu) suplementado dos aminoácidos prototróficos necessários (0,1 g L⁻¹ de histidina e metionina). A seguir, as leveduras foram crescidas em meio rico YPD (extrato de levedura 5 g L⁻¹, peptona 10 g L⁻¹ e glicose 20 g L⁻¹) por mais 1-2 dias. Então, 10 µL dessa cultura foi inoculada em 30 mL de meio mínimo, o qual foi incubado a 30 °C até atingir D.O._{600nm} = 0,1. As amostras foram dissolvidas em metanol e colocadas em microplacas de 96 orifícios (*wells*). As concentrações foram determinadas em ensaios preliminares, além do controle negativo (solvente da amostra), positivo (10 nM de 17 β-estradiol/ *well*) e dos controles de toxicidade. Em cada *well* foi adicionado 50 µL da cultura de leveduras descritas anteriormente. Após isso, a microplaca foi incubada por 6 horas a 30 °C com agitação. Decorrido esse período, 50 µL de tampão de lise (Y-PER, Pierce, Rockford, USA) foram adicionados a cada orifício e a microplaca foi novamente incubada na mesma temperatura por mais 30 minutos. A seguir, foram adicionados 50 µL de tampão suplementado com 0,1% de mercaptoetanol e 0,5% da solução de 4-metilumbeliferona β-D-galactopiranosídeo (MuGal). Após breve centrifugação a 1000 rpm, as microplacas foram lidas em espectrofotômetro (355 nm de excitação e 460 nm de emissão). A fluorescência foi medida durante 15-20 minutos (uma medida por minuto) e os valores da atividade da β-galactosidase foi avaliada pelo aumento das unidades de

fluorescência em relação ao tempo, usando o método de regressão linear padrão. Este ensaio quantifica a atividade estrogênica, a qual é calculada como equivalentes de estradiol (EEQ), ou seja, a quantidade necessária de estradiol para produzir uma resposta semelhante a da amostra avaliada. Os valores de fluorescência obtidos foram ajustados através da equação HILL pelo método não linear como descrito por Quirós *et al.* (2005) e Noguerol *et al.* (2006).

3.6 Avaliação estatística dos dados

Devido à existência de diferentes fatores que influenciam a dispersão das isoflavonas no meio ambiente, análises multivariadas, indicadas para dados não paramétricos, análise de fatores utilizando componentes principais com rotação varimax normalizada, e agrupamento hierárquico (HCA), foram aplicados nas amostras estudadas, visando desenvolver um estudo de caracterização das variáveis indicativas da relação entre a dispersão dos contaminantes, atividade estrogênica e sazonalidade (levando em conta períodos secos e chuvosos).

Para interpretação dos dados, utilizando HCA e PCA com rotação varimax normalizada foram geradas matrizes de dados 108 x 7 (onde as linhas são as amostras, pontos de coleta e período do ano e as colunas as variáveis, as isoflavonas). O estudo em conjunto da influência dos fatores climáticos na dispersão das isoflavonas gerou uma matriz de 108 x 10. Quando se adicionou as variáveis os dados de estrogenicidade (RYA) das mesmas obteve-se uma matriz de 108 x 8. Como as variáveis utilizadas não possuem a mesma escala, foi necessário escalonar os dados através do método *Z-Score*, conforme a Equação 1:

$$Z = \frac{X - X_m}{\sigma}$$

onde: Z é o valor padronizado da variável, X é o valor inicialmente encontrado da variável para cada amostra, X_m é o valor médio da variável e σ é o desvio padrão da variável na amostra. Foi utilizada a técnica de análise de cluster que se baseia na partição de uma população heterogênea em vários grupos homogêneos. No agrupamento não há classes pré-definidas, os elementos são agrupados de acordo com a semelhança. A medida de similaridade usada foi a distância Euclidiana quadrática no caso das comparações de concentrações das isoflavonas e o percentual de discordância no caso do estudo da sazonalidade (período chuvoso e seco), em ambos os estudos o método hierárquico aglomerativo usado foi o método de ligação de Ward.

A análise em componentes principais foi utilizada para obter uma transformação mais representativa e compacta das observações. Os componentes são individualmente responsáveis pela variância dos dados. Geralmente a maior parte da variância pode ser explicada por um número reduzido de componentes, sendo possível o descarte do restante sem perda significativa de informação. A partir da PCA puderam ser extraídos os autovalores e os autovetores da matriz de covariância do grupo de variáveis originais por rotação varimax.

Todas as operações matemáticas e estatísticas foram realizadas com auxílio dos programas (Statistica 15.0) e Excel 2003 e 2007.

4 Resultados e discussão:

4.1 Estudo do perfil químico da palha da soja

Os espectros de massas (injeção direta) no modo negativo dos padrões da daidzeína, daidzina, genisteína, genistina mostraram as moléculas desprotonadas $[M-H]^-$, com a razão massa carga em m/z 253, 415, 269 e 431 Da respectivamente (Figura 22).

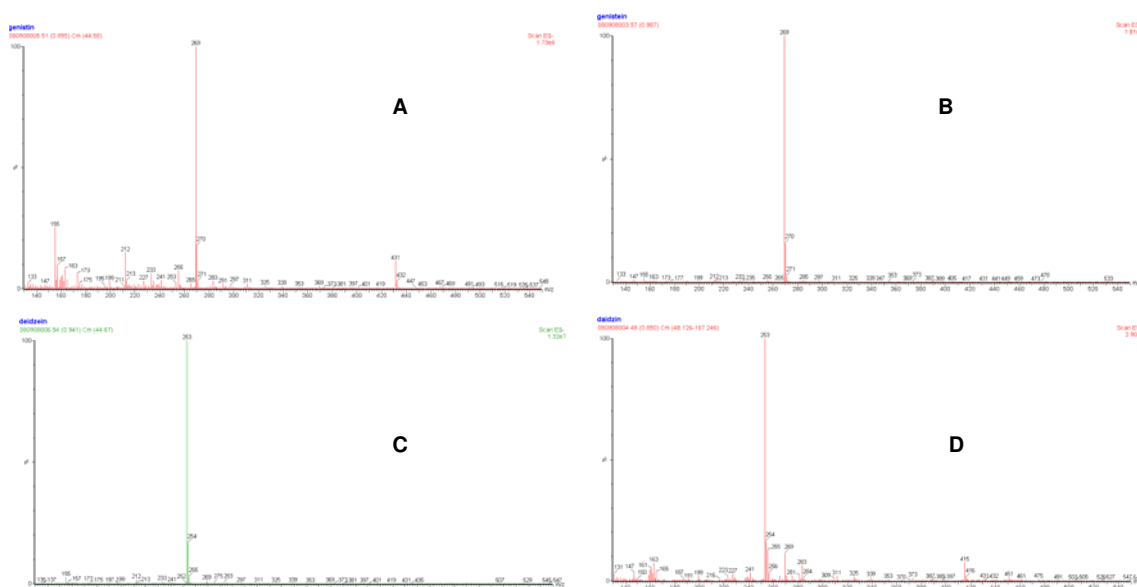


Figura 22: Espectros de Massas em *full-Scan* para os padrões de: (A) Genistina, (B) Genisteina, (C) Daidzeina, (D) Daidzina. (**Ampliação, apêndice A, p. 180 e 181**)

A partir dos íons precursores de cada um dos padrões de isoflavonas, foram realizados estudos de fragmentação para se obter o seu padrão de quebra. Cada isoflavona apresentou um padrão de quebra característico e aqueles íons mais abundantes foram escolhidos e utilizados no monitoramento desses analitos na matriz estudada com o auxílio da técnica de MRM (*Multiple-Reaction-Monitoring*).

Para avaliar o potencial de caracterização da técnica, os padrões foram injetados em mistura no sistema LC-MS/MS (Figura 23 A). Mesmo estando em mistura e com tempos de retenção próximos, a técnica de MRM foi capaz de separar

seletivamente cada um dos padrões e indicar o tempo de retenção exato após eluição da coluna cromatográfica.

A partir do cromatograma de íons totais TIC (Figura 23 A) pôde-se realizar a extração dos íons investigados pela técnica de MRM e estes são indicados nos cromatogramas de íons extraídos para cada transição: (B) Daidzina: 415>253, (C) Daidzeína: 252>208, (D) Genisteína: 269>133 e (E) Genistina: 431>269 (Figura 23).

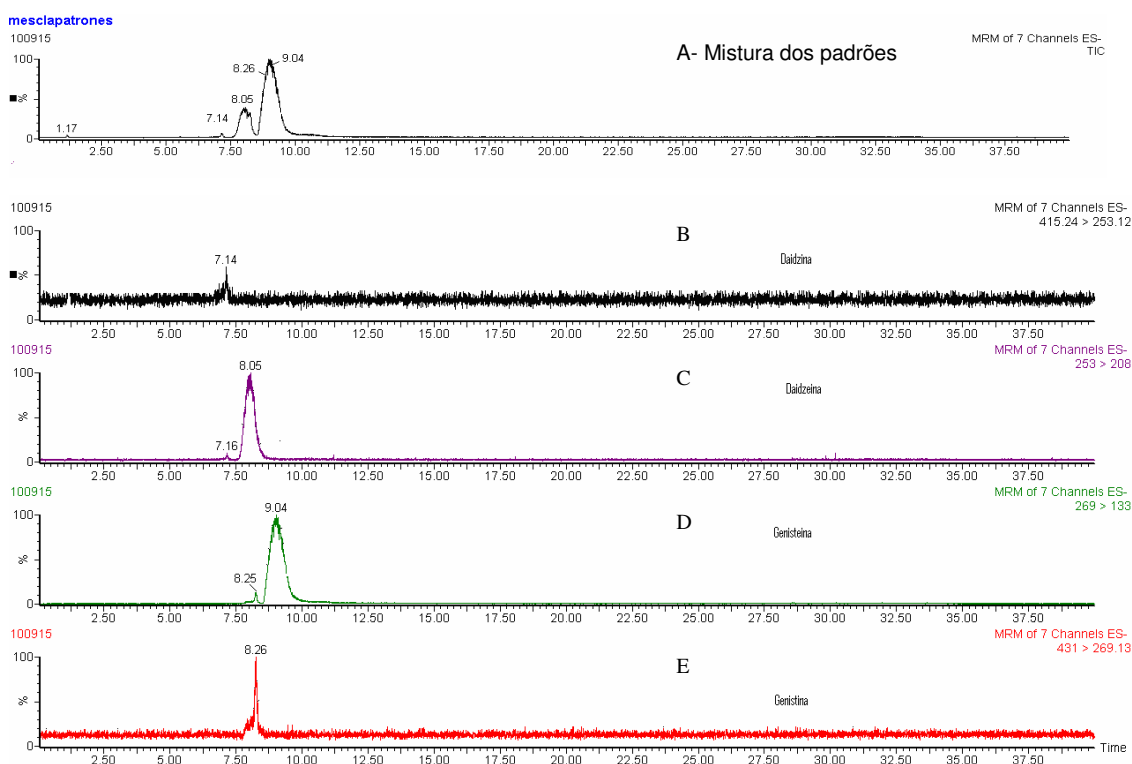


Figura 23: (A) cromatograma de íons totais (TIC) e cromatogramas dos íons extraídos do TIC, adquiridos com a técnica de MRM. Os valores indicados nos picos cromatográficos ilustram os tempos de retenção dos padrões (B-E).

Depois de otimizadas as condições cromatográficas e os parâmetros de aquisição das isoflavonas por espectrometria de massas, o extrato aquoso da palha da soja foi submetido à análise utilizando os mesmos parâmetros.

A Figura 24 A ilustra o cromatograma de íons totais obtido para o extrato aquoso da palha da soja, evidenciando a alta complexidade da matriz. A partir da extração dos íons característicos de cada uma das isoflavonas estudadas foi possível identificá-las na matriz original. Os cromatogramas dos íons extraídos para

a (B) Genistina: 431>269, (C) Genisteína: 269>133, (D) Daidzeína: 252>208 podem ser vistos na Figura 24. A isoflavona daidzina não foi detectada na matriz investigada.

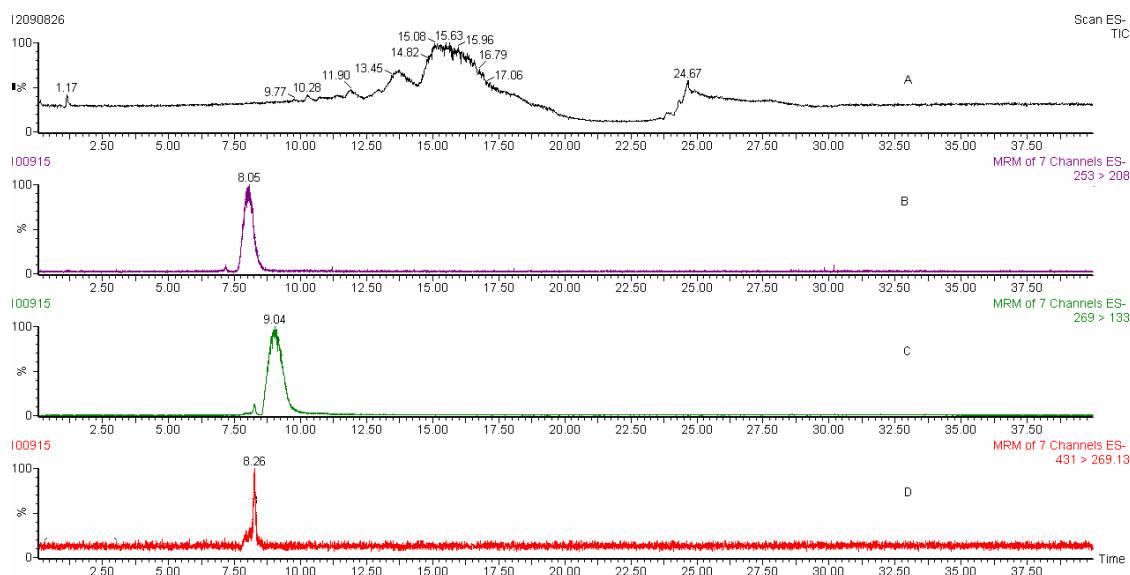


Figura 24: (A) Cromatograma (TIC) do extrato aquoso da palha da soja; cromatogramas dos íons extraídos (MRM) para a: (B) Daidzeína: 252>208; (C) Genisteína: 269>133; e (D) Genistina 431>269.

Além das isoflavonas identificadas com a técnica MRM (Figura 24), tentou-se identificar outras substâncias presentes no extrato aquoso da palha da soja.

Durante esta abordagem foi realizada a aquisição do perfil químico de todos os íons presentes na matriz, de forma que o extrato aquoso fosse injetado diretamente na interface ESI com auxílio de um injetor automático.

O perfil da composição química do extrato aquoso da palha da soja foi adquirido em modo negativo com baixa energia de ionização da fonte ESI (1.5 kV), em modo *full-scan* (Figura 25 A) e no intervalo de 100 -1000 unidades de *m/z*. A partir destas condições obteve-se o espectro de massas que representa a real composição química da matriz investigada, sendo possível verificar a presença de diversos íons que indicam uma variedade significativa de outras substâncias (Figura 25 B).

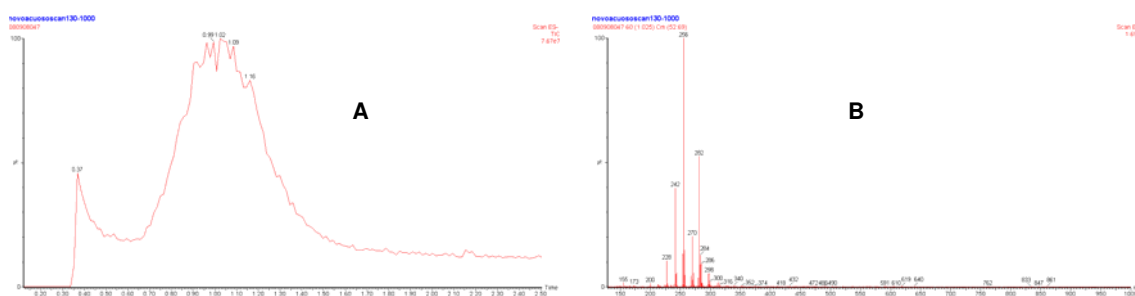


Figura 25: Perfil injeção direta: (A) TIC do extrato aquoso da palha da soja; (B) Espectro de massas obtido por injeção direta do extrato aquoso da palha da soja e adquirido em modo negativo e em *full-scan*. (**Ampliação, apêndice B, p. 182**)

Uma vez obtido o espectro de massas do extrato aquoso da palha da soja e após a identificação das isoflavonas daidzeína, genisteína, genistina, realizou-se na seqüência análises por LC/MS em *full-scan* (Figura 26) para comprovar a presença dos íons visualizados durante a aquisição do espectro de massas da matriz (Figura 25) e verificar a ordem de eluição dessas substâncias ao longo da corrida cromatográfica.

Uma vez traçado o perfil do extrato aquoso da palha da soja e dos padrões das isoflavonas daidzeína, daidzina, genisteína, genistina, realizou-se a seguir a análise por LC/MS em *Full-Scan* (Figura 26) dos principais íons detectados no espectro da Figura 26 B. Como pode ser observado a Figura 26 B mostra que a isoflavona que apresenta íon monitorado em m/z 431 não está presente no extrato aquoso da palha da soja.

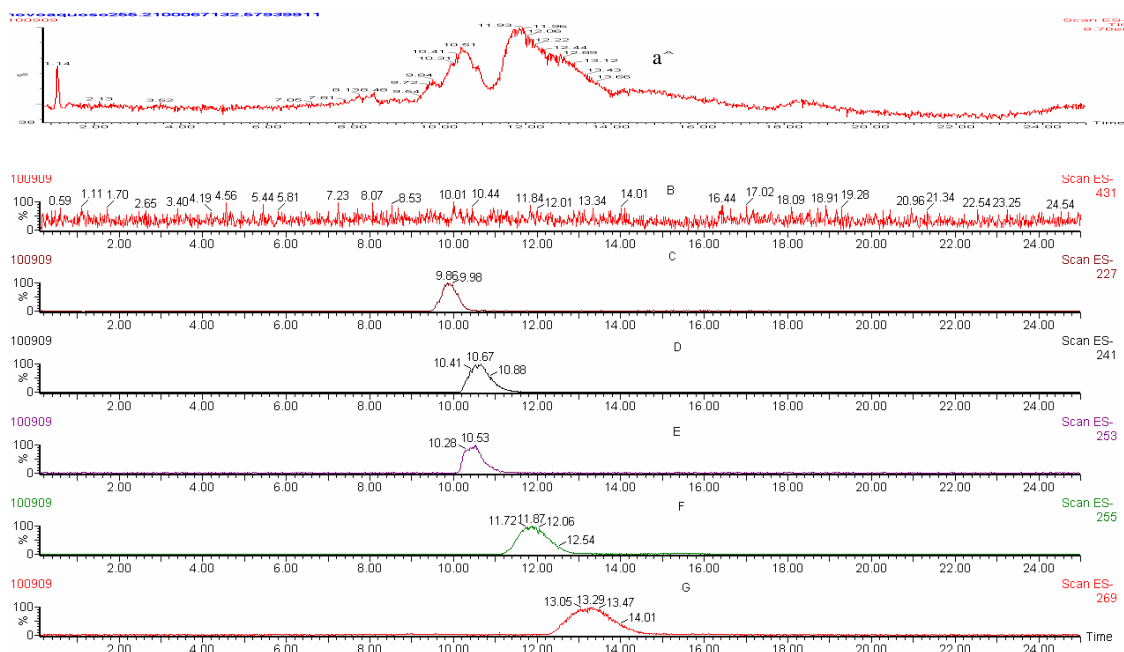


Figura 26: Cromatograma LC/MS dos íons monitorados das substâncias desconhecidas presentes no extrato aquoso da palha da soja: (A) TIC do extrato aquoso da palha da soja; *Scan-ES* dos íons monitorados: (B) 431, (C) 227, (D) 241. (E) 253, (F) 255, (G) 269.

A partir dos íons precursores de cada um dos íons monitorados, foram realizados estudos de fragmentação para se obter o seu padrão de clivagem. Como não existe na literatura estudo da composição química do extrato da palha da soja, optou-se pela escolha daqueles íons mais abundantes para o monitoramento desses analitos na matriz com o auxílio da técnica de MRM.

Os cromatogramas apresentando os canais dos íons extraídos (MRM) das substâncias desconhecidas, detectados no extrato aquoso da palha da soja, estão representados na Figura 27 e os espectros de massas obtidos da análise (MRM) desses íons na Figura 28.

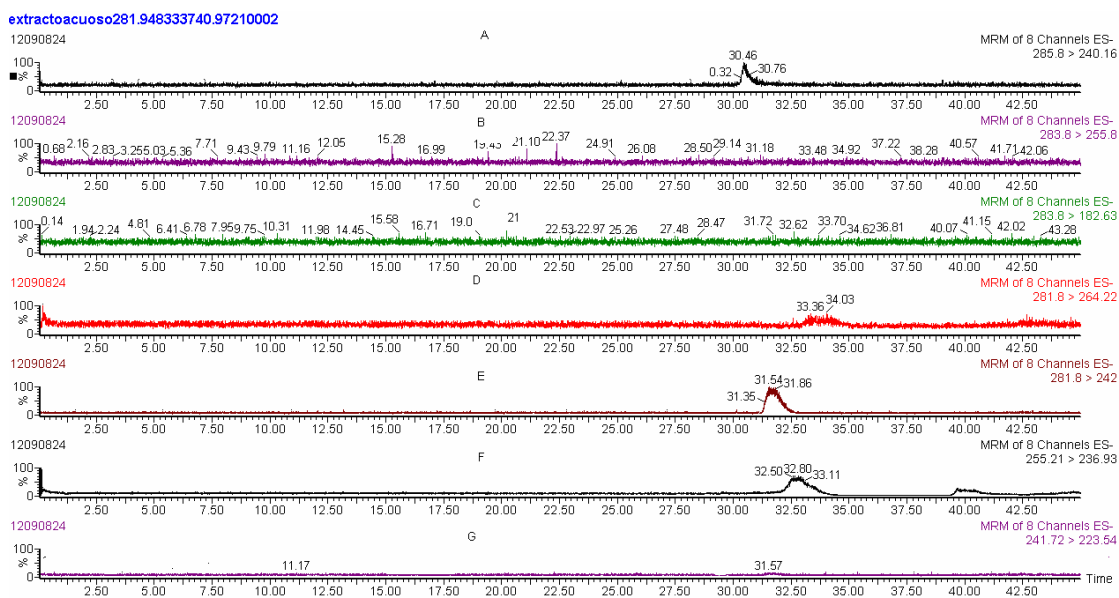


Figura 27: Cromatograma apresentando os canais dos íons extraídos (MRM) para as substâncias desconhecidas presentes no extrato aquoso da palha da soja.

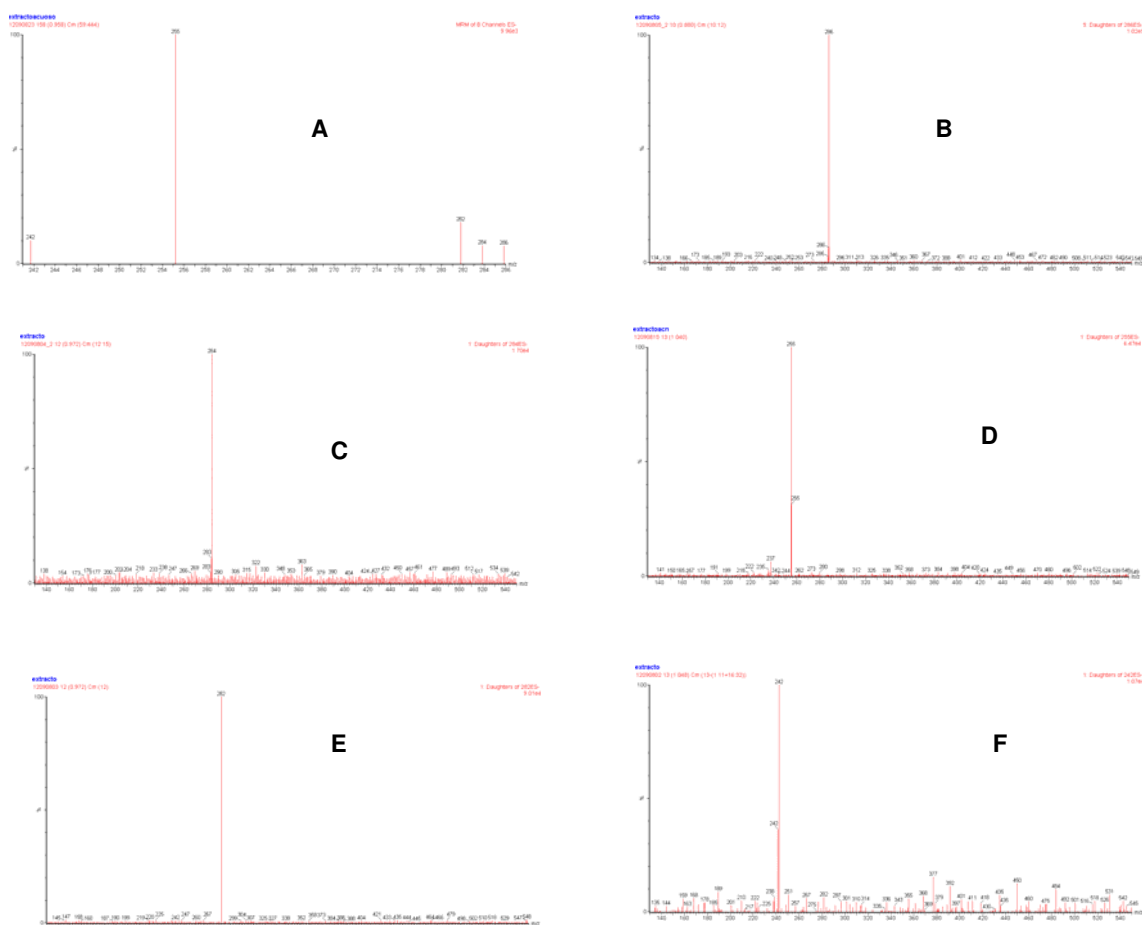


Figura 28: (A) Espectros de Massas *Full-Scan* dos íons detectados no extrato aquoso da palha da soja: (B) m/z 286; (C) m/z 284; (D) m/z 282; (E) m/z 255; (F) m/z 242 Da. (Ampliação, apêndice C, p. 183 e 184)

As análises de LC-MS/MS foram feitas em um espectrômetro de massas que empregava fonte de ionização do tipo *electrospray* (ESI), com base nas características estruturais dos analitos estudados, o modo negativo foi escolhido para a aquisição dos dados e para garantir alta sensibilidade e seletividade durante as análises, escolheu-se trabalhar no modo de aquisição MRM (*Multiple-Reaction-Monitoring*).

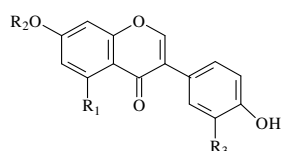
Os estados de transições selecionados para cada composto estão sumarizados na Tabela 9, Figuras 23, 24 e 27, referentes as análises de LC-MS/MS (QqQ), com um ou dois estados de transições realizados para cada composto. Para confirmar a presença dos padrões no extrato aquoso da palha da soja foi utilizado como critério a abundância do pico e o tempo de retenção das isoflavonas padrões. As transições entre os íons precursores e os íons produtos mais abundantes foram escolhidos para cada analito para análise no modo MRM. Resultando na identificação das isoflavonas (daidzeína, genisteína, genistina) e na proposta estrutural das substâncias (luteolina ou kaempferol, liquiritigenina, prunetina, glicetina e duas outras substâncias com MM (242 e 282 Da) que não foram atribuídas propostas estruturais (Tabela 9).

A Figura 29 A apresenta as estruturas das isoflavonas utilizadas como padrões, e 29 B a proposta de estruturas das substâncias identificadas no extrato aquoso da palha da soja.

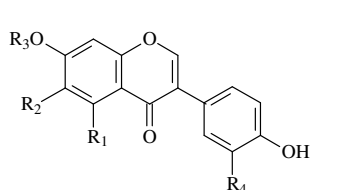
Tabela 9: LC-ESI-MS/MS: Transições monitoradas e condições utilizadas dos íons presentes nos padrões de isoflavonas e no extrato aquoso da palha da soja.

Substância ou proposta de estrutura	MM	Transição MRM Íon precursor > ion produto	Tempo de retenção (min.)	Abundância relativa (%)	Energia do Cone (V)	Energia de Colisão
desconhecida	242	241,72 > 197 241,72 > 223,54	10,67 e 31,57	100	30	25 v
daidzeína	254	253 > 208	8,05	100	30	20v
Liquiritigenina	256	255,21 > 236,93	32,80	100	30	20 v
genisteína	270	269 > 133	9,04	100	30	
desconhecida	282	281,8 e 242	34,03 e 31,86	100	30	25 v
Prunetina/ Glicetina	284	283,8 > 182,63 283,8 > 255,8	ND	100	30	25 v
Luteolina/ Kaempferol	286	285,8 > 240,16	30,46	100	30	20 v
daidzina	416	415,24 > 253,12	7,14	15	30	25v
genistina	432	431 > 269,13	8,26	15	30	25v

ND Não detectado.

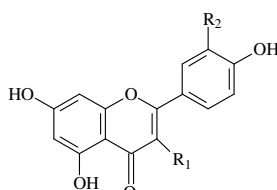


	R1	R2	R3	PM
Daidzeína	H	H	H	254
Daidzina	H	Glc	H	416
Genisteína	OH	H	H	270
Genistina	OH	Glc	H	432

Figura 29 A: Estrutura das isoflavonas utilizadas como padrões para análise do extrato aquoso da palha da soja por LC-MS/MS.

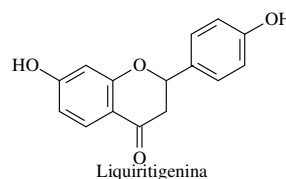
	R1	R2	R3	R4	PM
Prunetina	OH	H	CH ₃	H	284
Glicetina	H	CH ₃	H	H	284

MM = 284 Da



	R1	R2
Luteolina	H	OH
Kaempferol	OH	H

MM = 286 Da



Liquiritigenina

MM = 256 Da

Figura 29 B: Proposta de estrutura das substâncias detectadas no extrato aquoso da palha da soja por LC-MS/MS.

Os cromatogramas obtidos por LC-ESI-MS/MS correspondentes aos padrões (A-D) 0,2 µg mL⁻¹ e do extrato aquoso da palha da soja a 4,2 µg mL⁻¹ são representados nas Figuras 23 e 24 A.

As isoflavonas apresentaram íons produtos intensos formados durante a energia de dissociação de colisão induzida comuns, correspondentes a perda de $[M - CO - H]^-$, $[M - COH - H]^-$ e para os glicosídeos $[M - Glc - H]^-$.

Observa-se também que as moléculas glicosiladas apresentam a perda da glicose, apresentando padrões de fragmentação idênticos aos das suas agliconas.

Os dados dos estados de transição de MRM das isoflavonas daidzeína, daidzina, genisteína e genistina, substâncias utilizadas também como padrões (Tabela 9, Figura 29 A) apresentam fragmentos comuns a experimentos realizados no modo SIM (*single ion monitoring*) de isoflavonas, podendo assim ser realizado propostas de fragmentação.

As isoflavonas apresentaram íons produtos intensos e característicos, os quais podem ser usados na etapa de identificação. Esses íons são formados pela fragmentação de um determinado íon precursor, isolado previamente em Q1. Na seqüência, o íon precursor é submetido a um bombardeamento com um gás inerte, geralmente argônio, em q2. Esse processo é conhecido como dissociação por colisão induzida (CID) e após a formação dos íons gerados em q2 eles são direcionados a Q3 e detectados.

Os mecanismos de fragmentação predominates no caso das isoflavonas são a retro Diels – Alder e perdas neutras de CO, CO₂, COH, C₂H₂O, C₃O₂ podem ocorrer (WU *et al.*, 2004) esses mecanismos também se assemelham aos padrões de quebra comuns a outros flavonóides (GOBBO *et al.*, 2008).

A genistina foi analisada primeiramente por ESI-MS *full-scan* (Figura 23). Apresentou íon da molécula desprotonada $[M-H]^-$ a *m/z* 431. Propostas de fragmentações da genistina e daidzeína (Figuras 30 e 31, tabela 10) foram baseadas nas propostas de fragmentações de flavonóides propostas por Wu *et al.* (2004).

Perda da glicose no anel A da isoflavona levou ao fragmento da aglicona desprotonada $[M - \text{Glc} - \text{H}]^-$ a m/z 269. O íon produto a m/z 241 forneceu a perda de CO e o íon produto a m/z 212 forneceu a perda de COH. O íon produto a m/z 133 foi monitorado na análise MRM a partir do íon m/z 269 fornecendo o fragmento característico da isoflavona com uma hidroxila no anel B. Observaram-se ainda os fragmentos referentes à clivagem Retro Diels-Aldes em m/z 133 e 154. O espectro da genisteína (aglicona da genistina) forneceu fragmentos idênticos a partir da molécula desprotonada $[M-H]^-$ (Figura 23), Tabela 10. A Figura 30 mostra proposta de fragmentação da genistina MM 432 Da. Para a aglicona da genistina (genisteína) os fragmentos observados foram os mesmos à partir da perda da glicose (fragmento m/z 269).

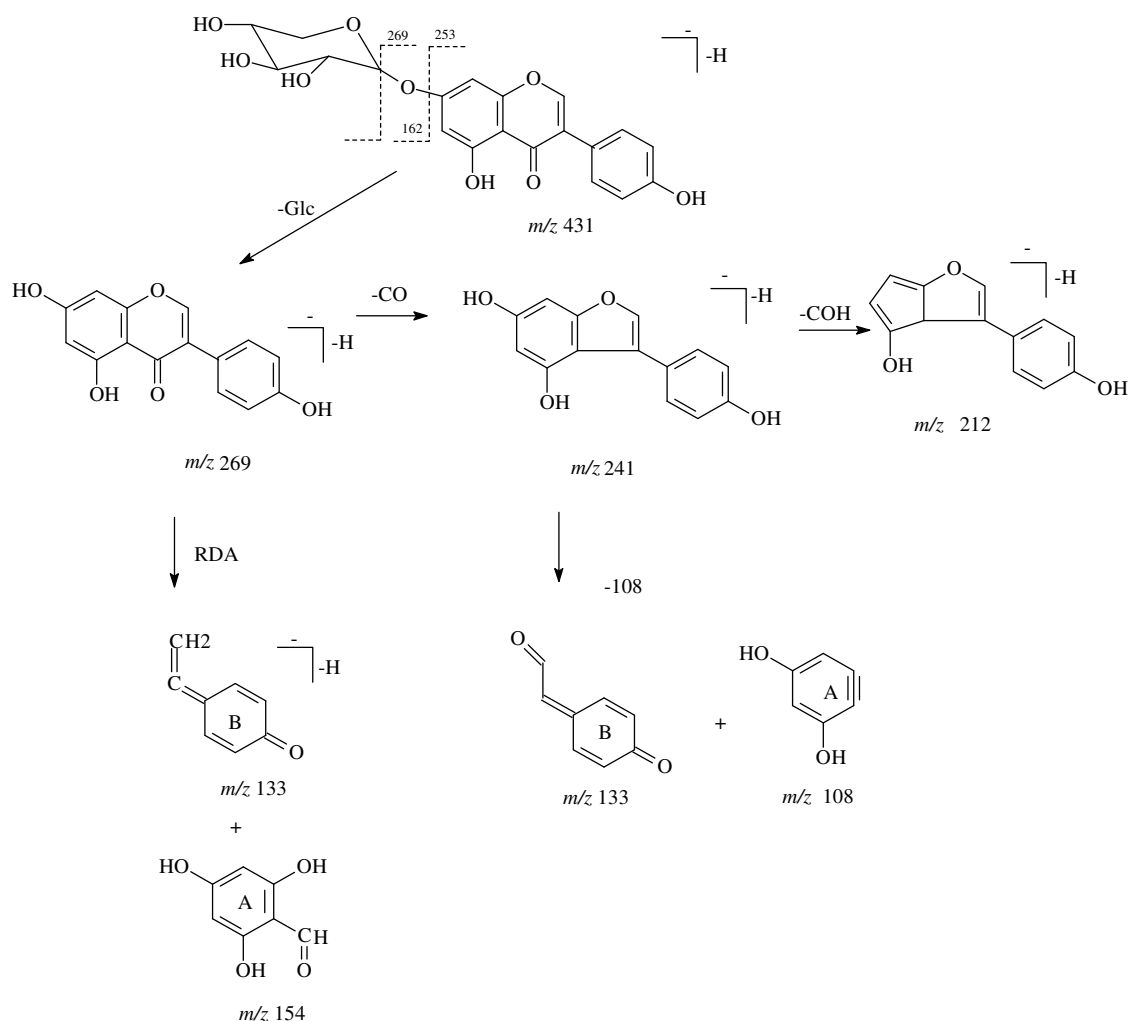


Figura 30: Fragmentos propostos para a genistina MM 432 Da. Propostas de fragmentações baseadas em Wu *et al.* (2004).

Para a daidzeína foram observados também a partir do íon da molécula desprotonada $[M - H]^-$ a m/z 253 perdas consecutivas de CO (28 Da) levando aos íons produtos a m/z 225 e m/z 197 e os íons fragmentos característicos do anel B da isoflavona. Não foi detectado no extrato aquoso da palha da soja o glicosídeo da daidzeína (a daidzina). A Figura 31 e a Tabela 10 apresentam proposta de fragmentação da daidzeína MM 254 Da. O glicosídeo da daidzeína (daidzina, m/z 415) não foi detectado no extrato aquoso da palha da soja.

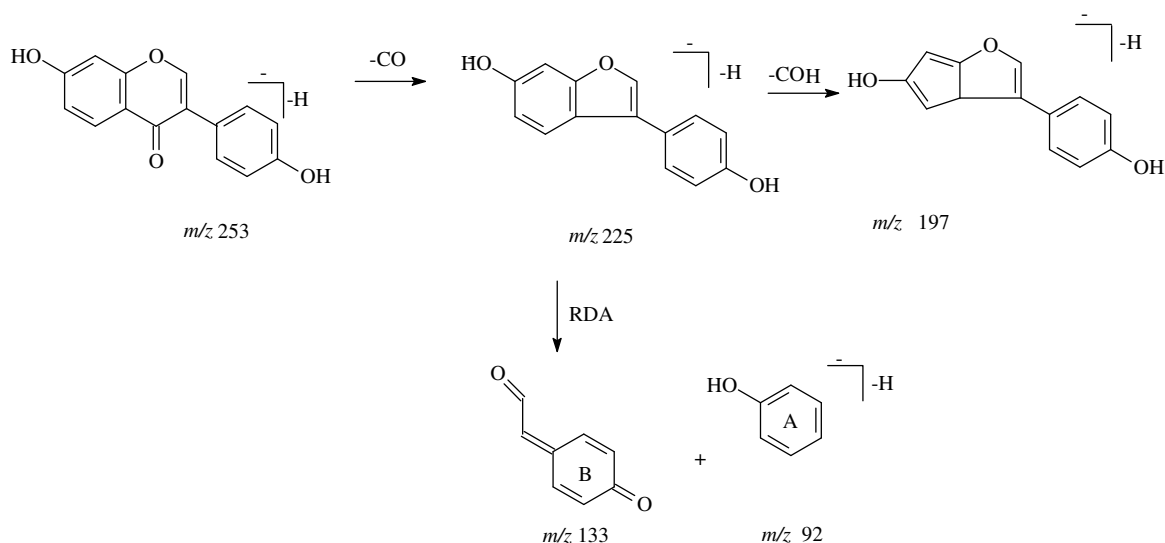


Figura 31: Fragmentos propostos para a daidzeína MM 254 Da. Propostas de fragmentações baseadas em Wu *et al.* (2004).

Tabela 10: ESI/MS/MS dos íons produtos da genistina e daidzeína

Genistina	Daidzeína
431 [M – H] ⁻	253 [M – H] ⁻
269 [M – 162 – H] ⁻	225 [M – CO – H] ⁻
241 [M – 162 – CO – H] ⁻	212 [M – 162 – 2 CO – H] ⁻
212 [M – 162 – 2 CO – H] ⁻	197 [M – CO – COH – H] ⁻
155 [M – 162 – 4 CO – H] ⁻	133 [M – 92 – H] ⁻
133 [M – Glc – 136 – H] ⁻	

O cromatograma apresentando os canais com os outros íons extraídos (MRM) para as substâncias desconhecidas presentes no extrato aquoso da palha da soja é apresentado na Figura 27. Foram selecionados os íons significativos (B) 286; (C) 284 ; (D) 282; (E) 255; (F) 242 Da, para serem analisados por massas *full-scan* (Figura 28).

Algumas estruturas de flavonóides comuns à soja são propostas para estes íons como kaempferol ou luteolina que apresentam MM 286 Da, a liquiritigenina que apresenta MM 256 Da e a prunetina e/ou glicetina que apresenta MM 284 Da (Tabela 9).

4.2. Análise quantitativa dos fitoestrógenos da palha de soja

4.2.1 Otimização dos parâmetros para análise por LC/MS-MS

Os parâmetros de voltagens do capilar, da agulha e *shield*, juntamente com as posições da agulha nos eixos (“x”, “y” e “z”) além dos valores de Q_0 (Quadrupolo 0), Q_1 (Quadrupolo 1) e L_4 (Lente 4) do equipamento foram determinados experimentalmente por meio da injeção dos padrões por infusão direta, aplicando-se primeiramente os padrões separadamente, sendo que para cada uma das isoflavonas foram otimizadas a melhor resposta conforme resultados apresentados na Tabela 11. O processo de otimização da pressão do gás de nebulização está descrito nas Figuras de 32 a 35 sendo que a genisteína, genistina e daidzeína apresentaram maior sensibilidade em 40 psi, enquanto a daidzina obteve uma melhor resposta em 45 psi.

Tabela 11: Parâmetros de otimização de resposta no LC-MS/MS

	Voltagem do capilar	Voltagem da agulha	Voltagem do <i>Shield</i>	Posição vertical da agulha	Posição horizontal da agulha	Profundidade do capilar	Q_0	Q_1	L_4
GENISTEINA	-60,00 V	-3950 V	-425 V	4 mm	5 mm	1 mm	1,940 V	offset:0,73 V Guide:5,00 V	1,00 V
DAIDZEINA	-58,78 V	-3950 V	-425 V	4 mm	5 mm	1 mm	4,000 V	offset:0,73 V Guide:5,00 V	1,00 V
GENISTINA	-70,00 V	-3800 V	-425 V	4 mm	4 mm	2 mm	1,940 V	offset:0,54 V Guide:2,50 V	1,00 V
DAIDZINA	-60,00	-3800 V	-425 V	4 mm	4 mm	2 mm	3,900 V	offset: 0,56 V Guide: 5,90 V	1,00 V

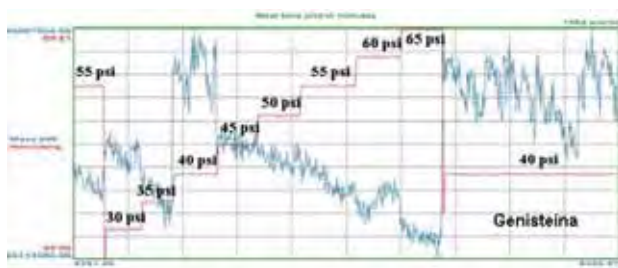


Figura 32: Otimização da sensibilidade pelo ajuste da pressão do gás de nebulização da genisteína m/z –268,6 Da

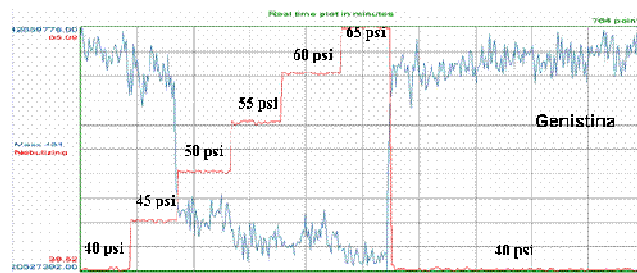


Figura 33: Otimização da sensibilidade pelo ajuste da pressão do gás de nebulização da genistina m/z – 431,2 Da

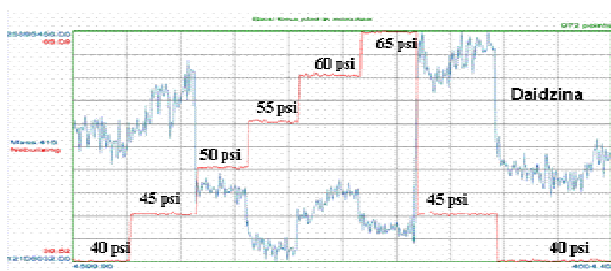


Figura 34 : Otimização da sensibilidade pelo ajuste da pressão do gás de nebulização da daidzina m/z –415 Da

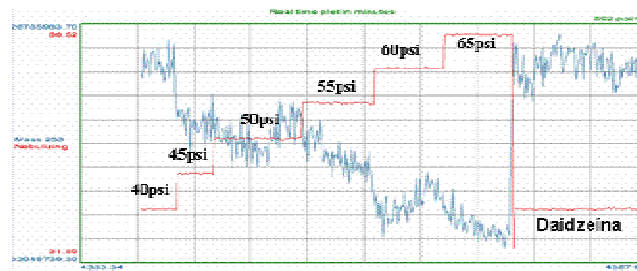


Figura 35: Otimização da sensibilidade pelo ajuste da pressão do gás de nebulização da daidzeína m/z – 252,4 Da

Os testes de supressão iônica foram feitos utilizando-se a matriz do extrato da palha de soja diluída em ACN/H₂O (Figura 36) e com o extrato fortificado (Figura 37) com padrões (genisteína, daidzina, daidzeína e genisteína) a uma concentração de 1,0 ng mL⁻¹ com o objetivo de averiguar possíveis regiões de supressão iônica garantindo assim que não houvesse perda de sensibilidade. Concluiu-se que nas regiões onde eluíam os fitoestrógenos em estudo não havia problemas de supressão iônica.

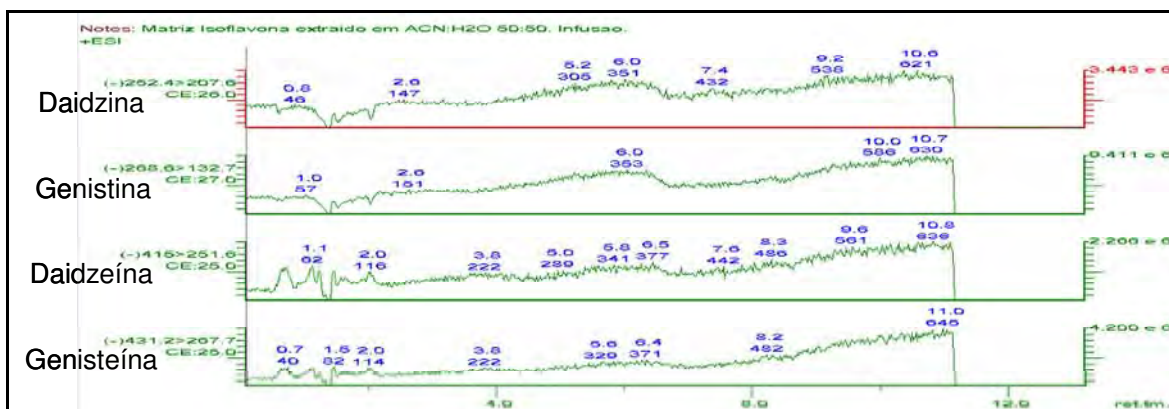


Figura 36: Teste de supressão iônica realizado com a injeção do extrato de palha de soja diluído em ACN/H₂O (50:50).

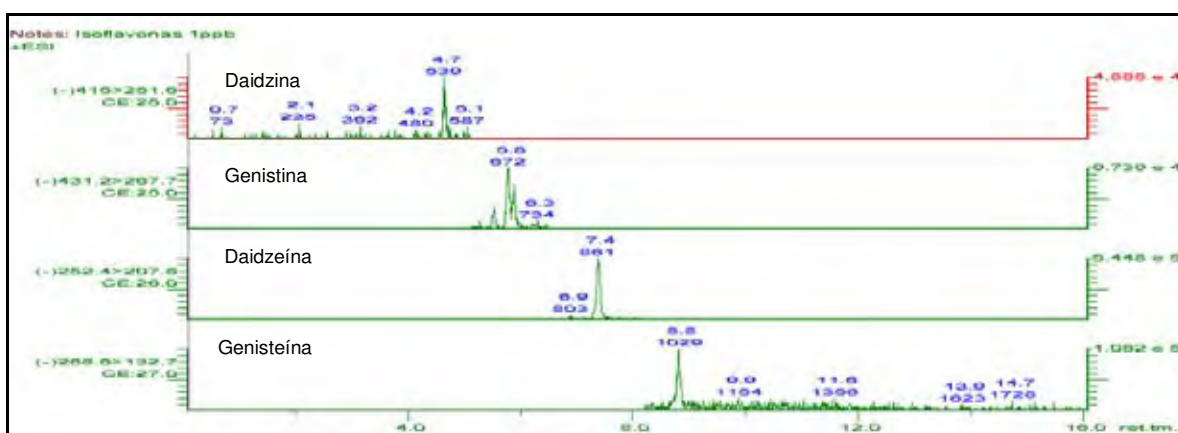


Figura 37: Teste de supressão iônica realizado com a injeção do extrato de palha de soja enriquecida com padrões de isoflavonas a concentração de 1,0 ng mL⁻¹ em ACN/H₂O (50:50).

As curvas das energias de colisão (Figuras 38 a 41) forneceram as transições de maior energia para cada um dos analitos: genisteína (m/z 268,6 >132,7), daidzeína (m/z 252,4 >207,6) genistina (m/z 431,2 >267,7) daidzina (m/z 415 > 251,6).

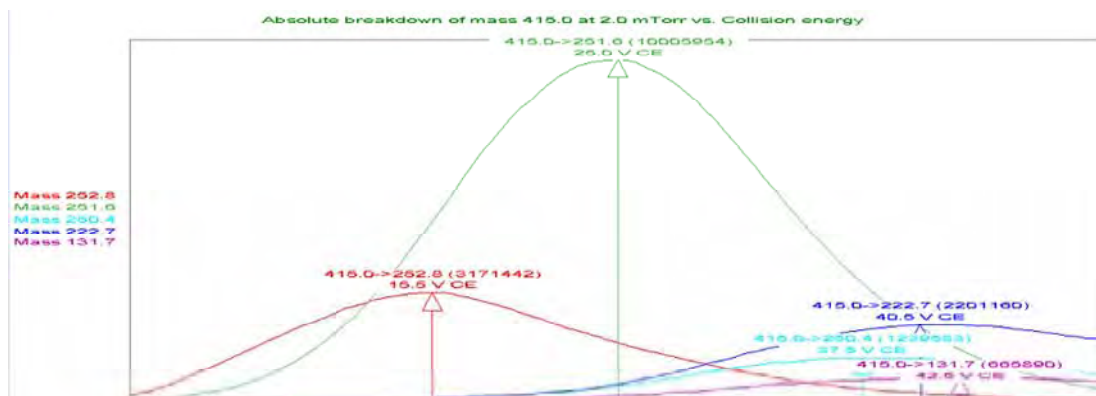


Figura 38: Daidzina m/z - 415 – energia de colisão 25,0 V

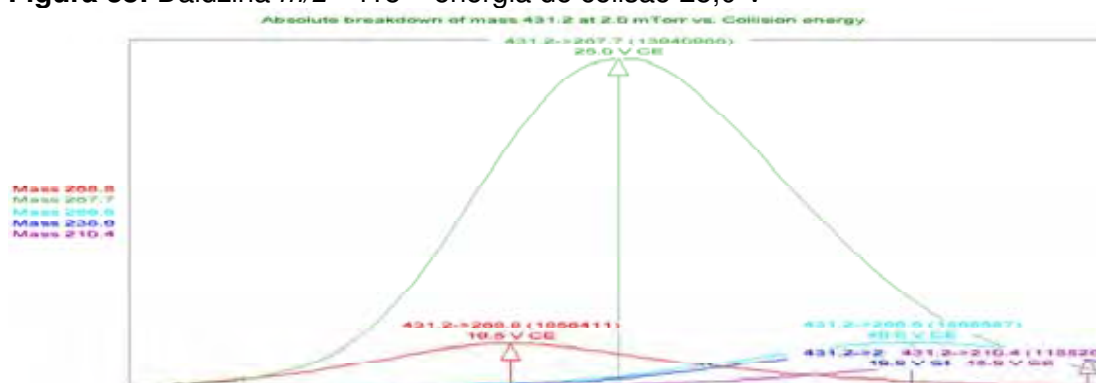


Figura 39: Genistina m/z – 431,2 – energia de colisão 25 V

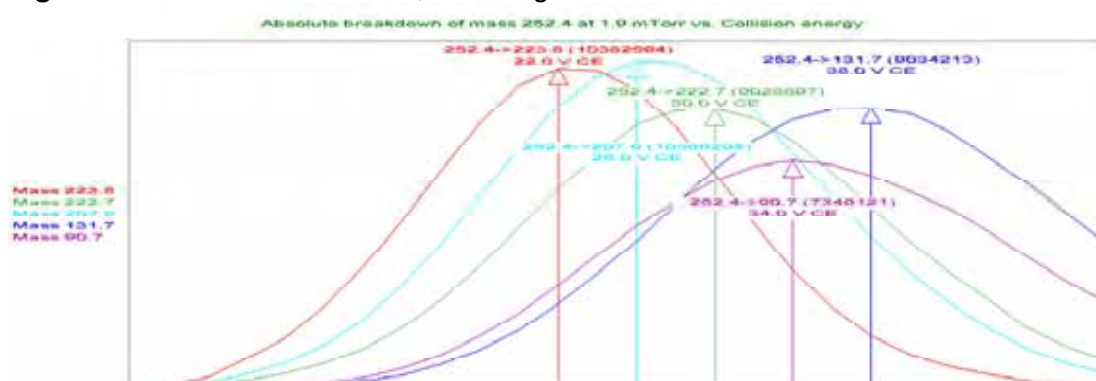


Figura 40: Daidzeína m/z – 252,4 – energia de colisão 26,0 V



Figura 41: Genisteína m/z – 268,6 – energia de colisão 27,0 V

4.2.2 Avaliação do desempenho do sistema LC/MS-MS

A Figura 42 representa o cromatograma da curva analítica da genistina, daidzina, daidzeína e genisteína em LC-MS/MS.

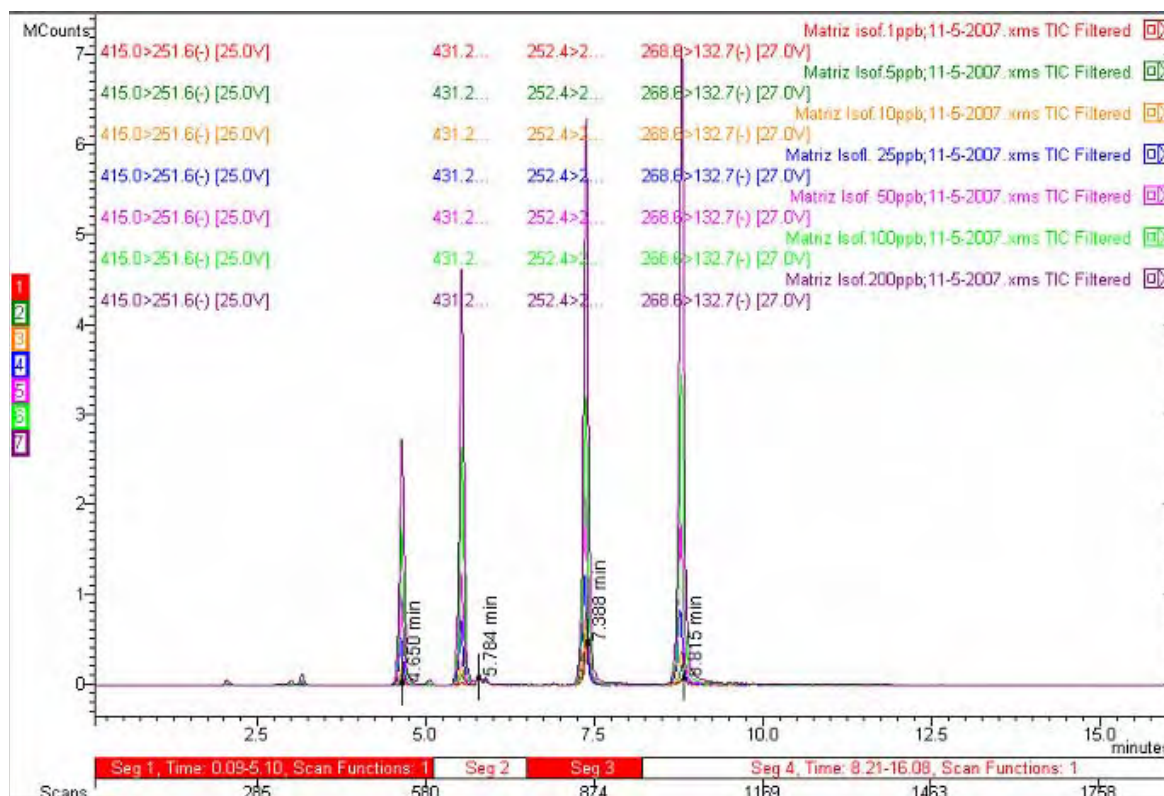


Figura 42: Cromatograma (LC-MS/MS) em sete concentrações diferentes dos fitoestrógenos estudados: genistina ($t_r= 4,650$ min), daidzina ($t_r= 5,784$ min), daidzeína ($t_r= 7,388$ min) e genisteína ($t_r= 8,815$ min).

Nas Figuras 43, 45, 47 e 49 estão representados os gráficos de linearidade para genistina, daidzina, daidzeína e genisteína respectivamente.

Os resultados demonstraram que em todas as quatro curvas analíticas somente o ponto de concentração igual a 1 ng mL^{-1} situou-se fora do intervalo de linearidade e, portanto, não foi utilizado na plotagem da curva analítica.

As Figuras 44, 46, 48 e 50 representam as curvas analíticas da genistina, daidzina, daidzeína e genisteína respectivamente. Podemos atestar que há linearidade no método cromatográfico devido ao coeficiente de determinação próximo de 1. O coeficiente de determinação R^2 permite uma estimativa de

qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1, menor será a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor será a incerteza dos coeficientes de regressão estimados e nesse sentido obtivemos para todas as quatro curvas $R^2 > 0,99$.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir do teste de Huber (VALENTE, 2006) e estão apresentados na Tabela 12.

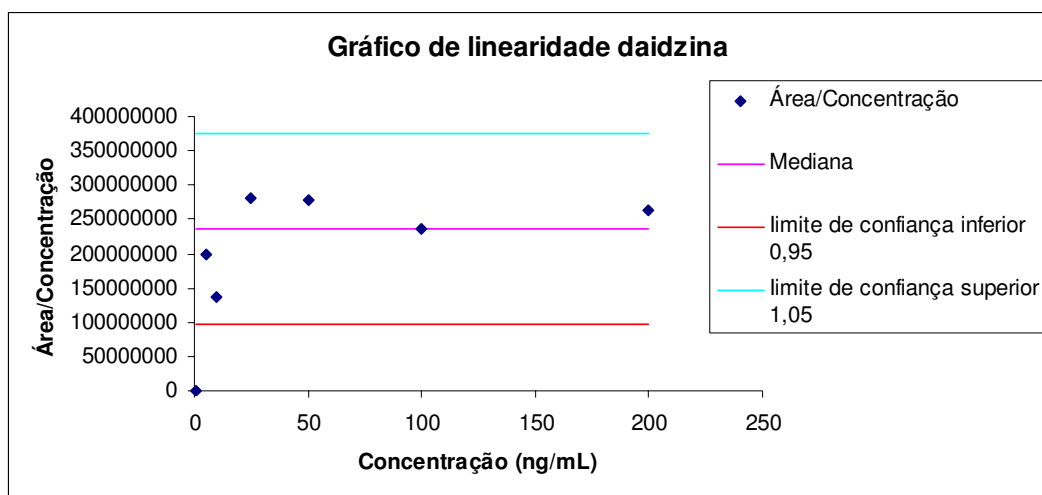


Figura 43: Gráfico de linearidade da daidzina.

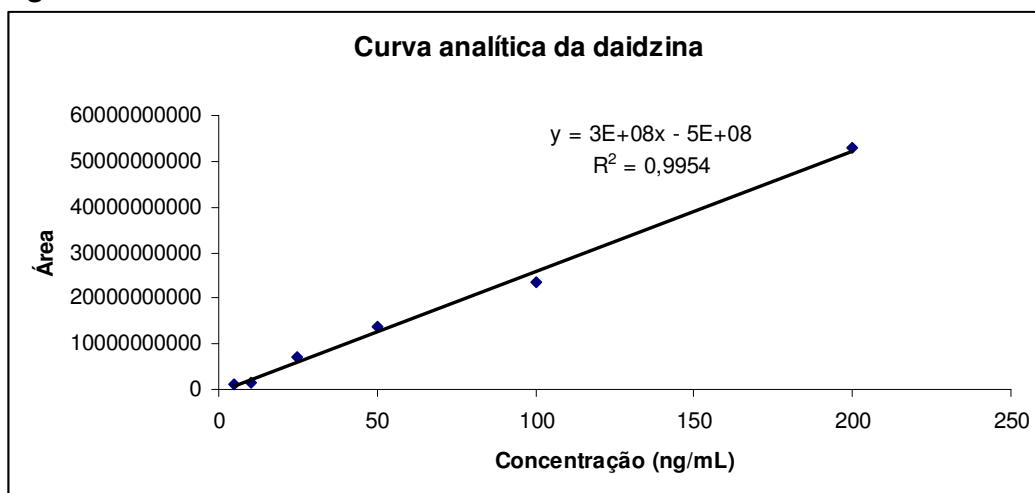


Figura 44: Curva analítica da daidzina.

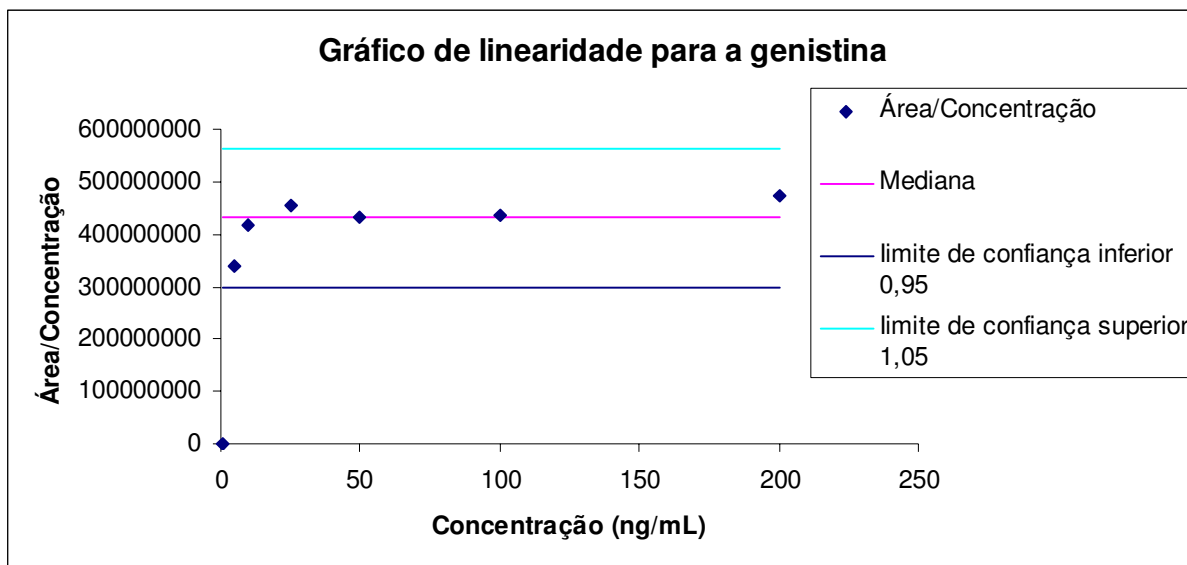


Figura 45: Gráfico de linearidade da genistina.

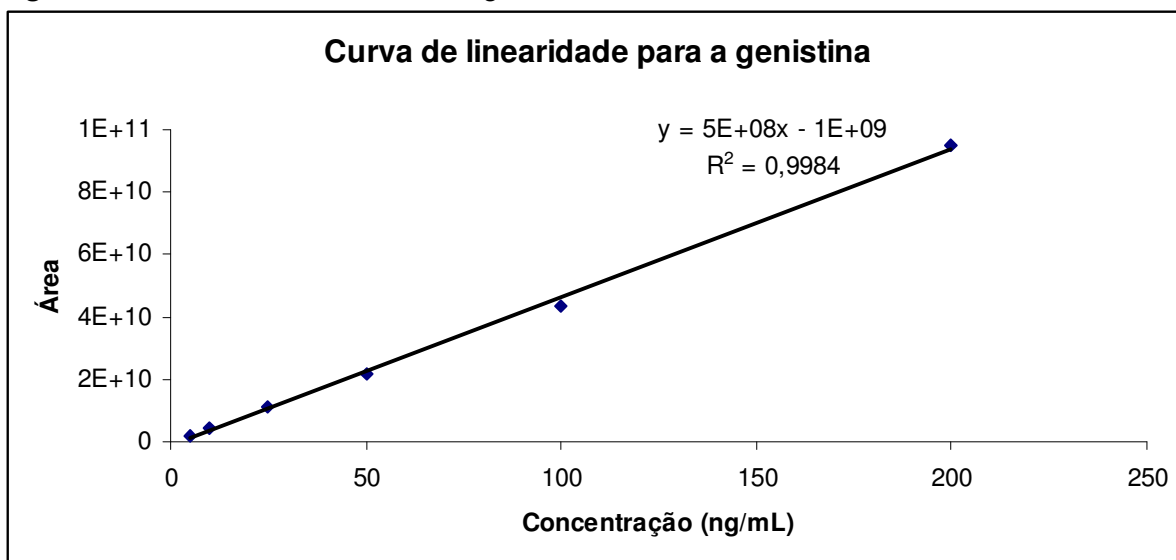


Figura 46: Curva analítica da genistina.

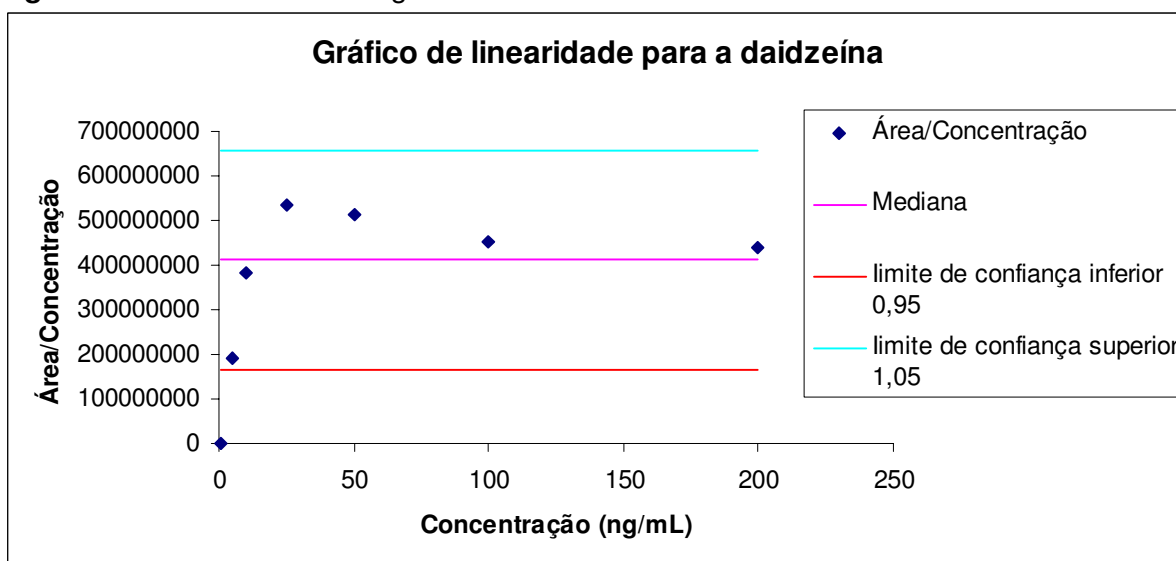


Figura 47: Gráfico de linearidade da daidzeína.

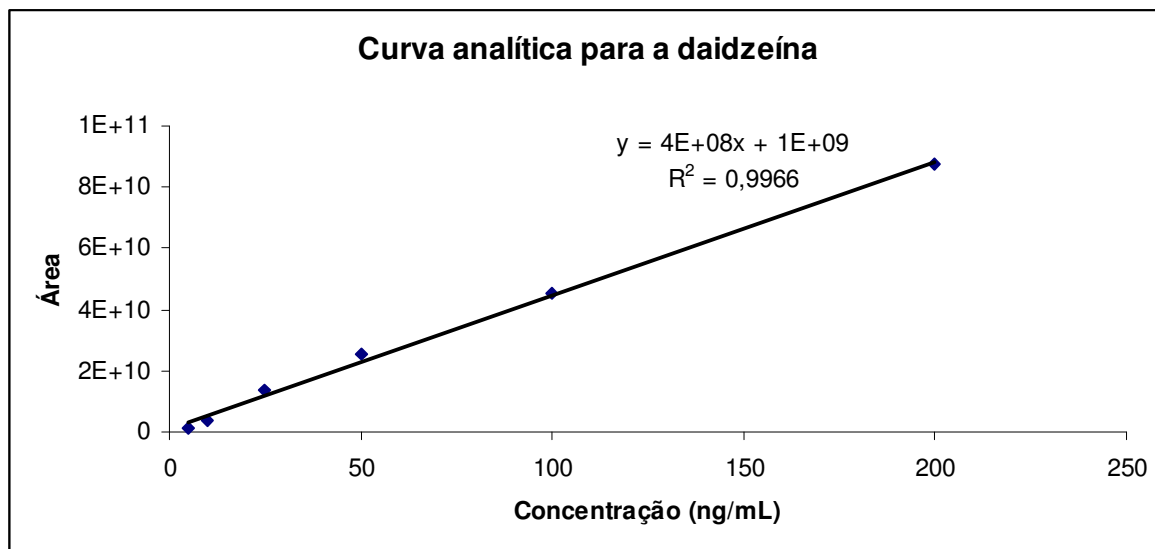


Figura 48: Curva analítica da daidzeína.

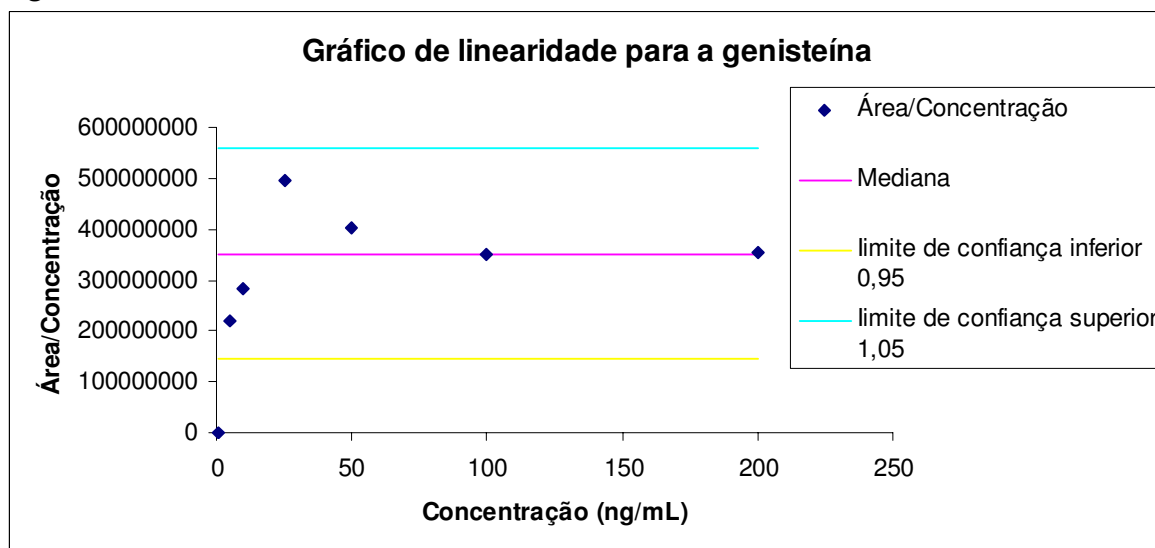


Figura 49: Gráfico de linearidade da genisteína.

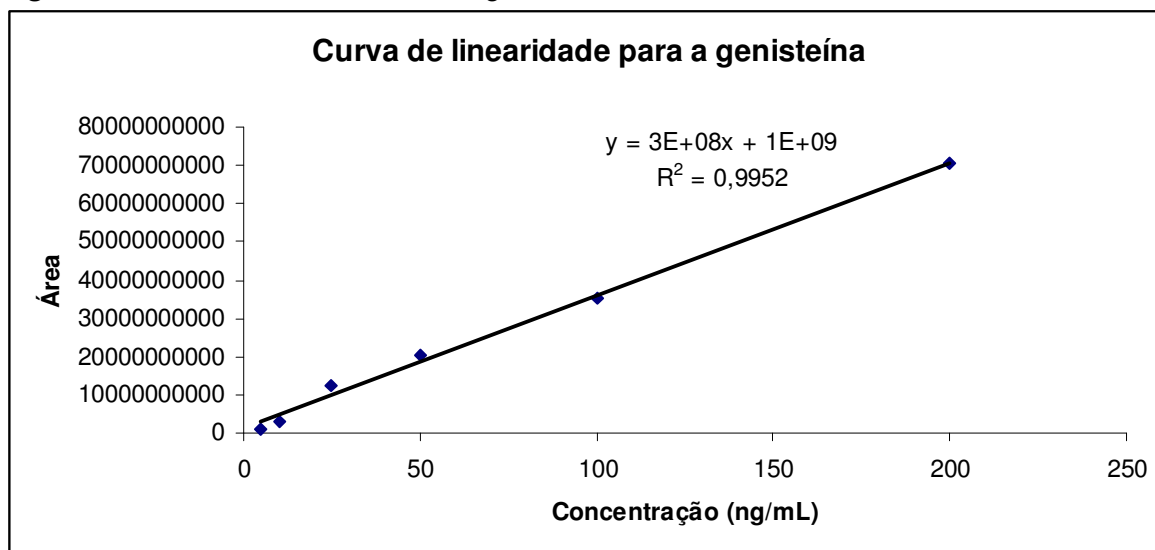


Figura 50: Curva de linearidade da genisteína.

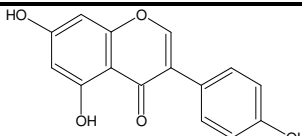
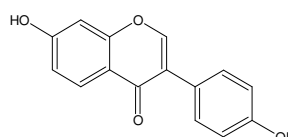
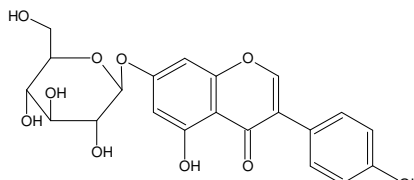
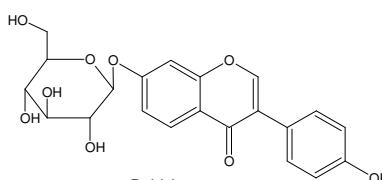
Tabela 12: Limites de detecção, quantificação e coeficientes de correlação linear obtidos a partir dos parâmetros das curvas analíticas para o sistema LC/MS-MS.

Fitoestrógenos	LD	LQ	R ²
Daidzina	1 ng mL ⁻¹	5 ng mL ⁻¹	0,9954
Genistina	1 ng mL ⁻¹	5 ng mL ⁻¹	0,9984
Daidzeína	1 ng mL ⁻¹	5 ng mL ⁻¹	0,9966
Genisteína	1 ng mL ⁻¹	5 ng mL ⁻¹	0,9952

4.2.3 Análise por LC - MS/MS de fitoestrógenos na palha de soja

Utilizando-se os parâmetros otimizados foram identificadas e quantificadas duas substâncias (genisteína e a daidzeína) na palha de soja (Tabela 13), sendo estas, portanto caracterizadas como os marcadores de contaminação ambiental.

Tabela 13: Concentração de fitoestrógenos na palha de soja (n = 3)

Fitoestrógenos	Concentração (média \pm SD) ng g ⁻¹	CV(%)
 Genisteína	15 \pm 1	7
 Daidzeína	52 \pm 4	8
 Genistina	+	—
 Daidzina	+	—

+ abaixo do limite de quantificação e acima do limite de detecção.

4.3 Otimização e validação de método para análise das isoflavonas em água de rio e sub-superficial

4.3.1 Avaliação do desempenho do sistema HPLC-UV (LC-920, Varian) seleção do comprimento de onda para as análises por HPLC-UV-DAD

Os espectros de absorção correspondentes aos fitoestrógenos em estudo foram obtidos, utilizando-se varredura de 200 a 400 nm. Os comprimentos de onda correspondentes aos máximos de absorbância de cada analito foram selecionados posteriormente, para a determinação analítica dos fitoestrógenos na otimização da extração em fase sólida e nas análises ambientais.

A Figura 51 apresenta como exemplo, o cromatograma com os respectivos tempos de retenção dos analitos e os espectros de varredura da genisteína e daidzeína com os comprimentos de onda máximos.

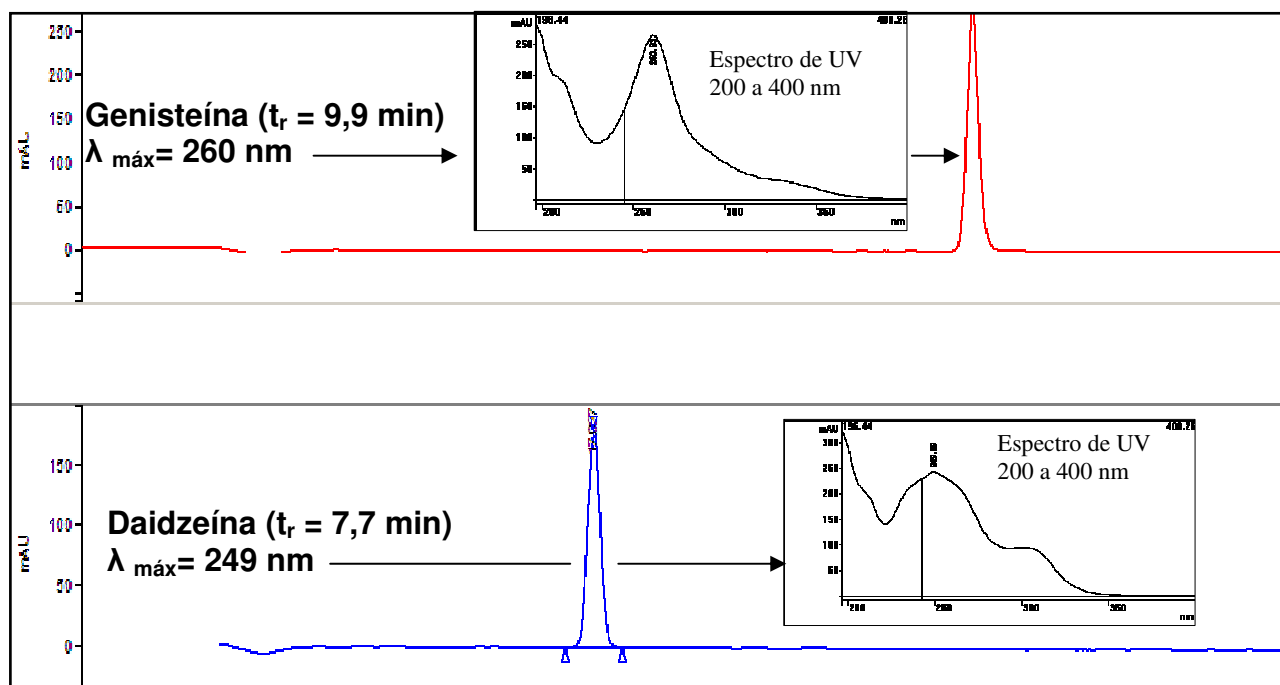


Figura 51: Cromatogramas HPLC-UV/DAD para genisteína ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) e daidzeína ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$). Sistema de solvente ACN/H₂O (10 a 65% ACN em 10 min). No detalhe os espectros de absorção para ambas.

4.3.2 Avaliação do desempenho do sistema HPLC-UV-DAD

As Figuras 52 e 53 apresentam o gráfico de linearidade e a curva analítica da daidzeína, enquanto que as Figuras 54 e 55 apresentam o gráfico de linearidade e a curva analítica da genisteína.

Os resultados referentes a concentração de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ estavam fora dos limites de tolerância estabelecidos, ou seja, fora do intervalo de linearidade, tanto para a daidzeína como para a genisteína e, portanto, este ponto foi excluído da curva analítica e foi considerado o LD do equipamento.

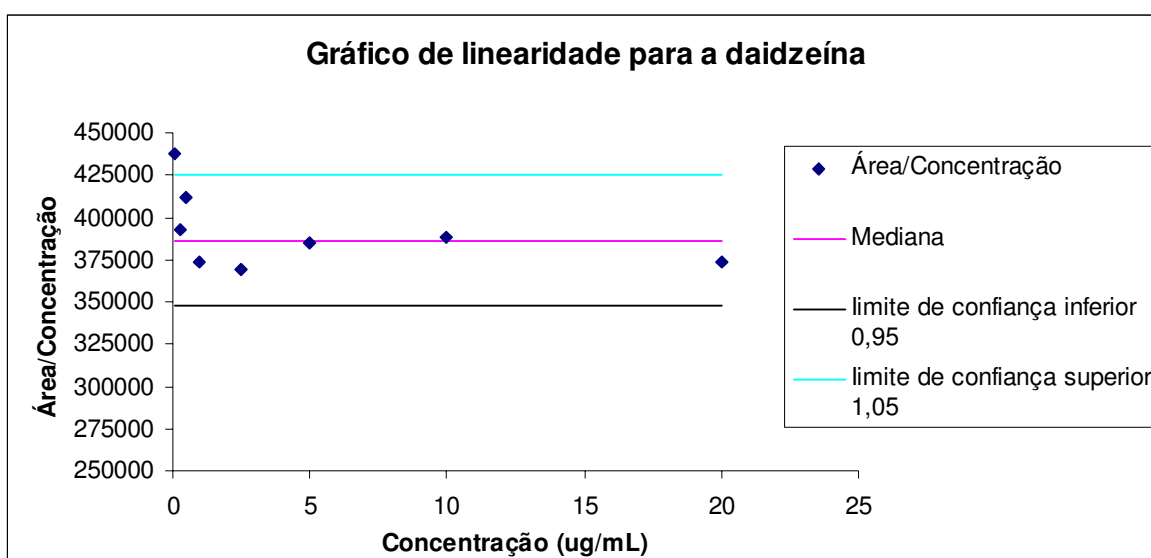


Figura 52: Gráfico de linearidade da daidzeína.

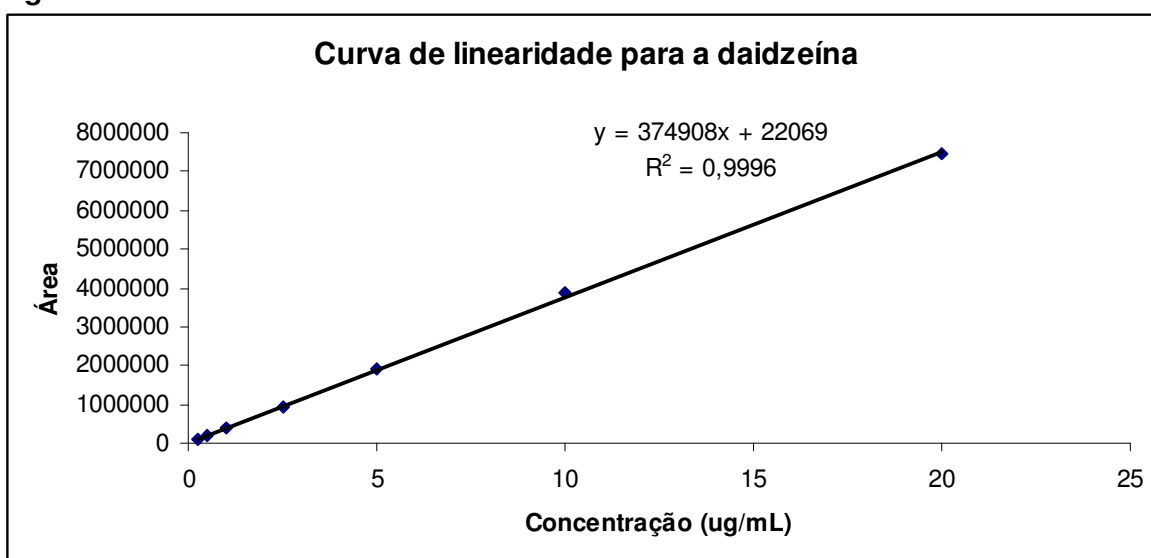


Figura 53: Curva analítica da daidzeína.

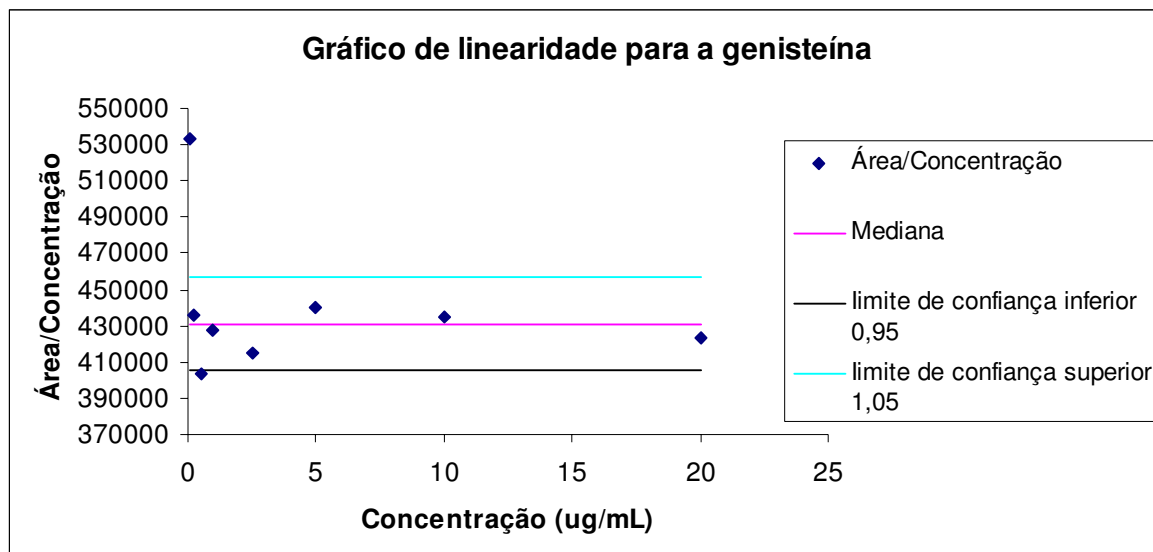


Figura 54: Gráfico de linearidade da genisteína.

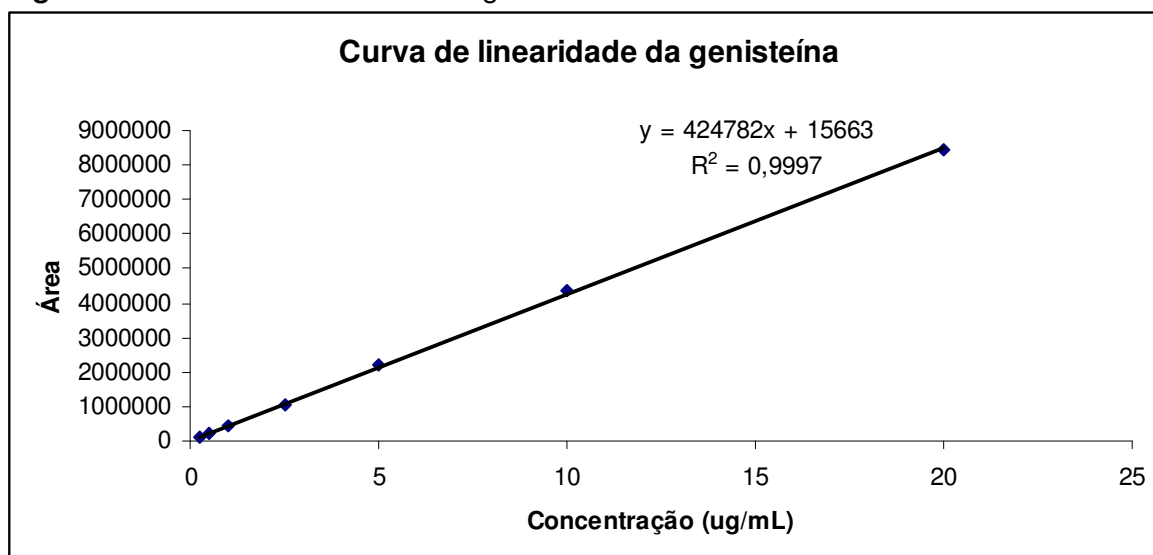


Figura 55: Curva analítica da genisteína.

A partir dos dados obtidos para o sistema HPLC-DAD e de maneira análoga ao que foi feito para o LC-MS/MS, os resultados referentes aos limites de detecção e quantificação estão na Tabela 14.

Tabela 14: Limites de detecção, quantificação e coeficientes de correlações lineares obtidos a partir dos parâmetros das curvas analíticas. Para o sistema HPLC-UV-DAD.

Fitoestrógenos	LD	LQ	R ²
Genisteína	0,1 µg mL ⁻¹	0,5 µg mL ⁻¹	0,9997
Daidzeína	0,1 µg mL ⁻¹	0,5 µg mL ⁻¹	0,9996

O desempenho do sistema HPLC-UV/DAD alcançou bons níveis de LD e LQ, porém de acordo com os dados de concentração relatados na literatura para as isoflavonas (ERBS *et al.*, 2007) tais valores não se adequaram às necessidades desse estudo. Outro ponto negativo está no fato de que em valores próximos ao limite de detecção e quantificação, a qualidade dos espectros de UV é muito baixa o que torna inviável a utilização dessa importante ferramenta de confirmação estrutural.

4.3.3 Resultados da avaliação do desempenho sistema HPLC-UV (LC-920, Varian)

Como o foco inicial do projeto foram as substâncias com maior potencial estrogênico (genisteína e daidzeína), ou seja, as que possuem maior fator de impacto ambiental os testes de otimização e validação analítica foram conduzidos a princípio utilizando essas duas moléculas. Devido ao interesse em tentar entender a dinâmica com a qual os fitoestrógenos da soja se dispersam no meio ambiente, introduzimos posteriormente mais cinco padrões (genistina, daidzina, equol, formononetina, biochanina - A), que também foram submetidos aos processos de validação analítica. A comparação da resposta dos sistemas HPLC-UV-DAD e HPLC-UV foram realizadas apenas para a daidzeína e genisteína, tendo em vista que essas substâncias haviam sido os alvos iniciais desse estudo.

O estudo de recuperação também se deu de forma análoga a determinação das faixas lineares e das curvas analíticas, utilizando assim *a priori* os padrões de daidzeína e genisteína. Dessa forma o método foi validado e posteriormente testado para as cinco demais substâncias (daidzina, genistina, equol, formononetina e biochanina - A).

Os resultados obtidos para cada fase de validação do método analítico serão apresentados iniciando pela Figura 56, que ilustra a separação obtida para os dois fitoestrógenos no sistema cromatográfico. Diferentes concentrações foram injetadas para obtenção dos intervalos de linearidade e curva de linearidade (Figuras 57 a 60).

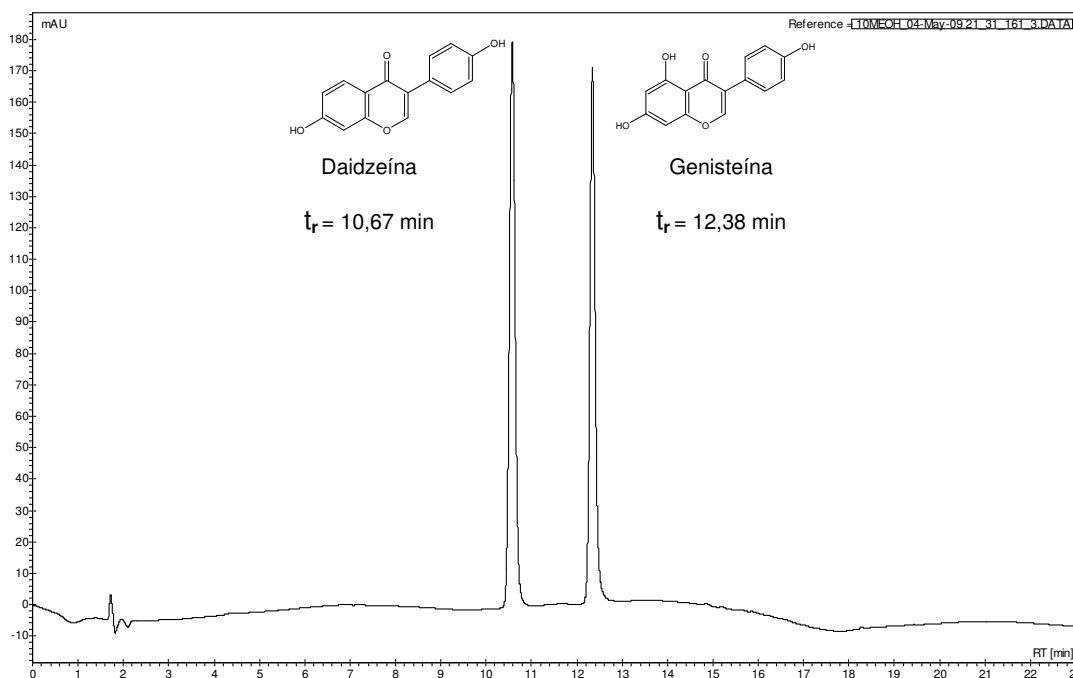


Figura 56: Cromatograma (HPLC-UV) de padrões de daidzeína e genisteína injetados em concentrações iguais a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os resultados mostraram que o ponto referente a concentração de $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ situou-se fora do intervalo de linearidade, tanto para a daidzeína como para a genisteína (Figuras 57 e 59) e, portanto, foi excluído das curvas analíticas (Figuras 58 e 60), conseqüentemente por definição (VALENTE, 2006) tal ponto representa o limite de detecção do equipamento para as duas moléculas. O primeiro ponto a situar-se dentro do intervalo de linearidade, também para as duas moléculas, foi o de concentração $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ sendo, por conseguinte, o limite de quantificação do equipamento.

Para os gráficos de linearidade (Figuras 57 e 59) foi utilizada a seguinte notação:

mediana = mediana dos valores obtidos para cada concentração.

$A/C = \text{Área}/\text{Concentração}$.

lci = Intervalo de confiança inferior.

lcs = intervalo de confiança superior.

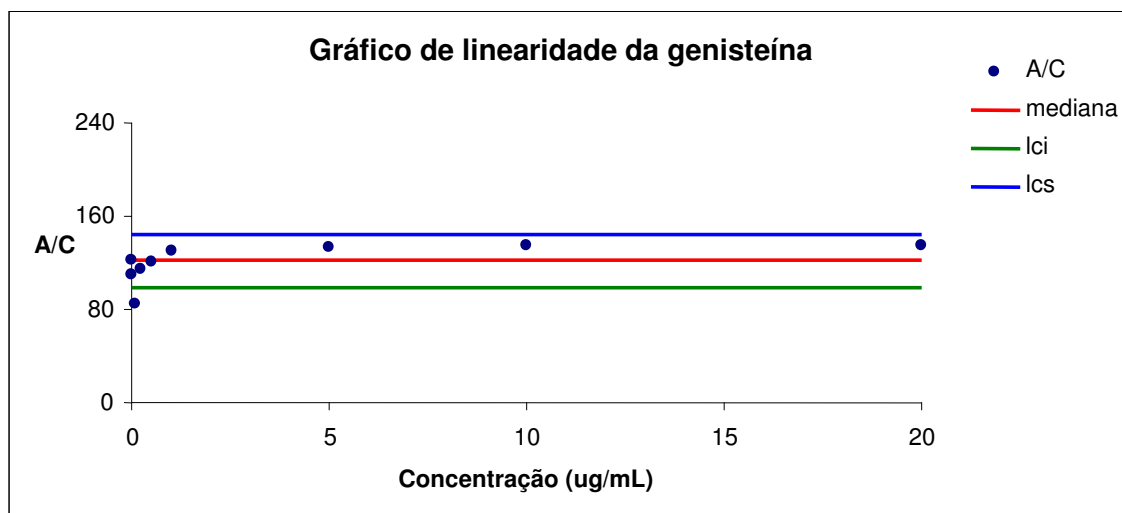


Figura 57: Gráfico de linearidade para genisteína no sistema LC920 Varian.

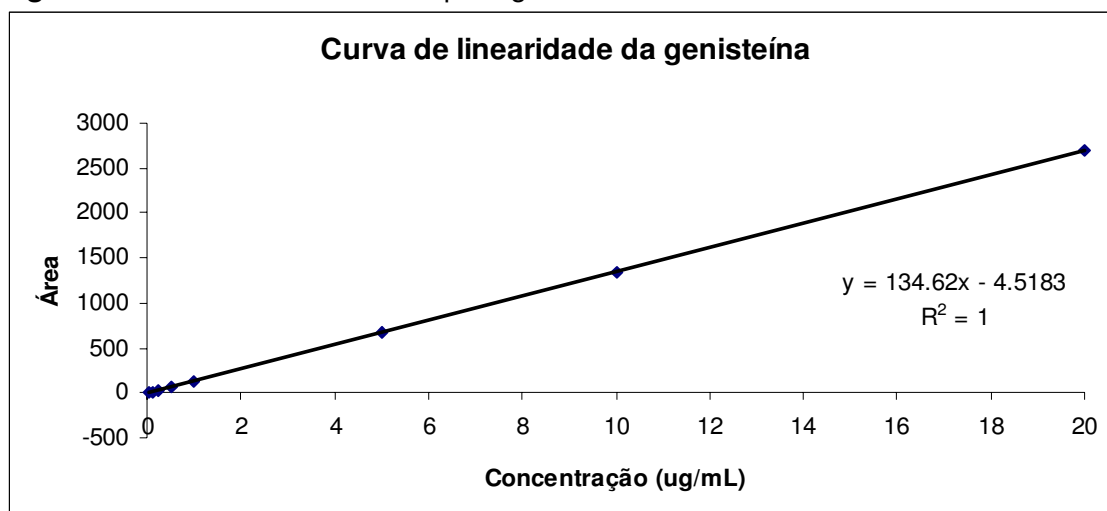


Figura 58: Curva analítica para genisteína no sistema LC 920 Varian.

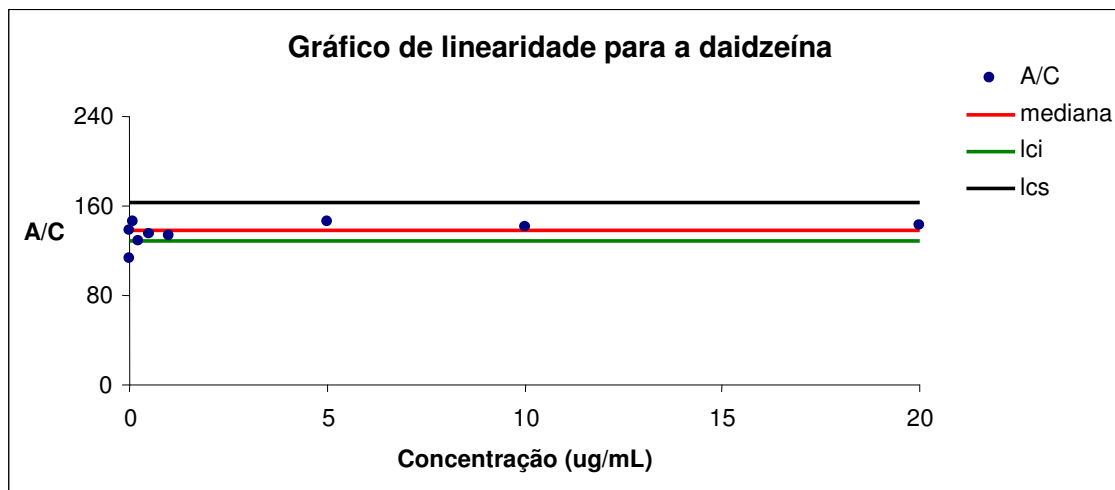


Figura 59: Gráfico de linearidade para daidzeína no sistema LC 920 Varian.

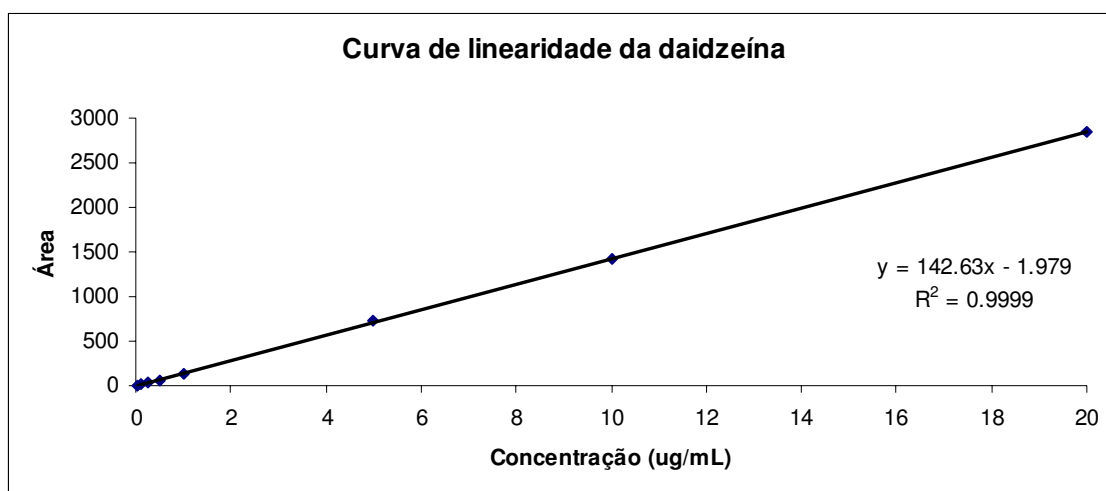


Figura 60: Curva analítica para daidzeína no sistema LC 920 Varian.

A partir dos dados obtidos para o sistema HPLC-UV LC-920, os valores referentes aos novos limites de detecção e quantificação foram estabelecidos tendo em vista a linearidade dos compostos (Figuras 57 e 59), sendo considerado limite de quantificação (LQ) a menor concentração que pertence ao intervalo de linearidade, enquanto que o limite de detecção é a menor concentração fora deste intervalo (VALENTE, 2006). Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 15, onde também figuram os limites obtidos para o sistema ProStar-Varian.

Tabela 15: Resposta dos sistemas analíticos (HPLC-UV e HPLC-UV-DAD).

HPLC-UV LC-920	t_r (min)	Equação da reta (R²)	LD_{eq}	LQ_{eq}
			µg mL⁻¹,	
Daidzeína	10,67	y= 142,63x – 1,979 (0,9999)	0,01	0,02
Genisteína	12,38	y= 134,62x – 4,5183 (1,0000)	0,01	0,02
HPLC-DAD Pro-Star				
Daidzeína	7,7	y= 374908x + 22069 (0,9996)	0,1	0,5
Genisteína	9,9	y= 428742x +15663 (0,9997)	0,1	0,5

Na comparação dos dois sistemas cromatográficos fica evidente que o equipamento (HPLC-UV LC-920) possui vantagens indiscutíveis tais como: apresentar uma faixa de linearidade mais ampla, de 0,02 a 20 µg mL⁻¹, enquanto no equipamento (HPLC-UV/DAD) essa faixa situava-se de 0,1 a 20 µg mL⁻¹.

A capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração do analito, enquadrados em faixa analítica especificada pode ser demonstrado pelo coeficiente de correlação da curva analítica. O coeficiente de correlação (r^2) 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. Portanto, os dados obtidos no equipamento demonstrados na Tabela 15 indicam que os resultados obtidos para o HPLC-UV LC-920 são melhores que os obtidos em HPLC-DAD.

Com relação à sensibilidade comparando os valores dos coeficientes angulares da reta obtidos através dos resultados da regressão linear, podemos afirmar que o sistema HPLC-UV é mais sensível por possuir maiores ângulos de inclinação (Θ) obtidos pelo cálculo da tg Θ . O desempenho dos sistemas

cromatográficos estudados até agora, mostram que o sistema HPLC-UV LC-920 responde mais adequadamente a pequenas diferenças na concentração do analito resultando em maiores variações no valor do sinal analítico medido. Tal comportamento não se reproduz no HPLC-UV-DAD, muito provavelmente pelo fato do sistema de varredura de comprimento de onda (Arranjo de Diodos) apresentar perda de detectabilidade, por trabalhar monitorando vários comprimentos de onda, por seguimento, simultaneamente o que pode levar a diminuição de energia acarretando perda de detectabilidade.

De modo geral o HPLC-UV (LC 920, Varian) possui LD e LQ cerca de 10 e 25 vezes menores quando comparado ao sistema HPLC-UV-DAD (ProStar, Varian).

A precisão dos sistemas foi adequada ao estudo e os valores dos coeficientes de variação (CV) tiveram valor médio de 3,5% e 3,7% para os sistemas HPLC-UV e HPLC-UV-DAD respectivamente, não sendo notada diferença significativa entre ambos. A resolução entre os picos para os dois sistemas cromatográficos foi considerada equivalente.

Vale lembrar que o sistema HPLC-UV utilizou MeOH, enquanto no sistema HPLC-DAD fez-se uso de ACN como um dos componentes da fase móvel, a modificação foi feita devido ao aumento do preço da ACN.

4.3.4 Avaliação do desempenho do novo sistema HPLC-UV para as demais isoflavonas.

Todos os procedimentos de validação analítica que foram anteriormente demonstrados e discutidos para as moléculas de daidzeína e genisteína foram aplicados aos novos padrões (genistina, daidzina, equol, formononetina e biochanina - A). A genisteína e a daidzeína também fizeram parte desse novo experimento, pois

foi importante avaliar a separação das mesmas em relação as demais substâncias, sendo os resultados apresentados por elas similares aos obtidos anteriormente. Portanto, serão apresentados somente os resultados para as demais isoflavonas.

O método apresentou adequada separação para as sete isoflavonas (Figura 61), a construção dos gráficos de intervalo de linearidade e curva analítica também obedeceu aos mesmos critérios adotados para a daidzeína e genisteína (VALENTE, 2006). Os resultados mostraram que apesar do ponto referente à concentração de $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ situar-se dentro do intervalo de linearidade para as cinco isoflavonas em estudo este ponto foi considerado como LD e a concentração de $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ configurou-se como o LQ do método (Figura 62).

O coeficiente de determinação (r^2) obtido para todas as moléculas demonstra valores de $r^2 > 0,99$ (Tabela 16), estando assim dentro dos padrões estabelecidos (AGÊNCIA..., 2003).

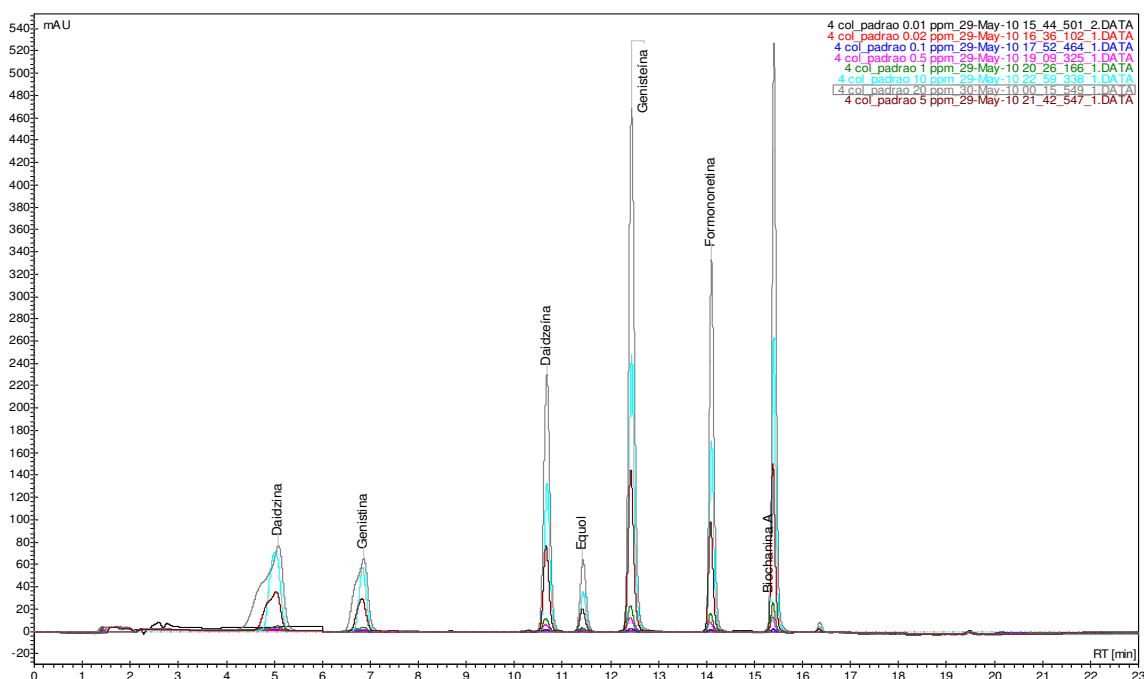


Figura 61: Cromatogramas dos padrões ($0,01$ a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$). Fitoestrógenos daidzina ($t_r= 5$ min), genistina ($t_r= 6,8$ min), daidzeína ($t_r= 10,64$ min), equol ($t_r= 11,38$ min), genisteína ($t_r= 12,38$ min), formononetina ($t_r= 14,07$ min) e biochanina A ($t_r= 15,36$ min).

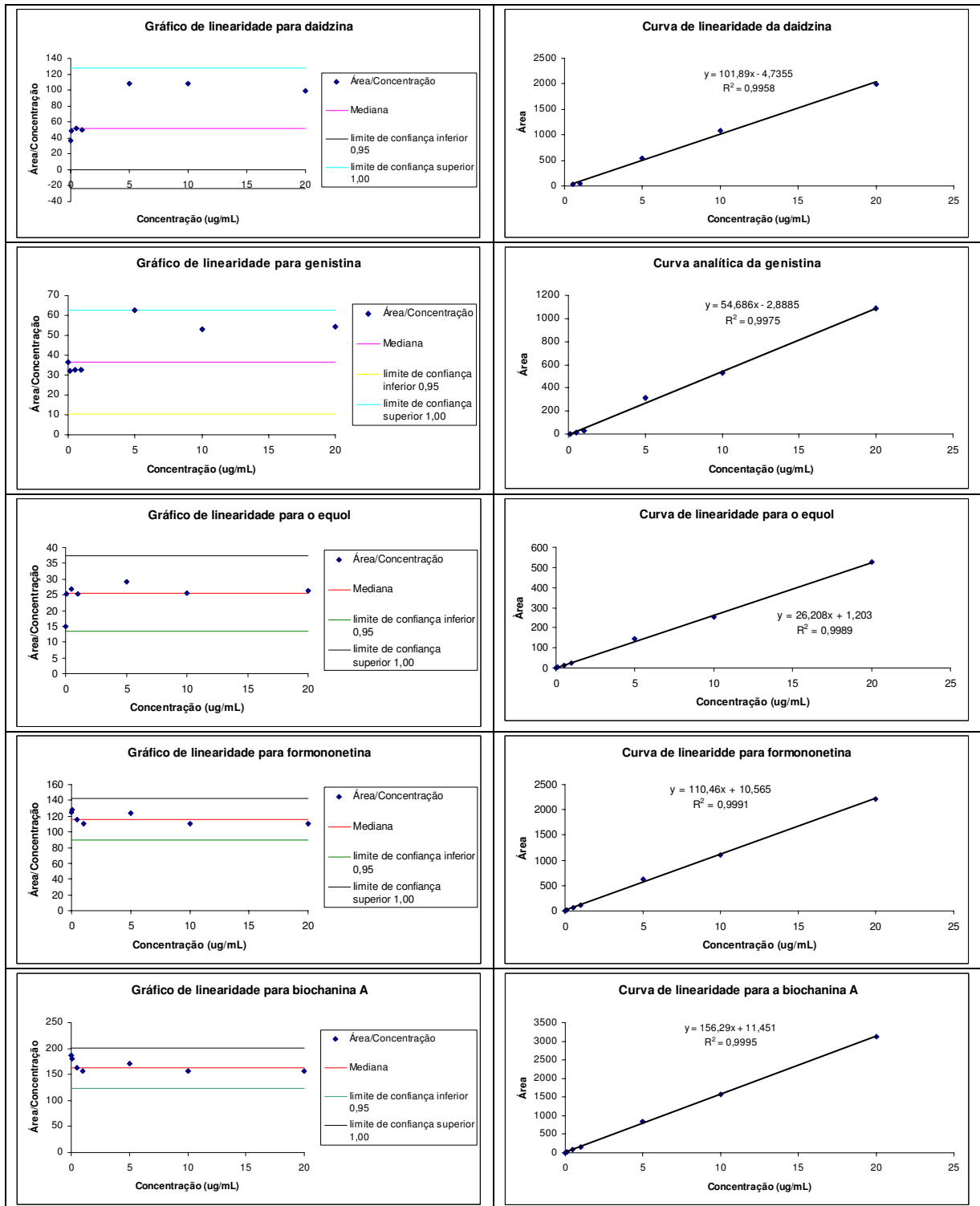


Figura 62: Gráficos de linearidade e curva de linearidade para as demais isoflavonas.

Tabela 16: Resposta do sistema analítico (HPLC-UV).

HPLC-UV LC-920	t_r (min)	Equação da reta (R²)	LD_{eq}	LQ_{eq}
			µg mL⁻¹,	
Daidzina	5,00	y= 101,89x – 4,7355 (0,9958)	0,01	0,02
Genistina	6,8	y= 54,686x – 2,8885 (0,9975)	0,01	0,02
Equol	11,38	y= 26,208x + 1,203 (0,9989)	0,01	0,02
Formononetina	14,07	y= 110,46x + 10,565 (0,9991)	0,01	0,02
Biochanina A	14,36	y= 156,29x +11,451 (0,9995)	0,01	0,02

4.3.5 Estudo de recuperação – água superficial fortificada com os padrões

A exatidão de um método analítico é expressa como a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo, em relação ao valor considerado verdadeiro ou de referência. Este parâmetro da validação analítica pode ser obtido pela análise de um material de referência certificado, que seja similar a matriz de interesse e que tenha certificada a concentração dos analitos em estudo, em um valor próximo à faixa de concentrações que são esperadas nas amostras de campo. Não existindo tal material de referência, como é o caso neste estudo, é permitida a utilização de amostras testemunha* fortificadas com os analitos (RIBANI *et al.*, 2004). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003) recomenda que a exatidão seja determinada utilizando-se três níveis de concentração, contemplando a faixa de linearidade do sistema analítico.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003) é importante reconhecer que o analito presente na amostra pode ter um comportamento diferente

* amostra testemunha = amostra da mesma matriz em estudo (ou similar) na qual os analitos de interesse estão ausentes ou em concentrações muito baixas

(no preparo da amostra que envolve etapas de extração, separação, purificação e concentração), do que quando o mesmo é adicionado sobre a amostra testemunha. Esse fato precisa ser levado em consideração na interpretação do resultado obtido no ensaio de recuperação.

Portanto, neste trabalho foram utilizadas amostras de água de rio para maior semelhança da amostra testemunha com as amostras do estudo ambiental.

Primeiramente os valores de recuperação, precisão e exatidão obtidos para os dois sorventes estudados (C18 e poliestirenodivinilbenzeno-pirrolidona – Strata-X) demonstraram que as recuperações para o Strata X são superiores às do C18 (Tabela 17) nas duas formas de extração realizadas e que a precisão também é melhor, para os dois analitos. Tal fato é devido aos mecanismos de retenção do Strata-X (Figura 63), que consistem de interações π - π e ligação de hidrogênio resultam num sorvente que tem eficiente seletividade para substâncias polares e aromáticas. Além disso, os mecanismos de retenção do Strata-X permitem a lavagem com solvente orgânico (de 5 a 30% de metanol), sem perda dos analitos alvo o que é extremamente útil para eliminar contaminantes que podem interferir na análise.

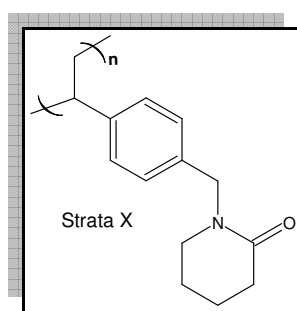


Figura 63: Estrutura química do sorvente Strata X

Tabela 17: Valores de recuperação, precisão e exatidão (n= 3) obtidos para os dois sorventes, em ensaios com amostra de água superficial fortificada com padrões de daidzeína e genisteína

Concentração (ng mL ⁻¹)	Recuperação (%)								
	C18 (pH 3) média ±SD	CV (%)	C18 (pH~7) média ±SD	CV (%)	Strata X (pH 3) média ±SD	CV (%)	Strara X (pH ~7) média ±SD	CV (%)	
Daidzeína	0,7	72 ± 3	4	46 ± 9	20	80 ± 8	10	52 ± 1	2
(ng mL⁻¹)	3,5*	62 ± 0,7	1	49 ± 9	18	80 ± 3	4	54 ± 0,5	1
	3,5*	71 ± 4	5	42 ± 4	9	75 ± 4	4	50 ± 1	2
	70	76 ± 3	4	10 ± 3	24	107±4	4	131 ± 1	1
Genisteína	0,7	69 ± 3	5	30 ± 5	19	89 ± 4	4	36 ± 1	4
(ng mL⁻¹)	3,5*	60 ± 14	23	33 ± 5	14	77± 8	11	35 ± 1	4
	3,5*	45 ± 2	4	33 ± 7	20	86 ± 6	7	31 ± 0,5	2
	70	74 ± 3	4	9 ± 5	58	90 ± 11	13	109 ± 3	3

SD = estimativa do desvio padrão da média; CV = coeficiente de variação.

*Fortificação das amostras de água superficial coletadas em dias diferentes com intervalo de 24 horas. Fator de concentração do método é de 2857 vezes.

A Figura 64 ilustra os cromatogramas da amostra de água de rio enriquecida com 3,5 ng mL⁻¹ de cada analito. Para que houvesse a comparação dos valores de recuperação injetou-se o padrão a concentração de 5 µg mL⁻¹. Também foi injetado a amostra testemunha para que houvesse a garantia de que o método possui adequada seletividade. Nesta fase trabalhou-se com altas concentrações, utilizou-se o sistema HPLC-UV/DAD para a obtenção dos espectros de UV, a comparação entre os espectros obtidos mostrou que os extratos possuíam os mesmos perfis quando comparados ao padrão. Essa visualização foi facilitada por se tratar de altas concentrações de amostra fortificada.

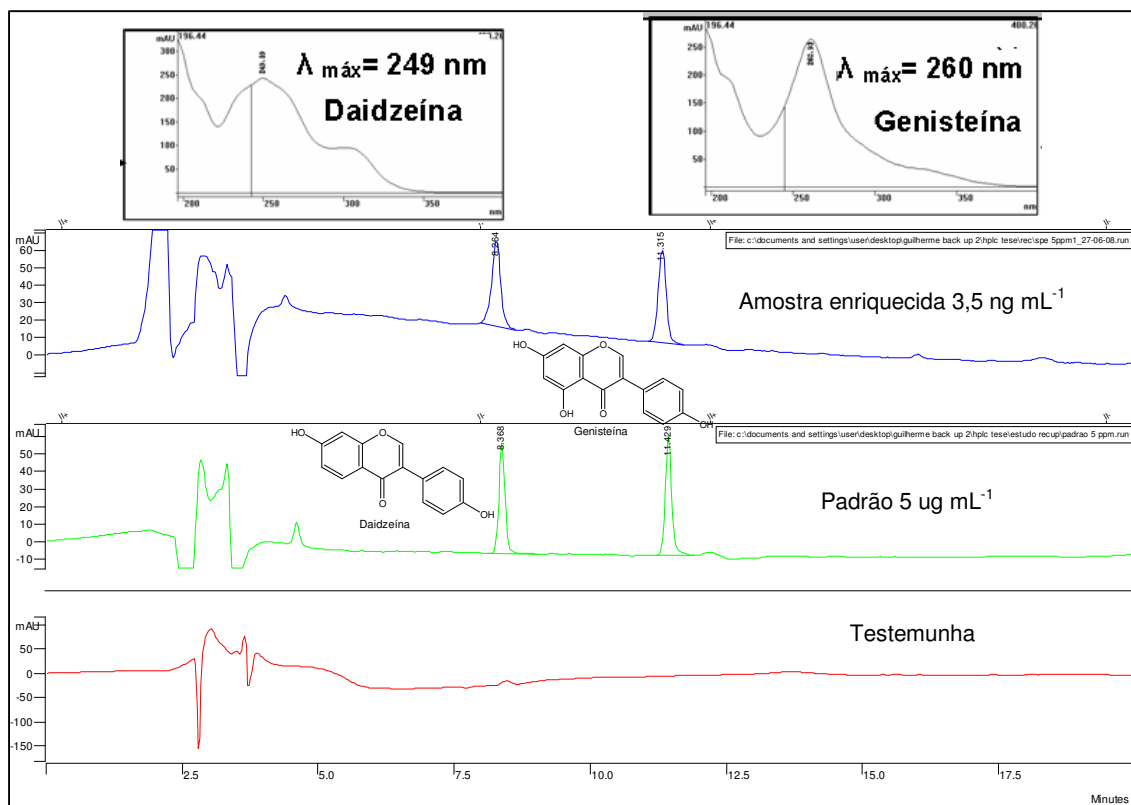


Figura 64: Cromatogramas que ilustram os melhores resultados de recuperação dos analitos. Testes realizados no sistema HPLC-UV-DAD.

Nas Figuras 65, 66 e 67 são apresentados cromatogramas ilustrativos dos dados obtidos no estudo de recuperação do método em água de rio fortificada com genisteína e daidzeína (cromatogramas: branco, testemunha e amostras enriquecidas nas concentrações de 17,5; 35,0 e 350 ng L⁻¹) utilizando-se o sistema HPLC-UV LC920.

Os cromatogramas em preto referem-se aos padrões e os em vermelho referem-se às amostras enriquecidas. Nota-se que a relação entre as áreas de cada cromatograma é de quase 100 % na maioria dos casos.

Os novos testes foram realizados para se obter melhores valores de detectabilidade, para as substâncias em estudo.

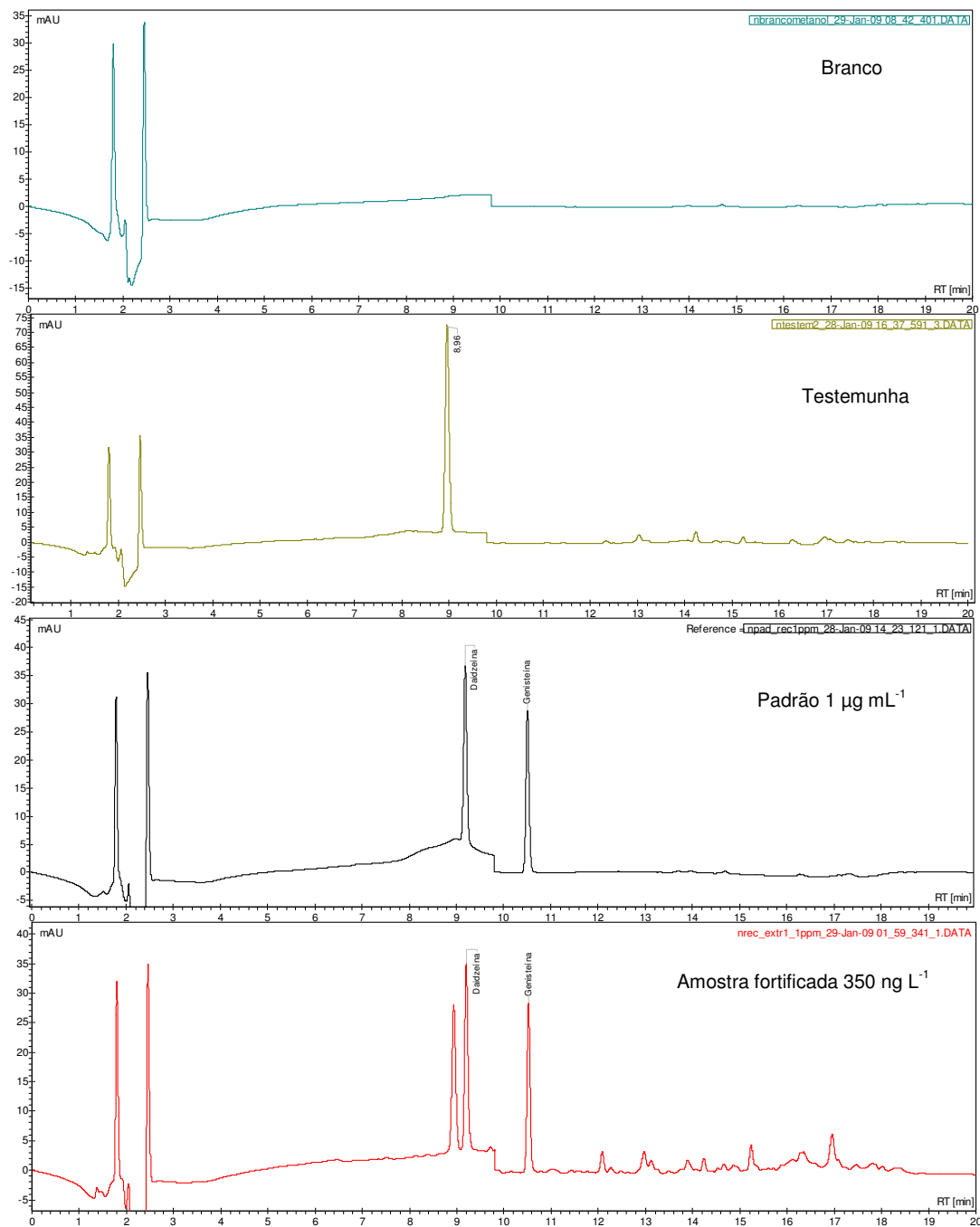


Figura 65: Comparação dos cromatogramas do branco, testemunha, padrão (1 µg mL⁻¹) e amostra fortificada (350 ng L⁻¹). Análises efetuadas no sistema LC920, Varian.

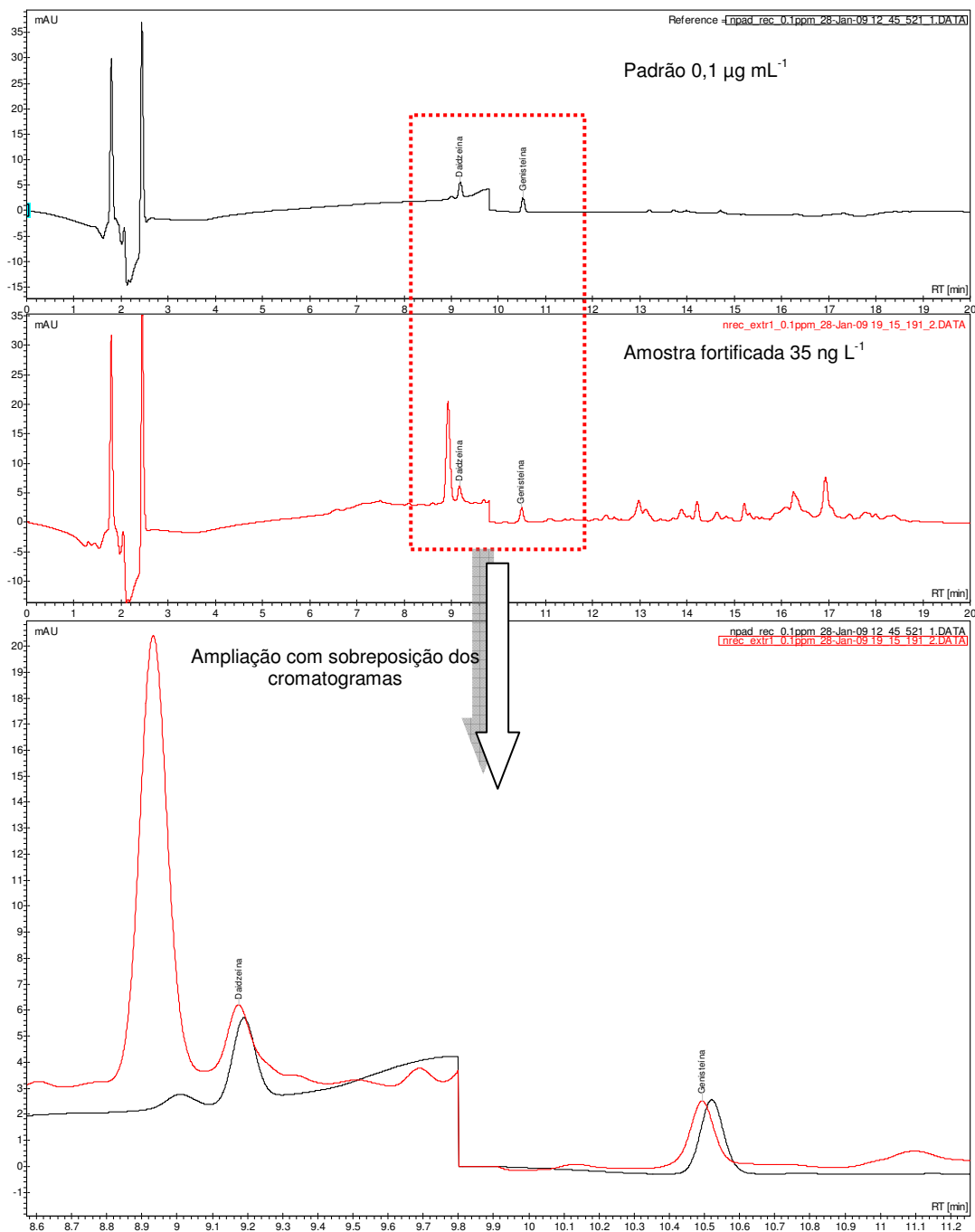


Figura 66: Comparação dos cromatogramas do padrão (0,1 µg mL⁻¹) e amostra fortificada (35 ng L⁻¹) com respectiva ampliação da região de interesse. Análises efetuadas no sistema LC920, Varian.

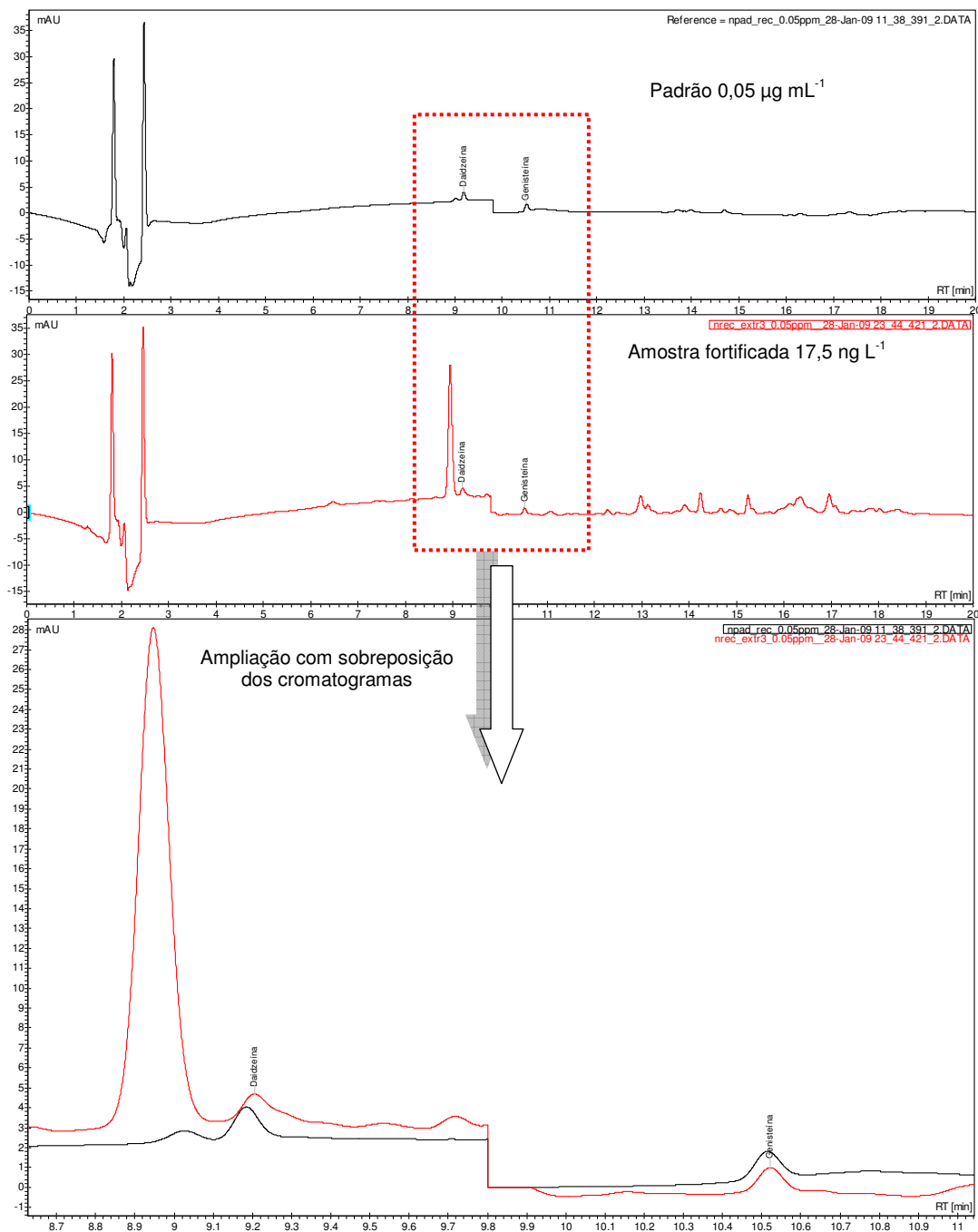


Figura 67: Comparação dos cromatogramas do padrão ($0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$) e amostra fortificada ($17,5 \text{ ng L}^{-1}$) com respectiva ampliação da região de interesse. Análises efetuadas no sistema LC920, Varian.

A Figura 68 apresenta os cromatogramas do branco, testemunha e de novos níveis de fortificação que foram testados com o objetivo de ampliar a faixa de abrangência do método. As novas faixas de fortificação (Tabela 18) contendo as

sete substâncias tinham as seguintes concentrações 10,5, 17,5, 35, 350, 1750 e 3500 ng L⁻¹.

Na Tabela 18 estão apresentados os valores de recuperação, precisão e exatidão obtidas no estudo de recuperação realizado.

Tabela 18: Recuperação média obtida a partir da análise de água de rio fortificada com os analitos (n=3)

	% Recuperação (CV, %)					
	Nível de fortificação (ng L ⁻¹)*					
	10,5	17,5	35,0	350,0	1750,0	3500,0
Daidzina	92 (13)	na	na	80 (9)	77 (5)	101 (4)
Genistina	90 (16)	na	na	93 (19)	73 (7)	100 (3)
Daidzeína	96 (7)	98 (2)	95 (10)	106 (2)	89 (4)	101 (2)
Equol	95 (9)	na	na	74 (6)	81 (6)	100 (3)
Genisteína	97 (5)	82 (3)	89 (5)	99 (1)	80 (4)	102 (3)
Formononetina	97 (5)	na	na	86 (8)	91 (4)	102 (2)
Biochanina A	96 (6)	na	na	79 (10)	86 (5)	101 (1)

(CV, %) = coeficiente de variação em %.

*Fortificação das amostras de água superficial, na = não avaliado. Fator de pré-concentração = 2857

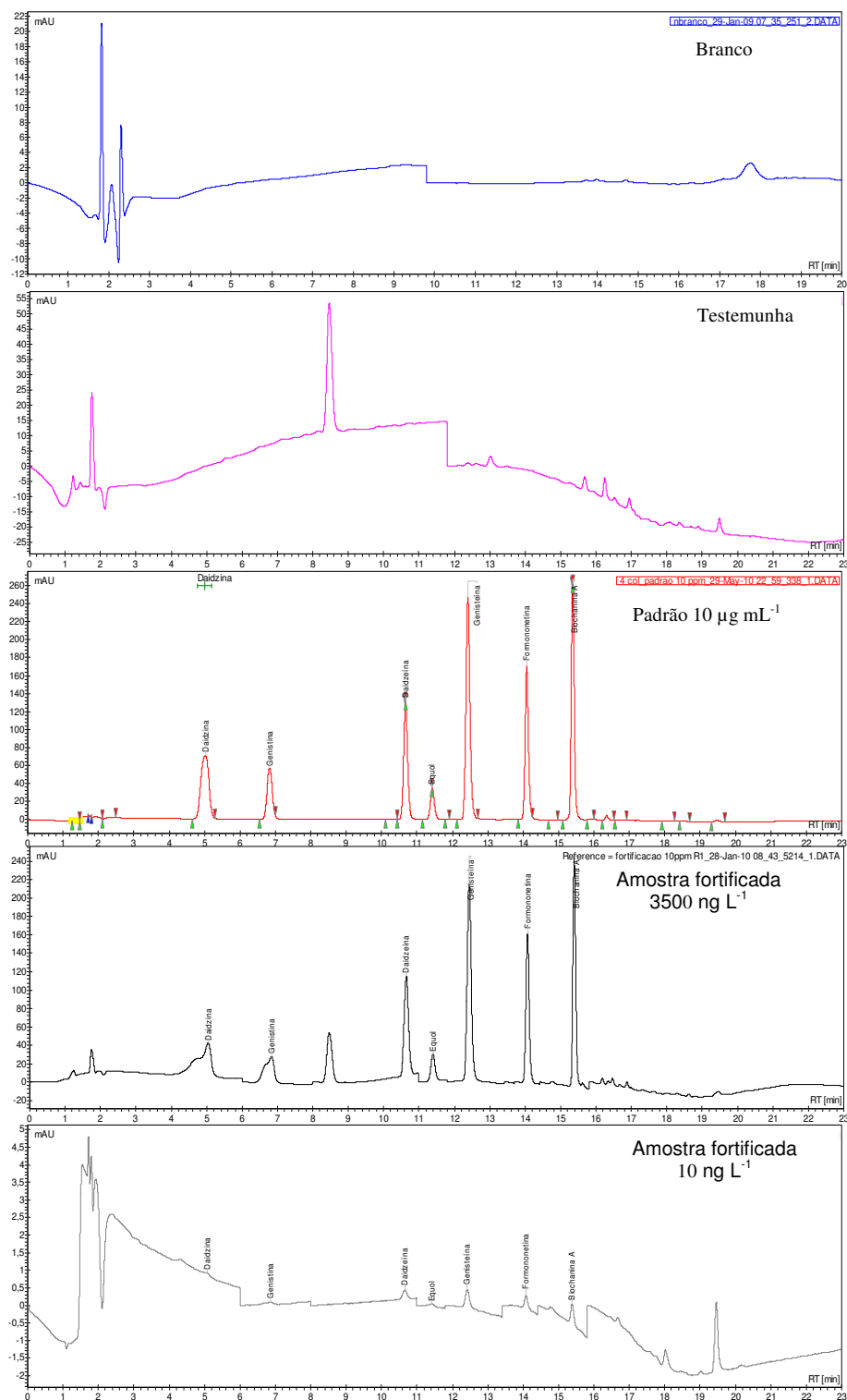


Figura 68: Comparação dos cromatogramas do padrão (10 µg mL⁻¹), branco, testemunha e amostras enriquecidas com os fitoestrogenos daidzina ($t_r= 5$ min), genistina ($t_r= 6,8$ min), daidzeína ($t_r= 10,64$ min), equol ($t_r= 11,38$ min), genisteína ($t_r= 12,38$ min), formononetina ($t_r= 14,07$ min) e biochanina A ($t_r= 15,36$ min).

De acordo com Thier (1987), o limite de quantificação do método é definido como a menor concentração da amostra fortificada que apresenta recuperação entre 70 -120% e CV < 20%. Desta maneira, a partir do estudo de recuperação do método foi possível estabelecer o limite de quantificação que foi de 10,5 ng/L para as isoflavonas em água de rio e água sub-superficial.

O método proposto neste trabalho atende aos requisitos descritos por Sabik *et al.* (2000) como sendo ideais: rapidez, precisão, exatidão e baixo consumo de solvente.

Na Tabela 19 compara-se o método proposto neste trabalho com outros publicados na literatura. Os limites de detecção e quantificação do método aproximam-se dos obtidos em sistemas LC-MS/MS, sendo que a exatidão do método é similar, ou melhor, do que os encontrados na literatura. Cabe salientar que no preparo da amostra a fase estacionária utilizada (Strata X, Phenomenex) é cerca de 30% mais barata do que a utilizada nos trabalhos encontrados (Oasis, Waters). O sistema analítico utilizado em todos os trabalhos encontrados é o LC-MS/MS, que pode custar 10 vezes ou mais do que um sistema HPLC-UV, sendo também de manutenção mais dispendiosa.

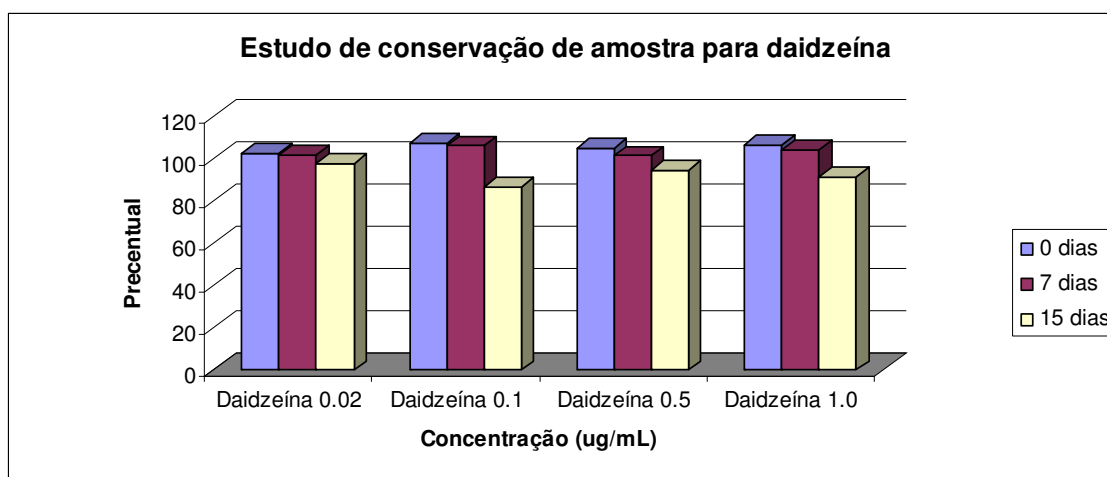
Tabela 19: Comparação entre métodos descritos na literatura com método proposto para determinação de genisteína e daidzeína em água superficial.

Substância	Preparo da amostra	Técnica analítica	Recuperação (CV%)	LD _{método} / LQ _{método} (ng L ⁻¹)	Referência
Genisteína Daidzeína	EFS (Strata X)	HPLC-UV	82-99 (1-10) 95-106 (1-5)	3,5 / 10,5 3,5 / 10,5	Este trabalho
Genisteína Daidzeína	EFS (OASIS)	LC/ESI/ MS/MS	73-133 (1-11) 63-99 (1-16)	0,5 / 2,6 0,5 / 2,7	Erbs et al., 2007
Genisteína Daidzeína	EFS (OASIS)	LC/ESI- MS ⁿ	85-95 (3,9-6,5)	0,1 / 5,0	Kang et al., 2006
Genisteína Daidzeína	EFS (OASIS)	LC/ESI/ MS/MS	>80 (nr) >80 (nr)	nr nr	Lagana et al., 2004
Genisteína Daidzeína	EFS (OASIS)	LC/ESI/ MS/MS	87 (nr) 62 (nr)	nr nr	Kawanishi et al., 2004

nr = não relatado. EFS =: extração em fase sólida.

4.3.6 Estudo de estabilidade da amostra

Os resultados apresentados para o estudo de conservação da amostra para o período de 0, 7 e 15 dias demonstrou que as amostras de daidzeína e genisteína têm um comportamento estável quando mantidas em cartuchos de Strata X por um período de 15 dias. Os resultados demonstrados pelas Figuras 65 e 66 apresentam níveis de conservação para a daidzeína na faixa de 86 a 108% e para a genisteína de 89 a 114 % dentro do período estudado para as quatro diferentes concentrações.

**Figura 69:** Nível de conservação para a daidzeína.

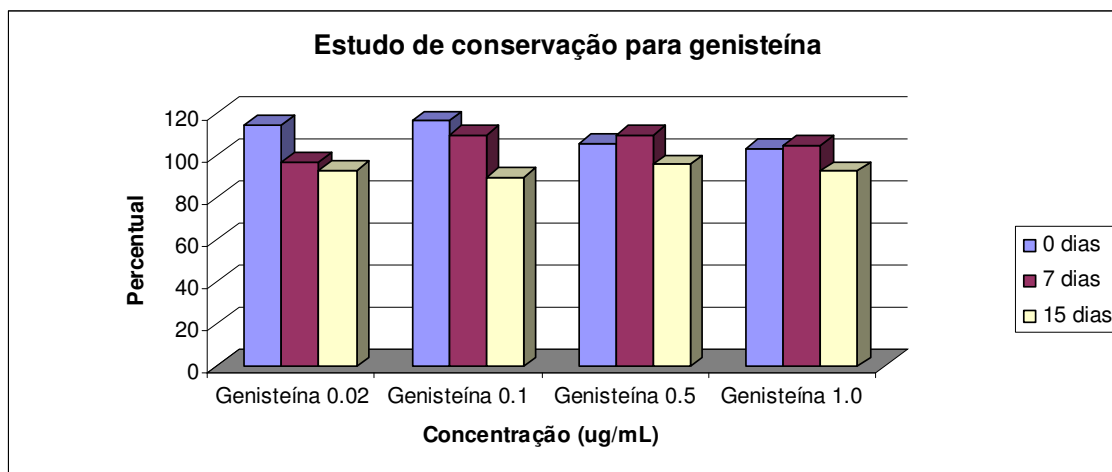


Figura 70: Nível de conservação para a genisteína.

4.4 Estudo ambiental: análises químicas e testes biológicos - Análise das amostras ambientais

As amostras ambientais foram coletadas no rio Dourados nos meses de abril, agosto, dezembro de 2009 e em abril de 2010, em quatro diferentes locais de coleta apresentados na Figura 71: ponto relativo à plantação de soja (PAQ – próximo a margem e PAE – distante da margem do rio), pontos depois da plantação – (DAQ - próximo a margem e DAE – distante da margem) e pontos antes da plantação – (AAQ - próximo a margem e AAE – distante da margem) e ponto Fazenda (afloramento do lençol freático – água utilizada para irrigação na fazenda experimental de soja da UFGD) todas as quatro coletas totalizaram ao todo 108 amostras que foram analisadas em triplicatas.



Figura 71: Pontos de coleta de amostra nos anos de 2009 e 2010.

Para a determinação dos locais de coletas levaram-se em consideração todas as possíveis fontes a serem estudadas de maneira que a influência de zonas urbanas fosse completamente descartada, pois o objetivo do estudo é medir o impacto ambiental somente da cultura da soja. A Figura 72 demonstra de maneira simplificada quais as fontes poderiam ser responsáveis pela contaminação ambiental das isoflavonas em questão na região de coleta. Todas as possíveis fontes foram levadas em consideração no momento do planejamento da coleta para que fosse evitada a influência de áreas urbanas. De acordo com a Figura 71, pode-se constatar que o local de coleta de amostra se deu em área estritamente rural, afastada de fatores de contaminação ligados a cidade de Dourados. Antes da realização da coleta realizou-se ainda averiguação, para saber se existia alguma empresa ligada atividade agroindustrial naquela região, portanto todos os resultados

relativos aos impactos ambientais seguramente estão ligados a atividades agrícolas que predominam na região onde foram coletadas as amostras.

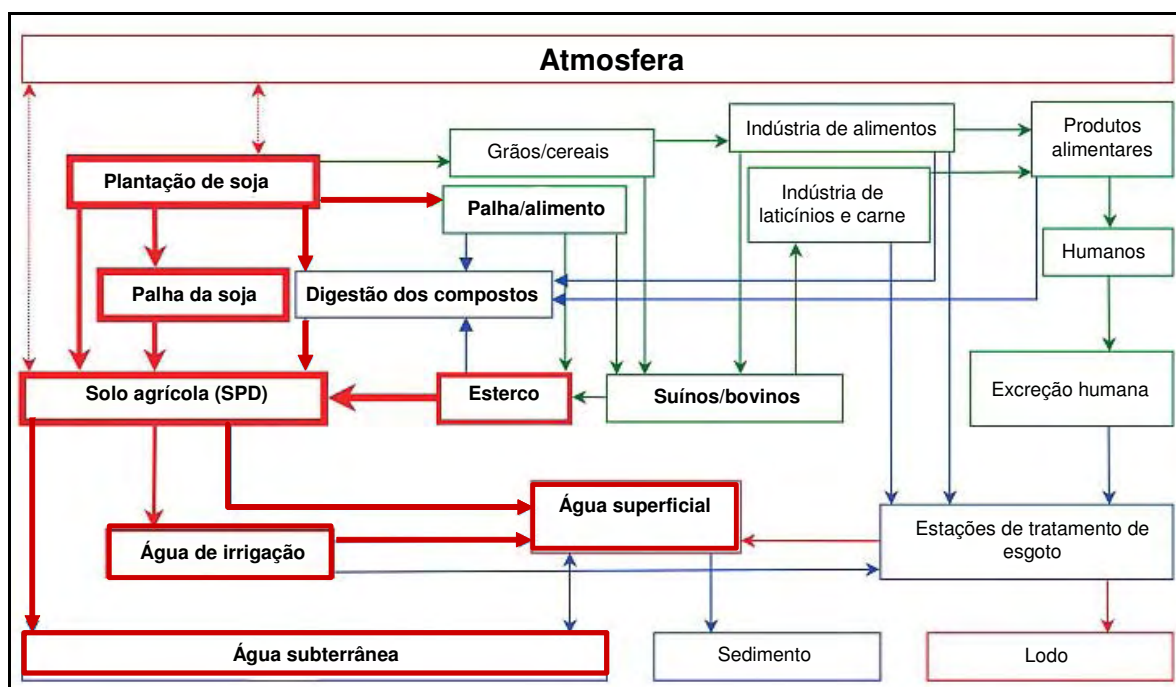


Figura 72: Sugestão para a distribuição ambiental das isoflavonas: os compartimentos na cor vermelha indicam o foco deste estudo. As linhas vermelhas pontilhadas: indicam onde a contaminação por isoflavonas provavelmente não ocorre. As linhas em verde e azul: não foram investigados principalmente porque se trata de um estudo em área rural (adaptado de HARTMANN *et al*, 2008).

Durante todo o período de investigação a genisteína (GEN) foi a substância mais representativa em termos de frequência e ocorrência (54 detecções em 108 amostras, ou seja, 50%), Tabelas 1, 2, 3 e 4 do Apêndice.

Daidzina (DAID) e genistina (GENIS), não foram detectadas em nenhuma das 108 amostras analisadas. A ausência desses isoflavonóides glicosilados vem de encontro aos resultados obtidos nas análises quantitativas da palha de soja, onde os valores encontrados mostraram que a ausência dessas substâncias muito provavelmente se deve à degradação microbiana responsável pela hidrólise dos glicosídeos vindos do material vegetal que é naturalmente depositado no solo em sistemas de plantio direto (SPD). Essa técnica é amplamente utilizada não só no estado do MS assim como em todo o país. Sendo assim, a ausência de DAID e

GENIS em todas as amostras de água superficial analisadas é coerente com a dinâmica de contaminação ambiental que é proposta neste trabalho, sendo, portanto forte evidência de que a palha de soja configura-se como a principal fonte de contaminação ambiental causada por processos de lixiviação tendo como vetores a irrigação e as chuvas.

As demais moléculas estudadas daidzeína (DAI), equol (EQ), formononetina (FOR) e biochanina-A (BIO), foram detectadas em 19, 16, 34 e 22% de todas as amostras coletadas nas quatro campanhas, respectivamente (Tabelas 1, 2, 3 e 4 do Apêndice). Sendo importante ressaltar que as maiores incidências e as maiores concentrações das isoflavonas foram encontradas nos meses de dezembro de 2009 e abril de 2010. O percentual de amostras que tinham pelo menos uma isoflavona detectada no ponto de coleta nos meses de abril e agosto de 2009 foi de 20 % do total de amostras analisadas, enquanto que para o mês de dezembro de 2009 e abril de 2010 esse percentual aumentou para 90% das amostras analisadas. A Figura 73 sumariza esse conjunto de dados obtidos durante todo o estudo e permite visualizar de forma geral o comportamento dos contaminantes durante todo período de coleta (gráfico *Box Plot*). As explicações mais detalhadas para a detecção das isoflavonas em cada mês de coleta serão dadas abordando os fatores químicos intrínsecos a cada molécula, correlacionados também aos fatores climáticos que são determinantes na dinâmica de contaminação na região de estudo. Alguns cromatogramas ilustrativos dos estudos são apresentados no Apêndice D (p.185).

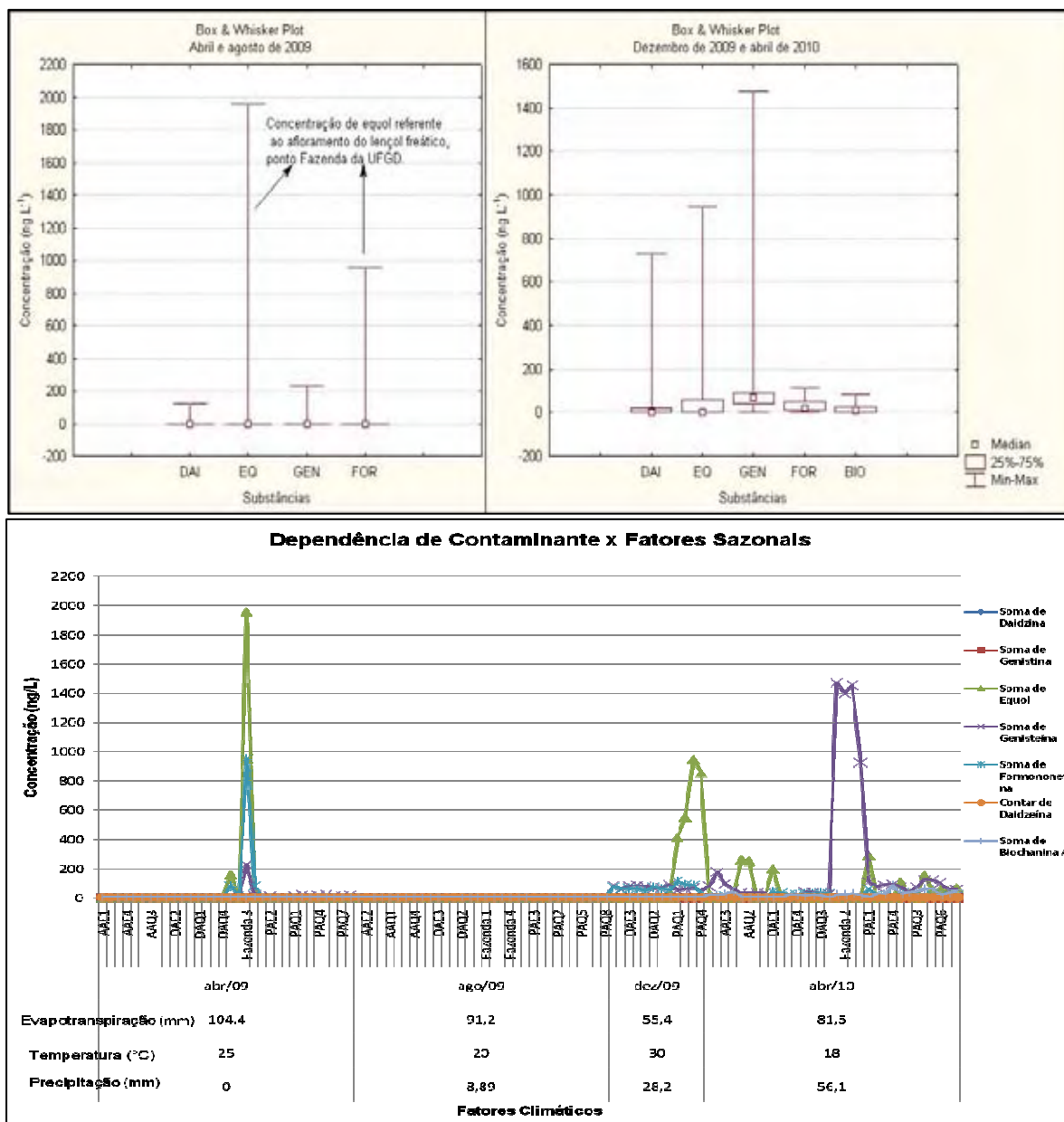


Figura 73: Visão geral da contaminação por isoflavonas levando-se em consideração as concentrações das isoflavonas e os fatores sazonais envolvidos.

Legendas – **AAE**: ponto de coleta antes da plantação afastado da margem do rio, **AAQ**: ponto de coleta antes da plantação próximo a margem do rio, **PAE**: ponto de coleta plantação afastado da margem do rio, **PAQ**: ponto de coleta plantação próximo a margem do rio, **DAE**: ponto depois da plantação afastado da margem do rio e **DAQ**: ponto depois da plantação próximo a margem do rio. **Fazenda**: ponto de coleta de água subsuperficial na fazenda da UFGD.

4.4.1 Primeira coleta

Na primeira coleta realizada nos dias 17 e 18 de abril de 2009 nos deparamos com um fato incomum, o período de abril caracterizou-se como um mês de seca, tendo em vista que os dados históricos relatam uma precipitação média para este mês de 110 mm, contra 0 mm de chuva para o mesmo período de 2009 (PEREIRA *et*

al., 2007). Como conseqüência de um período tão seco o valor total do processo de evapotranspiração foi 28% maior quando comparado ao mesmo período de 2008, o que somado à ausência de chuvas acarretou numa menor taxa de recarga de água subterrânea. A conseqüência dessa variação climática desfavorável foi a concentração dos contaminantes presentes nessa fonte de água. A temperatura média para o período ficou em torno de 25 °C, com mínimas de 20 °C e máximas em torno de 32 °C, valores favoráveis à atividade microbiana. Todos estes dados foram obtidos da estação metereológica da UFGD e são apresentados na Figura 74 (MATO GROSSO DO SUL, 2009).

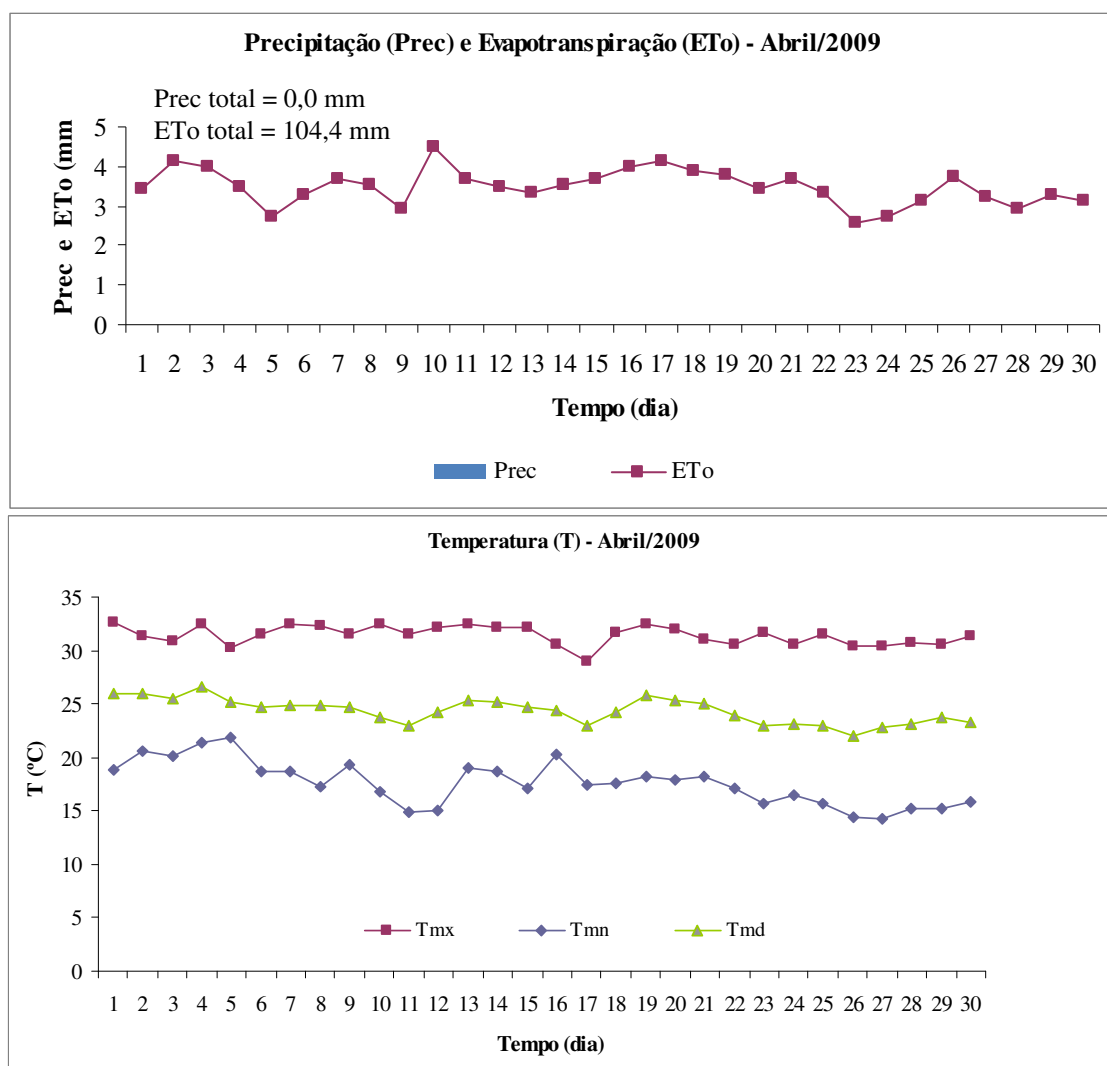


Figura 74: Taxas diárias de precipitação, evapotranspiração e temperaturas (Tmx =temperatura máxima, Tmn= temperatura mínima e Tmd= temperatura média) para o mês de abril de 2009 (MATO GROSSO DO SUL, 2009).

O mês de abril é normalmente o período de colheita da soja e de preparo do solo utilizando para isso sistemas de plantio direto e sucessão de cultura. É, portanto um dos meses onde grande quantidade de palha de soja é depositada no meio ambiente, assim esperava-se obter uma concentração significativa de isoflavonas especialmente nos rios. Porém, devido aos fatores climáticos anômalos, a dinâmica de contaminação foi alterada, tendo em vista que o processo de lixiviação das isoflavonas neste mês somente pode ser correlacionado com a irrigação das lavouras. Neste caso, o maior impacto ocorre nas águas do lençol freático, que no caso da região da Bacia do Rio Dourados possui menor profundidade, sendo conseqüentemente mais susceptível a contaminação.

As concentrações no ponto plantação próximo à margem do rio (pontos PAQ1 a PAQ8) apresentaram concentrações de GEN na faixa de 11,0 – 23,4 ng L⁻¹. Em todos os demais pontos do rio investigados (Tabela 1 Apêndice) com exceção dos pontos PAE2, AAQ1 e AAQ3 (ponto plantação afastado da margem e ponto antes da plantação) as concentrações de GEN foram de 12,6, 14,1 e 14,5 ng L⁻¹. As demais isoflavonas, BIO e FOR e EQ não foram detectadas em nenhum dos pontos coletados ao longo do rio. Tais resultados podem ser explicados devido ao fato do valor de log Kow dessas substâncias serem ligeiramente maiores do que a GEN (Tabela 2 p.48) fazendo com que a BIO, a FOR e o EQ sofram uma maior adsorção ao solo retardando assim o efeito de lixiviação dessas substâncias para o Rio Dourados. A não detecção de DAI pode ser atribuída ao valor de meia-vida dessa molécula em águas naturais (Tabela 2 p.48) que é um pouco menor e revela na verdade o caráter mais instável dessa molécula. A literatura associa a degradação da DAI por microrganismos com a formação do potente fitoestrógeno equol, o que também pode explicar a ausência da DAI em decorrência da degradação da mesma.

Além de toda a discussão em torno dos mecanismos envolvidos na lixiviação das isoflavonas, é importante notar que os pontos de coleta anteriores à plantação (pontos AAQ e AAE), que possuem um alto adensamento de mata ciliar (Figura 71 p. 127) é um local aonde a presença de isoflavona foi quase nula, o que sugere que a mata ciliar é eficiente na retenção destas substâncias, configurando uma barreira natural principalmente no que diz respeito, neste caso, ao único vetor de contaminação que é a água de irrigação. Portanto, constata-se que a manutenção de grandes adensamentos de matas ciliares configura-se em importante fator de redução de impacto ambiental nas águas dos rios.

Em contraste com os resultados discutidos anteriormente as amostras de água obtidas do afloramento do lençol freático em meio à plantação de soja, coletadas na fazenda da UFGD, apresentaram alta concentração de fitoestrógenos (Tabela 1 Apêndice). As faixas de concentração para a DAI, EQ, GEN e FOR estavam entre 20 – 123,9, 161,4 – 1957,3, , 16,6 – 230,5 e 14,8 – 952,5 ng L⁻¹, respectivamente. Em nenhuma das amostras foi identificada a BIO. A baixa taxa de recarga do lençol freático que é demonstrada pela alta taxa de evapotranspiração (Figura 74) e o aumento da irrigação no período contribuiu para que as isoflavonas, em especial o EQ, fossem lixiviadas para as águas do afloramento do lençol sendo posteriormente encontrada em alta concentração, devido ao baixo volume de água no afloramento do lençol freático neste período.

A relevância dos valores encontrados nestes pontos, mesmo em época de seca não é desprezível, pois são mais altos que os descritos anteriormente por Kawanishi *et al.* (2004) em Osaka no Japão (143 ng L⁻¹ para genisteína e 43 ng L⁻¹ para a daidzeína).

Estudos em peixes da espécie, medaka japonês (*Oryzias latipes*), revelaram que quando essa espécie de peixe é exposta a concentrações no intervalo de 400 – 800 ng L⁻¹ de EQ (um metabólito de degradação originário da FOR e DAI) e a 1000 µg L⁻¹ de GEN há uma incidência de *intersex* gonadal em peixes, que ocorreu em 87% e 12% dos casos, respectivamente (KIPARISSIS *et al.*, 2003).

Os dados são preocupantes, principalmente devido às altas concentrações de EQ na amostra que estão na ordem de µg L⁻¹ no afloramento do lençol freático, valores maiores do que de áreas altamente urbanizadas.

Testes de estrogenicidade *in vitro* (RYA) foram realizados para todos os pontos de coleta nos diferentes períodos do ano para que pudéssemos discutir o papel da sazonalidade frente ao impacto dos fitoestrógenos no Rio Dourados. Tais resultados serão discutidos numa seção a parte intitulada “Testes de estrogenicidade (RYA)”.

4.4.2 Segunda coleta

O cenário que encontramos na segunda coleta, realizada no dia 13 de agosto de 2009, foi de um mês caracterizado até então por precipitação de 8,89 mm (vide Figura 75), um valor de evapotranspiração relativamente menor, o que contribuiu para que houvesse nesse período maior recarga de água nos lençóis freáticos. As médias de temperaturas atingindo valores também mais baixos, se comparados ao mês de abril de 2009, o que também contribuiu para o menor valor da taxa de evapotranspiração.

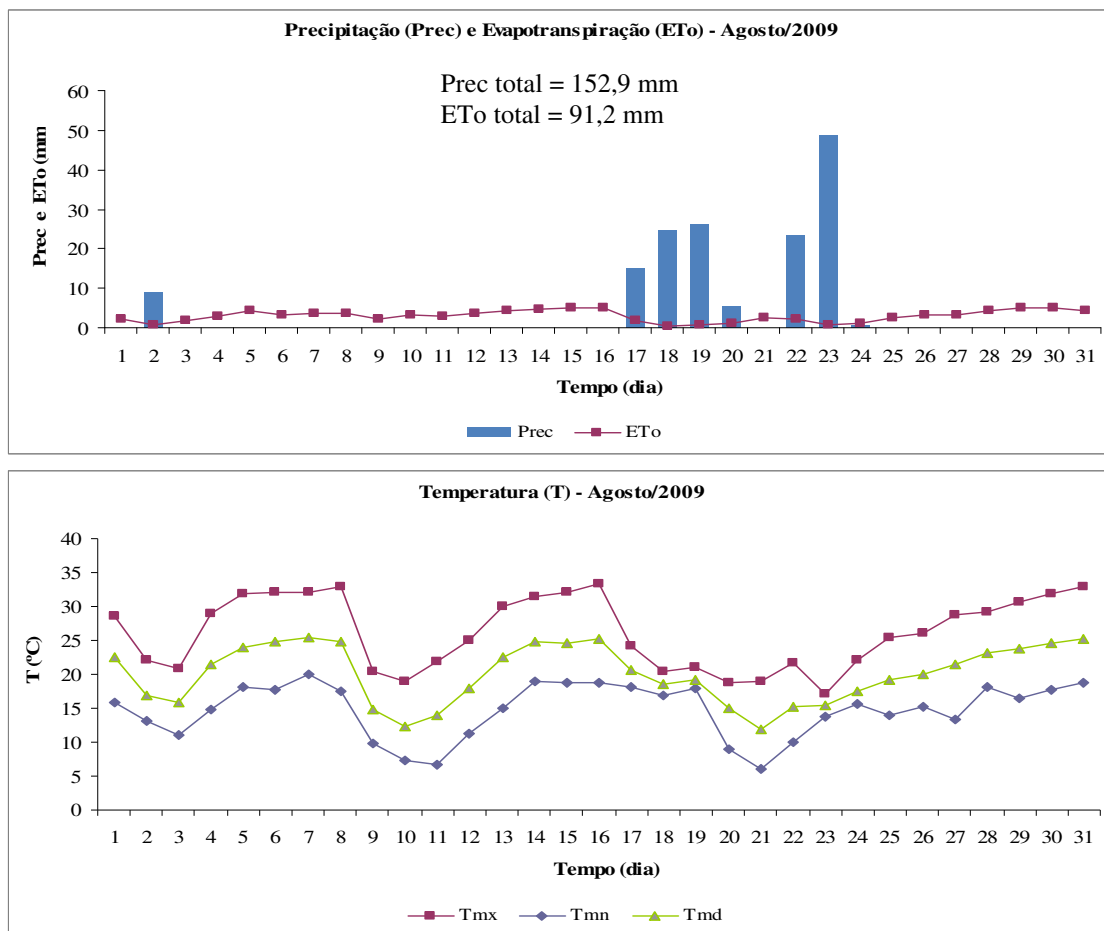


Figura 75: Taxas diárias de precipitação, evapotranspiração e temperaturas (Tmx =temperatura máxima, Tmn= temperatura mínima e Tmd= temperatura média) para o mês de agosto de 2009 (MATO GROSSO DO SUL, 2009).

Os resultados obtidos para o período estão apresentados na Tabela 2 do apêndice, verificou-se que para o mês de agosto de 2009 que o nível de contaminação pelas isoflavonas não foi detectável, ou seja, não houve detecção de quaisquer substâncias nos corpos d' água estudados. Tal fato pode ser justificado pelo esquema de uso e ocupação do solo, que de maneira geral, pode ser descrito da seguinte forma: o sistema de plantio na região de Dourados predomina a agricultura com espécies anuais durante o verão (soja e algodão), e na estação de seca são cultivadas pastagens como aveia, sorgo forrageiro ou milheto, que são usadas para alimentação dos animais neste período e, retornando a lavoura na safra do verão seguinte no Sistema Plantio Direto (SPD). O Sistema de Integração iniciou-

se pela necessidade de fazer rotação de culturas com a soja e também pela necessidade de armazenar água através de coberturas ocasionada pela ocorrência de veranicos freqüentes nessa região.

Nas propriedades, adotam-se em geral os seguintes manejos: no verão um quarto da área é formado com pasto perene, dois quartos com soja e um quarto com algodão, sempre em sistema de rodízio.

No inverno, é semeado com o milho safrinha a pastagem. Após a colheita do milho, a área é liberada para o pastejo dos animais. Um quarto dessa área se torna pasto perene e os outros três quartos são destinados para o plantio direto de soja e algodão.

Em abril/maio ocorre o processo de semeadura das pastagens após a colheita da soja e algodão. Este período corresponde entre safra da soja e época crítica para a pecuária (abril a setembro). Sendo assim, o peso da cultura da soja na contaminação ambiental por isoflavonas é bastante reduzido nessa época o que justifica a ausência dessas substâncias na água dos rios e afloramento do lençol freático. A descrição do sistema agrícola não significa que não exista isoflavonas no solo ou na palha de soja, pois os resultados obtidos pela análise da palha de soja, coletada em agosto de 2009 comprovam a existência dessas substâncias. A não detecção de isoflavonas em agosto se deve muito mais pela ausência de chuvas e a rotação de culturas que contribuem para uma menor taxa de percolação e lixiviação dessas substâncias, pois os sistemas de irrigação também são menos freqüentes. Mesmo não tendo sido encontrada nenhuma isoflavona em toda a amostragem realizada, a segunda coleta foi submetida ao teste de estrogenicidade (RYA), tais resultados também serão discutidos em momento oportuno.

4.4.3 Terceira coleta

A terceira coleta ocorreu no dia 17 de dezembro de 2009 e os dados climáticos para o período são apresentados na Figura 76, os quais demonstram um valor de 298,2 mm de chuva acumulada até o dia da amostragem. O valor da evapotranspiração até a data da coleta foi de 55,4 mm, valor bastante favorável à taxa de recarga do lençol freático quando comparado, por exemplo, com o mês de abril de 2009. Trata-se também de um mês com altas temperaturas onde se presume que a atividade microbiológica é provavelmente maior.

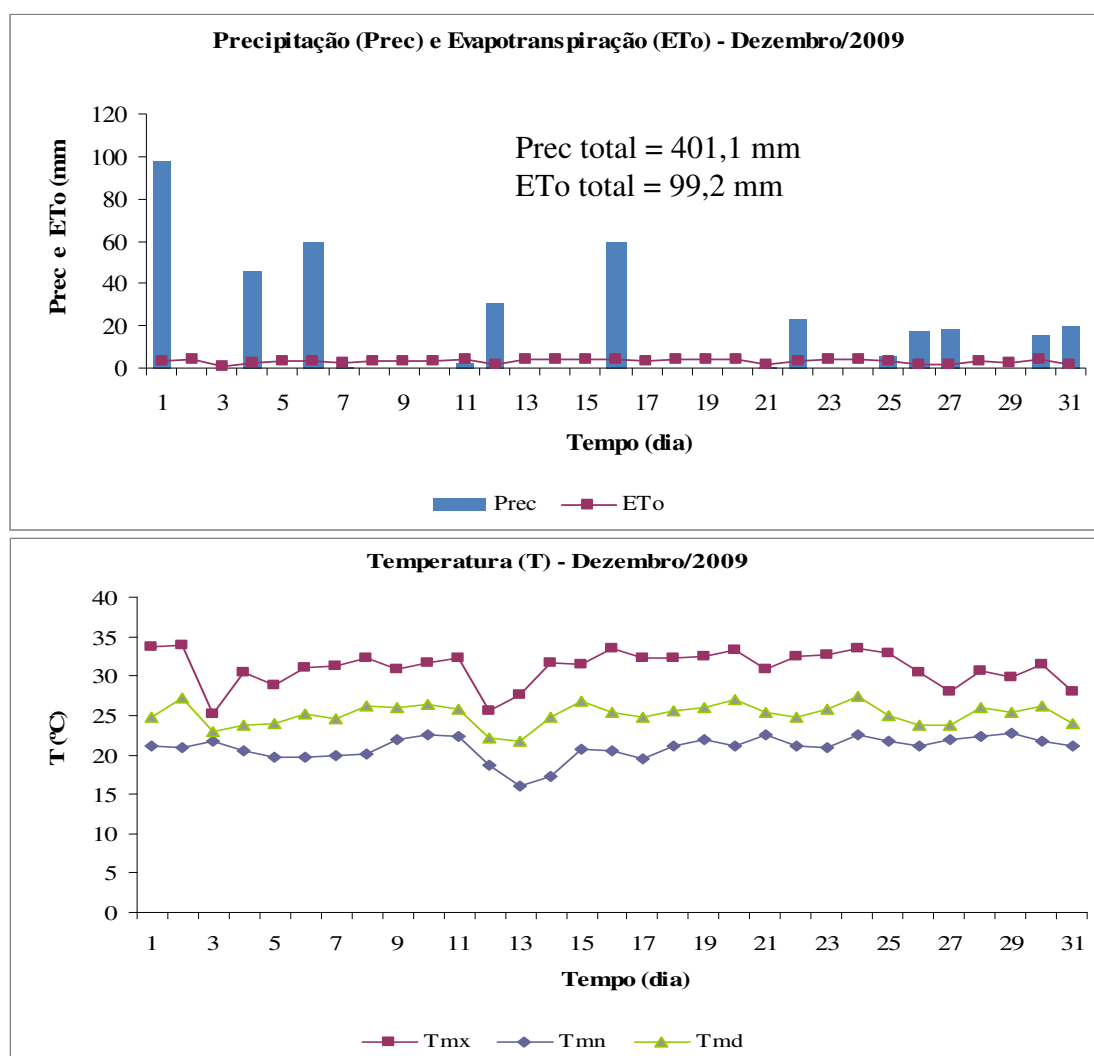


Figura 76: Taxas diárias de precipitação, evapotranspiração e temperaturas (Tmx =temperatura máxima, Tmn= temperatura mínima e Tmd= temperatura média) para o mês de dezembro de 2009 (MATO GROSSO DO SUL, 2009).

Como o mês de dezembro apresentou um volume de chuvas muito grande houve problemas relacionados à logística da coleta de amostras, pois o nível do Rio Dourados estava muito acima da média e as condições de navegação também estavam muito desfavoráveis, o que comprometeu a coleta dos pontos plantaço (PAQ5 a PAQ8 e PAE1 a PAE4). Os pontos situados antes da plantaço (AAQ1 a AAE4) também não foram coletados (vide Tabela 3 Apêndice). Por problemas ocorridos na estrada que dava acesso a fazenda da UFGD, a água do afloramento do lençol freático não foi coletada. Portanto, a discussão dos dados ocorrerá apenas em relação ao ponto plantaço (PAQ1 a PAQ4) e ponto depois da plantaço (DAQ1 a DAE4).

As amostras estudadas forneceram resultados interessantes (Tabela 3 Apêndice) quanto à ocorrência e intensidade das isoflavonas. No conjunto das doze amostras analisadas a GEN e FOR estavam presentes em 100% das amostras, enquanto DAI e EQ foram encontrados em 16,7 e 33,3%, dos casos estudados. A BIO não foi detectada nessas amostras, provavelmente por problemas relacionados à hidrofobicidade e/ou estabilidade desta molécula (Tabela 2, p. 48).

O ponto plantaço coletado próximo à margem do rio apresentou altas concentrações de DAI (667,6 – 730,0 ng L⁻¹), EQ (415,0 – 945,8 ng L⁻¹), GEN (46,7 – 70,1 ng L⁻¹) e FOR (32,0 – 115,0 ng L⁻¹). Especialmente no caso das concentrações de EQ existe grande possibilidade que haja nessa faixa de concentração atividade estrogênica ligada ao fenômeno de *intersex* em peixes como relata a literatura (KIPARISSIS *et al.*, 2003).

No ponto depois da plantaço foi detectado apenas GEN e FOR em altas faixas de concentração da ordem de 62,4 – 89,5 ng L⁻¹ e 48,7 – 75,5 ng L⁻¹ respectivamente.

As concentrações encontradas neste período para os fitoestrógenos nos diferentes pontos de coleta também são preocupantes, pois superam os valores encontrados em áreas urbanas (LAGANÀ *et al.*, 2004).

Erbs *et al.* (2007) investigaram a presença de isoflavonas em água de irrigação em regiões de pastagem e plantação de grãos. O estudo relata a presença de isoflavonas na faixa de concentração entre 4 a 157 ng L⁻¹ em água de drenagem em campos de pastagem de trevo vermelho (planta rica em isoflavonas).

A comparação do presente estudo aos dados obtidos por Erbs *et al.* (2007) deixa claro que o sistema de plantio direto é responsável pela biodisponibilização das isoflavonas no meio ambiente sendo, portanto, a palha de soja o principal meio emissor desses fitoestrógenos.

De acordo com a dinâmica de plantio já discutida podemos afirmar que o mês de dezembro, em se tratando de um mês de plantio de soja e de precipitação mais intensa, caracteriza-se como um período de maior emissão de isoflavonas no rio e as chuvas são as maiores responsáveis pela lixiviação dessas substâncias.

4.4.4 Quarta coleta

A quarta e última coleta foi realizada no dia 30 de abril de 2010 sob condições climáticas muito diferentes daquelas registradas no mesmo mês de 2009. A precipitação registrada foi de 56,1 mm, o valor médio da temperatura foi de 18 °C com máximo em 30 °C e mínimo em 11 °C. A taxa de evapotranspiração foi de 81,5 mm, 22% menor se comparado ao mesmo período de 2009. Os dados referentes ao clima estão apresentados na Figura 77.

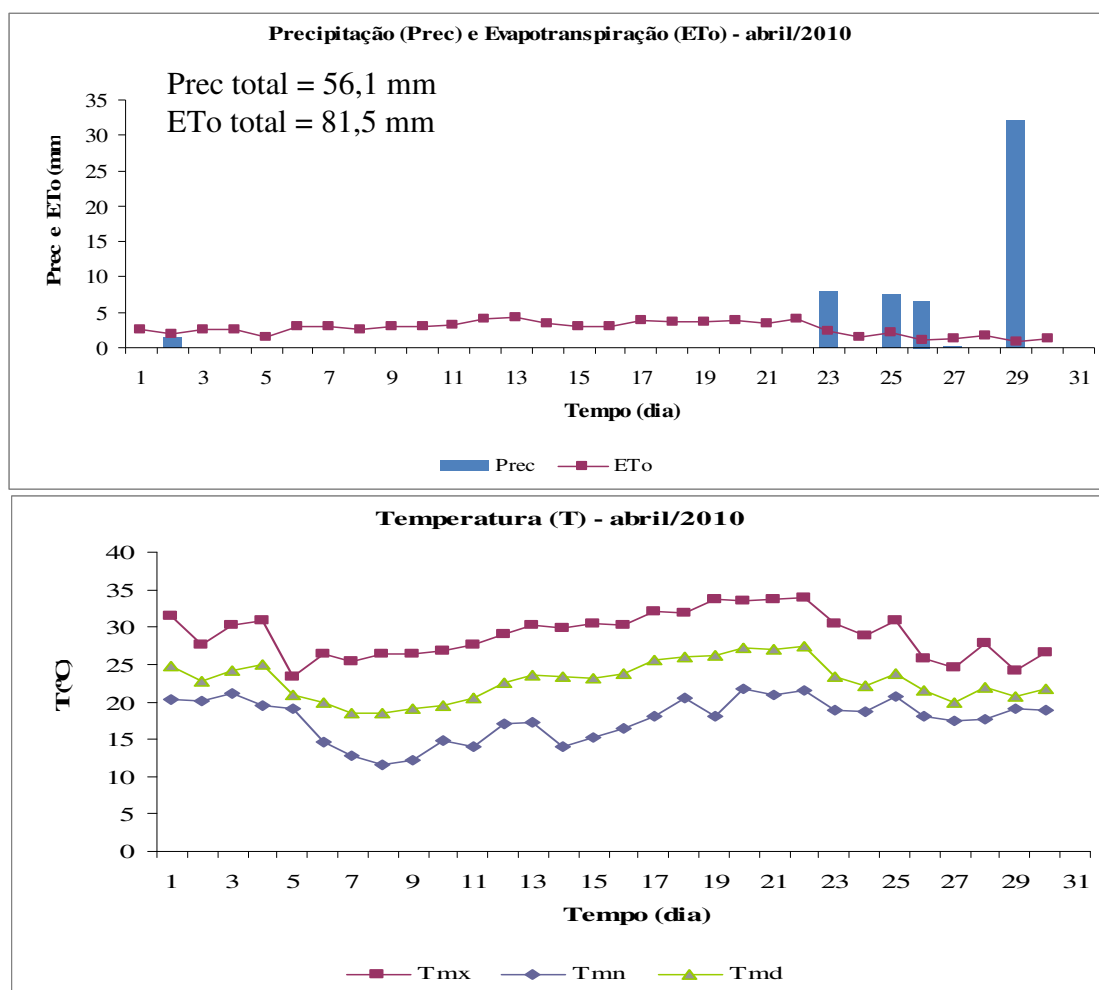


Figura 77: Taxas diárias de precipitação, evapotranspiração e temperaturas (Tmx =temperatura máxima, Tmn= temperatura mínima e Tmd= temperatura média) para o mês de abril de 2009 (MATO GROSSO DO SUL, 2009).

De forma análoga, os processos agrônômicos de abril de 2010 foram praticamente os mesmos executados no ano de 2009, lembrando que em geral o mês de abril é o mês da colheita de soja e que milhares de toneladas de palha de soja são depositados no solo. Os principais fatores que diferenciam a primeira coleta da quarta são relacionados, principalmente, a precipitação e à temperatura. Na primeira coleta não se detectou nos pontos de amostragem do rio EQ, FOR e BIO, somente foram detectados DAI e GEN em 7 e 32% dos casos. O ponto de afloramento do lençol freático, nesta primeira coleta, foi o único que apresentou

concentrações de isoflavonas em níveis muito altos, onde se destacaram as concentrações de EQ, DAI, GEN e FOR.

Quando traçamos um paralelo entre os resultados da primeira e quarta coleta nos deparamos com a grande diferença de incidência das isoflavonas, pois nos pontos do rio na quarta coleta obteve-se a detecção de DAI (35%), EQ (39%), GEN (85%), FOR (78%) e BIO (71%) detectados pela primeira vez.

Quanto às amostras coletadas na fazenda da UFGD obteve-se resultados interessantes (Tabela 4 Apêndice), pois ao contrário da primeira coleta, não foram detectados EQ e FOR. Além disso, a concentração de GEN foi em média dez vezes maior que a de abril de 2009 e pela primeira vez se encontrou a BIO. Esse fato pode estar ligado a média de temperaturas mais baixas, pois dados da literatura sugerem que a detecção de BIO está ligada a períodos de baixa temperatura (RIBEIRO *et al.*, 2009), o que possivelmente pode ter ligação com a redução da atividade microbiana nestes períodos. Outro aspecto que pode estar contribuindo muito para o aparecimento da BIO é o fator precipitação que foi maior no mês de abril de 2010, comparado ao mesmo mês no ano de 2009. Apesar de ter sido registrada uma precipitação muito maior no mês de dezembro de 2009, em relação a abril de 2010, a BIO não foi detectada nesse período, o que fortalece a hipótese de que baixas temperaturas são o fator preponderante para a emissão de BIO no ambiente.

As concentrações no ponto plantação próximo à margem do rio (pontos PAQ1 a PAQ8) apresentaram valores de DAI na faixa de (13,1 – 19,2 ng L⁻¹), EQ (47,1 – 108,2 ng L⁻¹) GEN (41,0 – 123,3 ng L⁻¹), FOR (15,4 – 32,3 ng L⁻¹) e BIO (22,9 – 61,2 ng L⁻¹). Em todos os demais pontos coletados no rio (Tabela 4 Apêndice) encontrou-se altas concentrações de isoflavonas variando de dezenas a centenas de ng L⁻¹. Como discutido anteriormente a BIO se tornou constante em quase todas as

amostras, o que revela um caráter sazonal de emissão desse fitoestrógeno que, possivelmente, se torna disponível no meio ambiente em épocas de baixas temperaturas aliada a alta pluviosidade.

Os dados obtidos em abril de 2010 (quarta coleta) nas amostras da fazenda da UFGD mostraram uma curiosa relação com os dados da primeira coleta, pois se compararmos o mês de abril de 2009 quando se coletou as amostras sob clima seco, com média de temperatura superior, verificou-se que a concentração de EQ (um metabólito de DAI e FOR) é muito alta na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$, devido possivelmente a uma alta taxa de degradação microbiana, além disso, há também uma alta concentração de FOR neste período. Contrastando com esses dados, abril de 2010 caracterizou-se como um mês de chuva e de menor média de temperatura, conseqüentemente, neste ano não houve a detecção de EQ e FOR, além disso, foram detectadas altas concentrações de GEN e pela primeira vez foi detectada a BIO.

Por fim, para que se possa afirmar que os resultados discutidos no texto acima possuem grau de significância e para ter uma visão geral e uma maior compreensão dos dados obtidos, métodos multivariados de análises foram aplicados a todas as amostras, para visualizar o comportamento de todo o período de estudo, por meio de métodos estatísticos, tais como: HCA (Análise Hierárquica por Cluster), PCA (Análise de Componentes Principais) e Rotação Varimax Normalizada em 3D.

4.5 Análises Multivariadas - Análise hierárquica por cluster

A análise por cluster foi empregada para explorar as diferenças entre as amostras, definindo-as em grupos, considerando simultaneamente todas as variáveis. O dendograma da Figura 78 mostra dois agrupamentos distintos de

amostras. O primeiro agrupamento refere-se ao período chuvoso (meses de dezembro de 2009 e abril de 2010) e o segundo agrupamento ao período de seca (meses de abril e agosto de 2009), sendo que a discrepância dos valores de concentração encontrada nas quatro coletas implicaram nessa clara divisão, o que indica que a pluviosidade afeta significativamente a dispersão dos contaminantes.

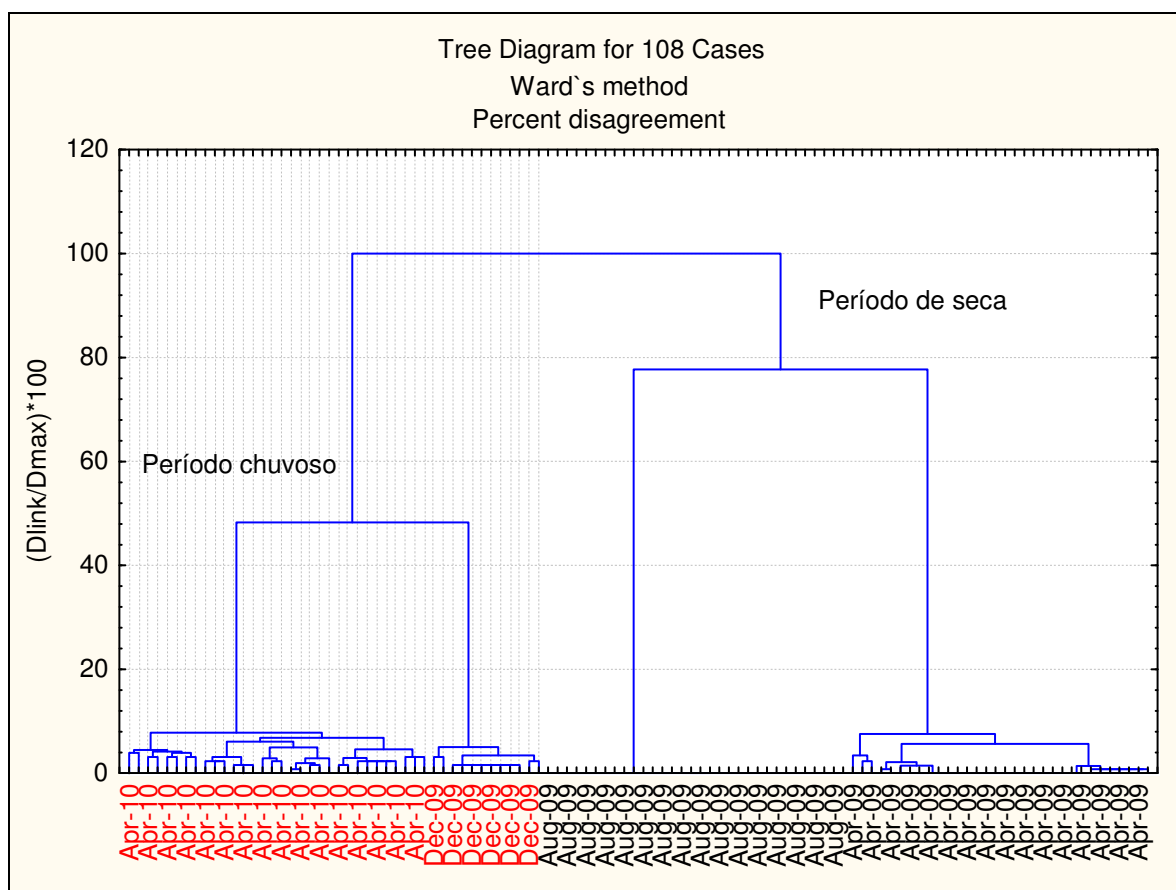


Figura 78: Dendrograma da análise de cluster entre as amostras, ocorrendo o agrupamento das amostras coletadas em diferentes períodos.

O modo com que as variáveis em estudo (isoflavonas) se comportaram durante todo período de coleta foi bastante interessante, pois de acordo com a Figura 79 podemos notar a formação de dois grupos distintos, que se correlacionam de maneira similar ao que as características químicas podem prever, ou seja, como já foi citado no texto o equol é um produto de degradação da DAI e da FOR. Podemos notar no dendrograma da Figura 79 que há uma forte correlação entre

essas três substâncias (grupo 1), enquanto que no grupo 2 prevalecem a GEN e a BIO, substâncias que são estruturalmente semelhantes e possuem valor de log Kow similares (Tabela 2, p. 48), sendo inclusive a GEN descrita na literatura como um produto de degradação da BIO em determinadas condições ambientais.

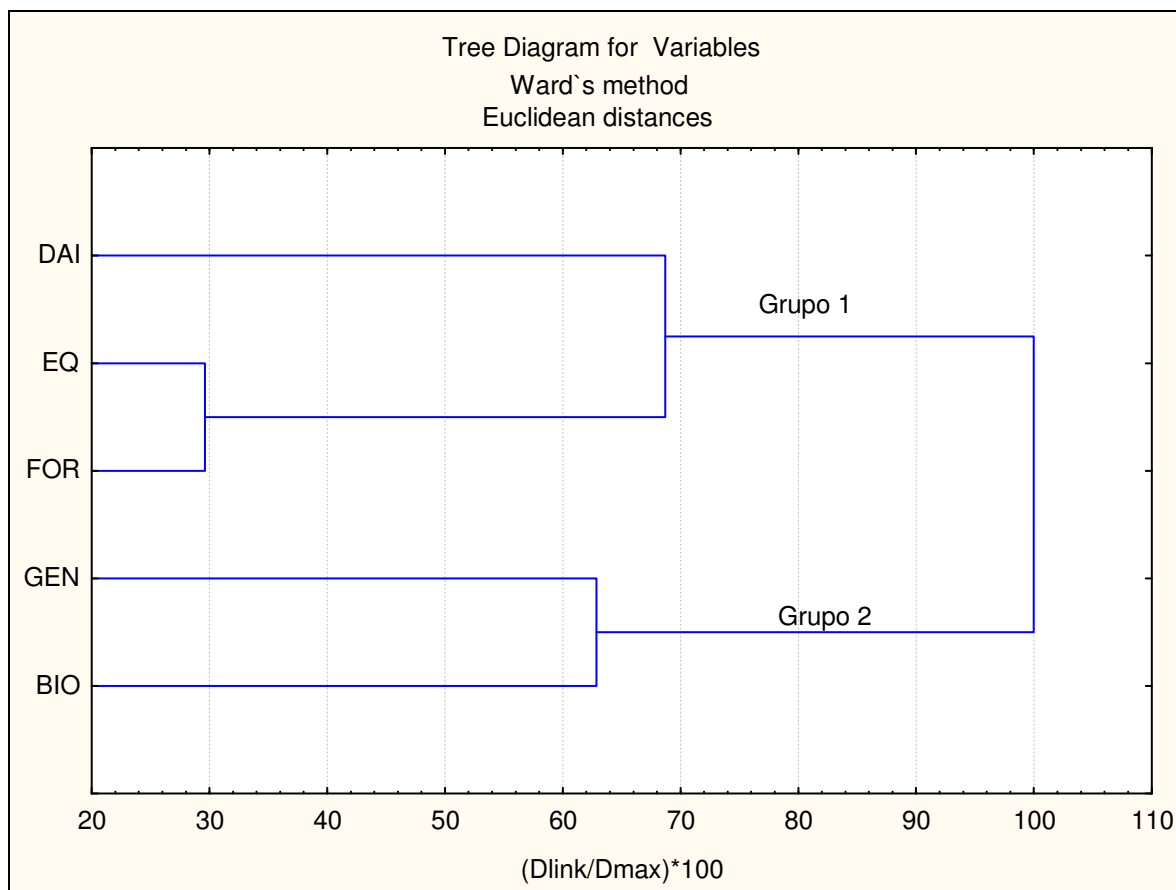


Figura 79: Dendrograma da análise de cluster entre as variáveis, ocorrendo o agrupamento das isoflavonas coletadas em diferentes períodos.

4.5.1 Análise de componentes principais

De modo a complementar a classificação obtida pela análise de agrupamento processou-se a análise de fatores por componentes principais (PCA). Foram posteriormente selecionadas três componentes derivadas por rotação varimax normalizada, onde o primeiro componente concentrou 30,29% da variância total, o segundo 28,69% e o terceiro 13,96%, acumulando 72,94% da variância total.

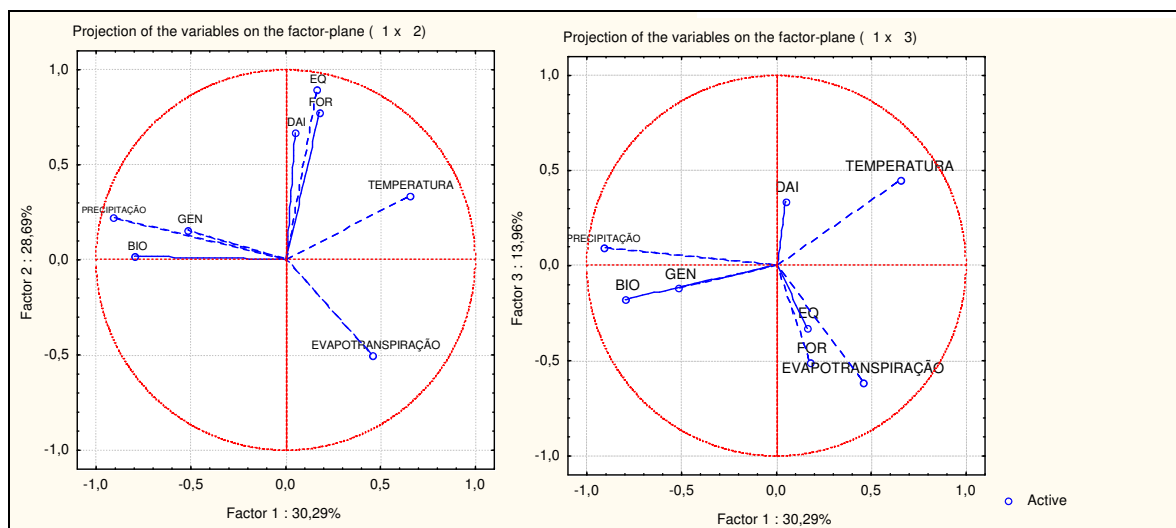


Figura 80: Análise de componentes principais (PCA) entre as variáveis, análise da influência ambiental na disponibilização desses metabólitos no ambiente.

Uma das informações mais importantes que podemos extrair da análise de fatores das componentes principais é que as isoflavonas BIO e GEN correlacionam-se com a precipitação (Fator 1 x Fator 2), o que pode ser notado mais claramente no mês de abril de 2010 (Tabela 4 Apêndice) onde as concentrações dessas duas isoflavonas foram maiores. Nota-se também quando se observa o gráfico do Fator 1 x Fator 2 que a relação do EQ com a FOR e a DAI é forte e que sofre influência da temperatura, fator este que está diretamente ligado a ação microbiológica responsável provavelmente pela degradação da DAI e FOR em EQ. Na análise do Fator 1 x Fator 3, podemos evidenciar que EQ e FOR também estão sofrendo influência da evapotranspiração, variável que faz com que haja uma baixa taxa de recarga do lençol freático, de maneira que a redução do volume de água venha a concentrar metabólitos, tais como os já citados EQ e FOR, tal processo é claro mediante as altas concentrações dessas duas substâncias na primeira coleta (Tabela 1 Apêndice).

Para complementar os dados de PCA fez-se a análise por rotação varimax normalizada, essa categoria de análise permite trabalhar com um grande número de

variáveis. O principal mérito dessa ferramenta estatística é permitir que nestas condições seja possível encontrar grupos de variáveis altamente correlacionadas. Exemplo da aplicação desse método para matrizes de alta complexidade química e com alto número de amostras pode ser encontrado no estudo realizado por Andrade *et al.* (2010). A aplicação desse método ao estudo permitiu um melhor rearranjo da tendência geral dos dados mostrando de forma simplificada os três fatores e suas principais correlações. A Tabela 20 e a Figura 81 ilustram os resultados dessa análise multivariada dos dados, sendo demonstrados os fatores mais significativos para a dispersão dessas moléculas no ambiente em diferentes épocas.

Tabela 20: Rotação varimax normalizada

Variáveis	FATOR 1	FATOR 2	FATOR 3
DAÍ	-0,09	0,365	0,649
EQ	-0,01	0,937	0,232
GEN	0,53	0,091	0,093
FOR	0,008	0,945	0,016
BIO	0,813	-0,041	0,015
Precipitação	0,865	-0,054	0,374
Temperatura	-0,727	0,155	0,433
Evapotranspiração	-0,307	0,019	-0,863
Variância explicada %	29,1	24,3	19,4

Nota: Somente os fatores com loadings em módulo maiores que 0,7, em vermelho, são considerados significativos.

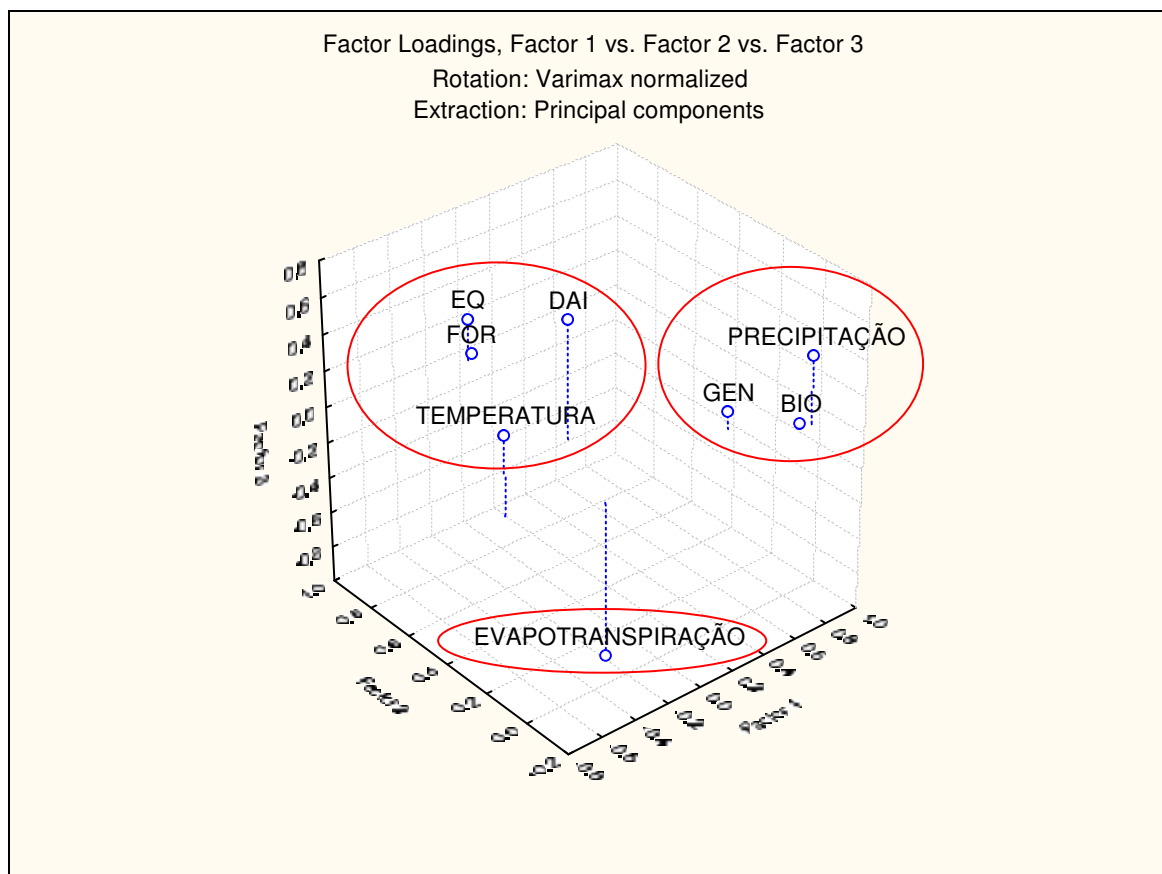


Figura 81: Rotação varimax normalizada entre as variáveis, análise da influência ambiental na disponibilização desses metabólitos no ambiente.

4.5.2 Testes de estrogenicidade (RYA)

Os testes de estrogenicidade foram feitos em todas as amostras coletadas durante os quatro períodos distintos de coleta, para isso foi realizado um *pool* de amostra em cada ponto específico, ou seja, os pontos plantação foram reunidos em uma mesma solução (PAQ1 + PAQ2 +...+ PAE4), o procedimento foi repetido para todos os pontos de coleta, afim de que se pudesse atingir um volume mínimo de amostra para que fosse possível realizar as replicatas necessárias à análise estatística que foi aplicada aos resultados.

Os testes demonstraram que na primeira e segunda coleta no ponto da fazenda da UFGD, a água coletada no afloramento do lençol freático teve o maior efeito estrogênico (Figura 82), nos demais pontos de coleta não houve estrogenicidade detectada ao longo de todas as amostragens.

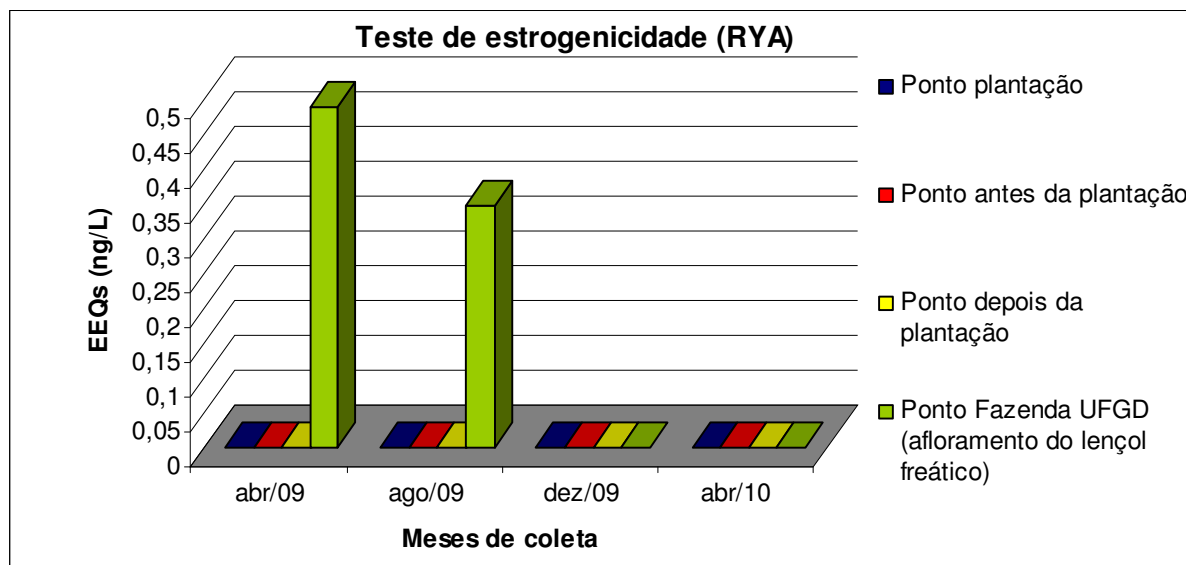


Figura 82: Teste de estrogenicidade (RYA) para os quatro períodos de coleta.

A análise de componentes principais também foi utilizada para a discussão dos resultados, para atribuir a atividade estrogênica a isoflavona, que dentre as cinco encontradas apresentasse o maior efeito impactante no ambiente, entretanto, sabe-se que outras substâncias podem agir sinergicamente com as isoflavonas causando esse efeito, uma vez que se trata de uma matriz ambiental de alta complexidade. Portanto, é muito provável que as isoflavonas sejam responsáveis por parte da atividade estrogênica e não pelo todo. Uma das fortes evidências desse fato é que no mês de agosto de 2009 nenhuma isoflavona foi detectada, porém a atividade estrogênica para esse período foi de $0,35 \text{ ng L}^{-1}$ de EEQ no ponto de coleta do afloramento do lençol freático, valor 30% menor que o encontrado para o mesmo ponto em abril de 2009.

De acordo com dados da literatura (BREINHOLT; LARSEN, 1998) dentre todas as isoflavonas o equol é a que possui maior efeito estrogênico, sendo 5 vezes mais potente que a genisteína, 85 vezes mais que a daidzeína e 92 vezes mais potente que a biochanina – A e a formononetina.

A análise de componentes principais (PCA) apresentada na Figura 83 demonstra que existe uma forte relação do EQ e da FOR com os resultados obtidos pelo teste de estrogenicidade RYA para o mês de abril de 2009. E, como era de se esperar, o valor do RYA para o mês de agosto de 2009 não apresentou correlação com nenhuma das substâncias, sendo o percentual acumulado para a explicação da variância dos dados nas 3 PCs foi de 73,43%.

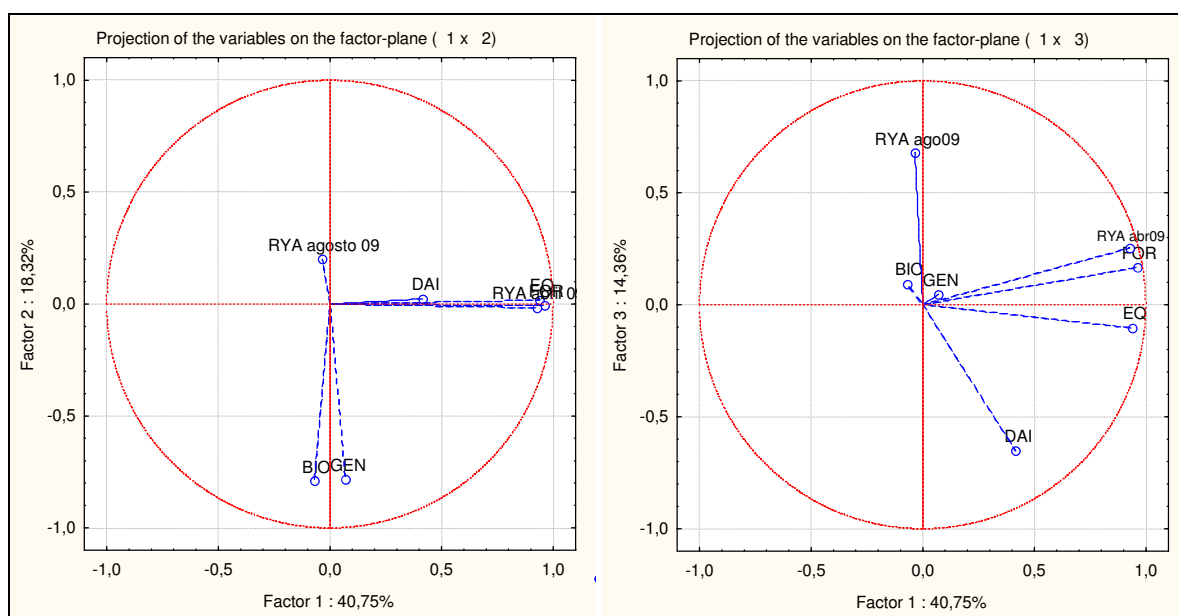


Figura 83: Análise de componentes principais. As três PCs acumulam 73,43 % da variância explicada.

Como a análise de componentes principais apresentada acima é uma projeção simplificada em duas dimensões de uma relação n-dimensional, pode deixar margem para que haja dúvidas se o modelo de análise de dados em questão apresenta distorções quanto à correlação dos dados.

Para complementar a classificação obtida usou-se o método de rotação varimax normalizada para extrair os fatores mais relevantes, ou seja, foram extraídas três componentes derivadas por rotação varimax normalizada (Tabela 21), onde o

primeiro componente concentrou 39,7% da variância, o segundo 18,3% e o terceiro 15,4%.

Tabela 21: Rotação varimax normalizada

Variáveis	FATOR 1	FATOR 2	FATOR 3
DAÍ	0,284	-0,103	0,713
EQ	0,904	-0,041	0,279
GEN	0,070	0,783	0,056
FOR	0,973	0,016	0,024
BIO	-0,058	0,798	-0,015
RYA agosto 09	0,100	-0,120	-0,693
RYA abril 09	0,958	0,033	-0,068
Variância explicada %	39,7	18,3	15,4

Nota: Somente os fatores com loadings em módulo maiores que 0,7, em vermelho, são considerados significativos.

De acordo com os dados da Tabela 21 nota-se que para o Fator 1 as variáveis EQ, FOR e RYA abril de 2009 como variáveis altamente correlacionadas, sendo que a constatação mais importante está no fato de que ao EQ pode-se atribuir grande parcela da estrogenicidade desse mês a esse metabólito, pois como já foi discutido, a FOR é um agente estrogênico muito mais fraco que o equol. O Fator 2 traz como informação mais relevante a alta correlação entre BIO e GEN e o Fator 3 demonstra a maior significância da DAI neste fator.

A Figura 84 demonstra de forma mais clara os resultados obtidos que foram discutidos na Tabela 21, de forma a aplicar os valores da rotação varimax em um sistema de três dimensões, onde as relações entre as variáveis apontam para o fato de que o EQ é o agente estrogênico responsável pelo impacto causado pelas isoflavonas na água do afloramento do lençol freático e, também podemos chegar a conclusão de que, para o mês de agosto de 2009 a estrogenicidade não está relacionada com a presença das isoflavonas no meio, o que é evidente pela não detecção dessas substâncias neste período.

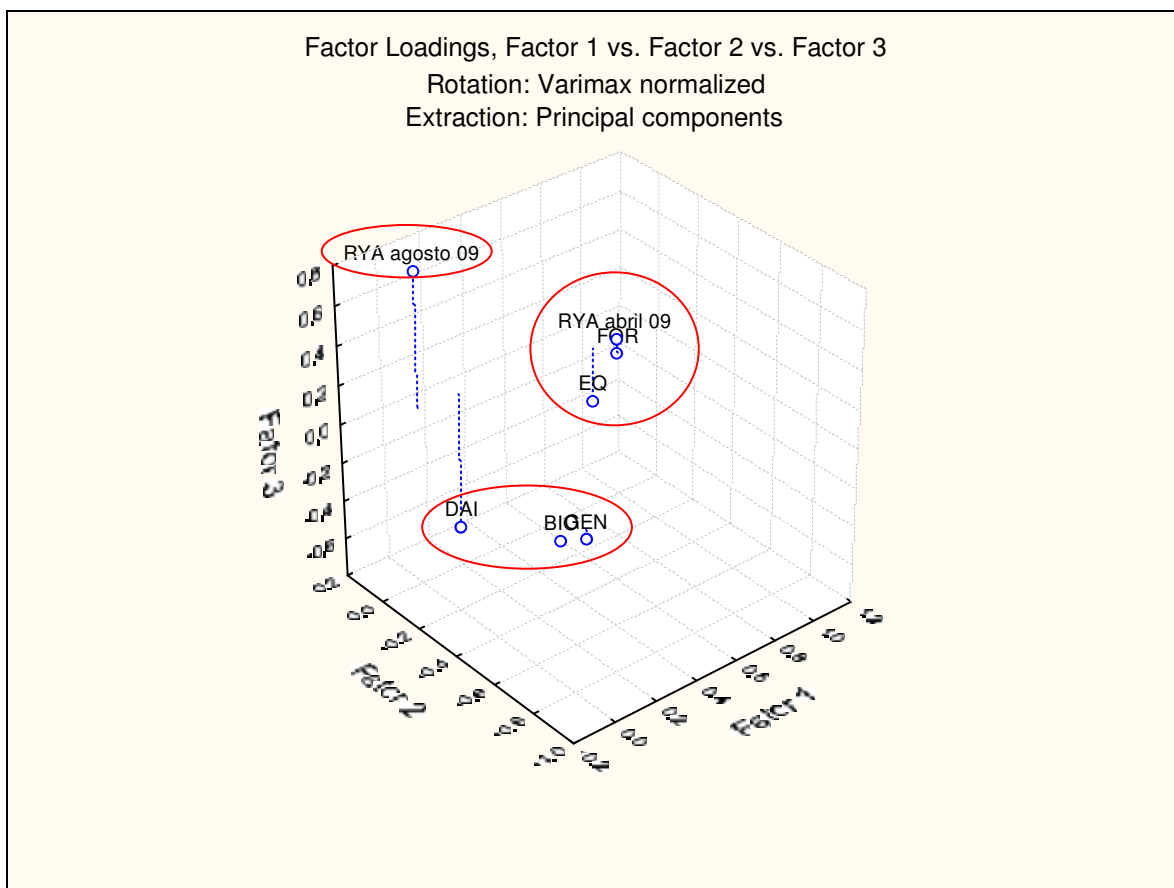


Figura 84: Rotação varimax normalizada extraída da análise de componentes principais (PCA) entre as variáveis, análise da influência ambiental na disponibilização desses metabólitos no ambiente.

4.5.3 Relevância ecotoxicológica

A Figura 85 mostra a dispersão das concentrações de todas as isoflavonas durante todo o período de coleta. As três linhas (vermelha, verde e roxa) representam os intervalos de concentração reportados pela literatura para faixas de concentração que provocam efeito *intersex* em peixes, essa faixa compreende concentrações de 400 a 800 ng L⁻¹ para o equol (KIPARISSIS *et al.*, 2003).

A literatura também faz um alerta para concentrações que expressam grandes riscos de serem causadoras de atividade estrogênica, os dados reportam este risco para valores de equol acima de 1100 ng L⁻¹ (RIBEIRO *et al.*, 2009), sendo que valores dessa magnitude foram encontrados nesse trabalho. A Figura 85 ilustra bem a ocorrência dessa concentração.

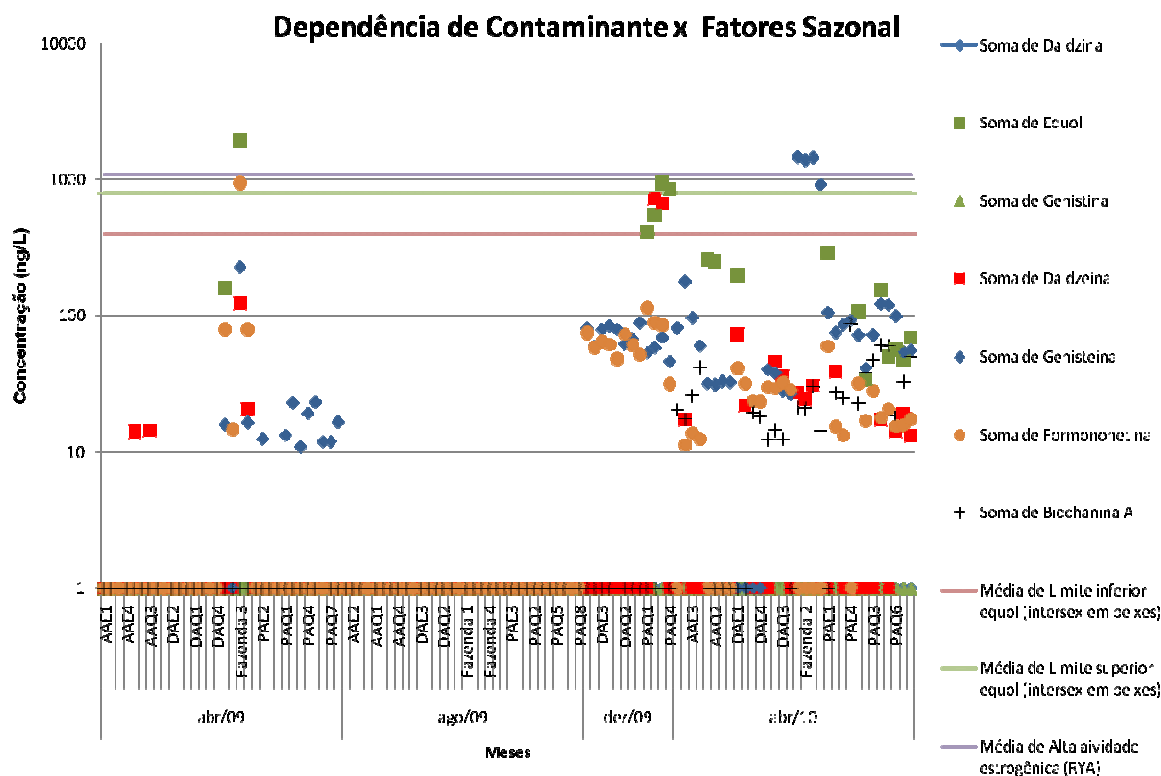


Figura 85: Teste de estrogenicidade (RYA) para os quatro períodos de coleta. No eixo y log da concentração em ng L^{-1} .

Legendas – **AAE**: ponto de coleta antes da plantação afastado da margem do rio, **AAQ**: ponto de coleta antes da plantação próximo a margem do rio, **PAE**: ponto de coleta plantação afastado da margem do rio, **PAQ**: ponto de coleta plantação próximo a margem do rio, **DAE**: ponto depois da plantação afastado da margem do rio e **DAQ**: ponto depois da plantação próximo a margem do rio. **Fazenda**: ponto de coleta de água subsuperficial na fazenda da UFGD.

Juntamente com os dados da literatura sobre as atividades estrogênicas das isoflavonas, os dados obtidos neste trabalho permitem estimar a sua contribuição para o total de estrogenicidade para as águas de superfície e sub-superficial.

Os valores de EC50 de isoflavonas são aproximadamente três a quatro ordens de magnitude superiores ao 17β -estradiol (BREINHOLT; LARSEN, 1998). Isto significa que a concentração (total) de isoflavonas deve ser pelo menos mil vezes maior do que a 17β -estradiol para contribuir igualmente para que se tenha o mesmo efeito estrogênico.

Como os valores para que haja efeito estrogênico para o hormônio 17β -estradiol estão na faixa de concentração de ng L^{-1} as contribuições de isoflavonas devem ser pelo menos da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ para serem relevantes. De fato, em tais

concentrações, peixes sofreram sérios efeitos de mudanças de comportamento (KIPARISSIS *et al.*, 2003).

Considerando-se os dados apresentados na Figura 85, observa-se que existem várias amostras que a concentração das isoflavonas está compreendida na faixa de concentração na qual são descritos efeitos biológicos. Mesmo que estas amostras não tenham apresentado resultado de estrogenicidade significativo no teste RYA, podem apresentar outros efeitos que tal teste não pôde detectar.

Os níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$ somente foram encontrados neste trabalho para o equol em afloramento do lençol freático não sendo detectado nessa concentração nas outras áreas de estudo. Na literatura, concentrações dessa magnitude foram relatadas para água de rio (TERNES *et al.*, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2009a; RIBEIRO *et al.*, 2009b; KAWANISHI *et al.*, 2004).

Para as águas superficiais do Rio Dourados, podemos concluir que as isoflavonas foram diluídas em concentrações abaixo da relevância ambiental para o teste de estrogenicidade RYA.

No entanto, na água rural, no afloramento do lençol freático, principalmente devido as chuvas e ao escoamento e drenagem de água em áreas de pastagem e plantio de soja, tais práticas possuem significativa contribuição para o aumento do efeito estrogênico, principalmente ligado ao aporte do equol que é um metabólito de degradação da daidzeína e da formononetina, o qual possui relevante contribuição para o efeito estrogênico.

Durante os meses nos quais ocorre a rotação de culturas, de maio a agosto, nas áreas onde era plantada a soja passa-se a predominar a pecuária, assim não podemos descartar a contribuição dos hormônios esteroidais, como por exemplo, aqueles vindos do estrume do gado que podem contaminar os afloramentos do

lençol por efeito de lixiviação causado por chuvas e/ou irrigação. Dessa forma hormônios como o 17β -estradiol que foi detectado nesta região em agosto de 2009 (ZOCOLO *et al.*, 2010) podem ser responsáveis por uma parcela significativa do total da estrogenicidade em períodos de entressafra como foi destacado para o mês de agosto de 2009 (Figura 82, p.148).

5 Conclusões

Essa tese apresenta importantes contribuições, que podem ser divididas em analíticas e ambientais.

Do ponto de vista analítico, estabeleceu-se um método simples e de confiabilidade conhecida (exatidão, precisão, seletividade e robustez) para análise de sete fitoestrógenos de soja em água de rio e sub-superficial. Este método é equiparável a alguns relatados na literatura para daidzeína e genisteína, as isoflavonas de soja mais abundantes. No entanto, supera os já publicados pela abrangência das moléculas estudadas, pelo uso de HPLC-UV, técnica mais barata do que a LC-MS/MS mais frequentemente utilizada e pelo estudo de validação desenvolvido, ausente para a maioria dos trabalhos já publicados.

Do ponto de vista ambiental, foi possível confirmar a hipótese inicial do trabalho de que o cultivo de soja, tal qual é feito no Brasil, pode ser uma fonte importante de isoflavonas para o ambiente, principalmente para os recursos hídricos. O estudo detalhado que foi efetuado é inédito na literatura, tendo ainda o diferencial de aliar as análises químicas aos testes biológicos de estrogenicidade (RYA) para avaliação do risco ecotoxicológico envolvido.

O estudo qualitativo do extrato aquoso da palha de soja por LC-MS/MS, no modo MRM, possibilitou identificar a presença das isoflavonas (daidzeína, daidzina, genisteína). Estes dados corroboram com a hipótese inicial do estudo de que as intempéries (principalmente chuvas) podem fazer com que os fitoestrógenos presentes na palha de soja depositada no solo sejam carregados para mananciais hídricos superficiais.

A aplicação de métodos quimiométricos permitiu concluir que o equol é uma das substâncias mais impactantes, principalmente em água sub-superficial da região

de estudo. Os testes de estrogenicidade (RYA) indicaram que as isoflavonas representam um dos fatores de estrogenicidade da água de rio, porém outros fatores podem estar presentes. No entanto, os resultados para concentração de isoflavonas e para os testes biológicos foram elevados para uma área rural, o que indica a necessidade de estudos ecotoxicológicos mais apurados na região, para melhor avaliação do risco e/ou do impacto ambiental envolvido.

Referências

ADLERCREUTZ, H.; HONJO, H.; HIGASHI, A.; FOTSIS, T.; HAMALAINEN, E.; HASEGAWA, T. Urinary excretion of lignans and isoflavone phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. **American Journal of Clinical Nutrition**, n. 54, p. 1093-1100, 1991.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. RE n. 899, de 29 maio 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 01 mar. 2007.

AKHTAR, M.; MAHMOOD, I. Potentiality of phytochemicals in nematode control: a review. **Bioresource Technology**, v. 48, p. 189-201, 1994.

ALZEIU, C. Environmental problems caused by TBT in France: assessment, regulations, prospects. **Marine Environmental Research**, v. 32, p. 7-17, 1991.

ANDRADE, S. J.; CRISTALE, J.; SILVA, F. S.; ZOCOLO, G. J.; MARCHI, M. R. R. Contribution of sugar-cane harvesting season to atmospheric contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Araraquara city, Southeast Brazil. **Atmospheric Environment**, v. 44, p. 2913-2919, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Requisitos gerais para a competência de laboratórios de calibração e de ensaios**: NBR ISO/IEC 17025. Rio de Janeiro, 2001.

AYRES, M. C. R. **Sistema de abastecimento de água potável no município de Dourados - MS**: caracterização e análise. 2000. 78 f. Dissertação (Mestrado em Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

BAIS, H. P.; PARK, T. L.; WEIR, R. M.; CALLAWAY, R. M.; VIVANCO, J. M. How plants communicate using the underground information superhighway. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 26-32, 2004.

BALCONI, A.; CAVALIERE, C.; FABERI, A.; FOGLIA, P.; SAMPERI, R.; LAGANÀ, A. Determination of isoflavones and coumestrol in river water and domestic wastewater sewage treatment plants. **Analytica Chimica Acta**, v. 531, p. 229-237, 2005.

BELL, J. P.; TSEZOS, M. Removal of hazardous organic pollutants by biomass adsorption. **Journal Water Pollution Control Federation**, v. 59, p. 191-198, 1987.

BESTER, K.; McARDELL, C. S.; WAHLBERG, C.; BUCHELI, T. D. Quantitative mass flows of selected xenobiotics in urban waters and waste water treatment plants. **Xenobiotics in Urban Water Cycles**, 2009. In press.

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

BITMAN, J.; CECIL, H. C.; HARRIS, S. J.; FRIES, G. F. Estrogenic activity of o,p'-DDT in the mammalian uterus and avian oviduct. **Science**, v. 162, p. 371-372, 1968.

BOLLER, B. Formica, ein mattenklee mit reduziertem O² strogengehalt. **Agrarforschung**, v. 3, p. 486-488, 1996.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. **Diagnóstico analítico do Pantanal e bacia do alto Paraguai**: implementação de práticas de gerenciamento integrado de bacia hidrográfica para o Pantanal e bacia do alto Paraguai. Brasília, 2003.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. **GEF Pantanal/Alto Paraguai**: implementação de práticas de gerenciamento integrado de bacia hidrográfica para o Pantanal e a bacia do Alto Paraguai: programa de ações estratégicas para o gerenciamento integrado do Pantanal e da bacia do Alto Paraguai: relatório final. Brasília, 2004.

BREINHOLT, V.; LARSEN, J. C. Detection of weak estrogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF7cell proliferation assay. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, p. 622-629, 1998.

BURGESS, J. E.; QUARMBY, J.; STEPHENSON, T. Role of micronutrients in activated sludge-based biotreatment of industrial effluents. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 49-70, 1999.

BURLINGTON, H.; LINDEMAN, V. Effect of DDT on testes and secondary sex characters of white leghorn cockerels. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 74, p. 48-51, 1950.

BURNISON, B. K.; HARTMANN, A.; LISTER, A.; SERVOS, M. R.; TERNES, T.; VAN DER KRAAK, G. A toxicity identification evaluation approach to studying estrogenic substances in hog manure and agricultural runoff. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 22, p. 2243-2250, 2003.

CARLSEN, E.; GIWERCMAN, A.; KEIDING, N.; SKAKKEBAEK, N. E. Evidence for decreasing quality of semen during the past 50 years. **British Medical Journal**, v. 305, p. 609-613, 1992.

CARLSON, R. **Silent spring**. London: Penguin Books, 1962.

CARVALHO, F. C. de. Disponibilidade de resíduos agroindustriais e do beneficiamento de produtos agrícolas. In: SIMPÓSIO DE UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS E RESÍDUOS DE COLHEITA NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES, 1., 1992, São Carlos. **Anais...** São Carlos: EMBRAPA, 1992. 349, p. 7-27.

CESPEDES, R.; LACORTE, S.; RALDUA, D.; GINEBREDÀ, A.; BARCELO, D.; PIÑA, B. Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, NE Spain). **Chemosphere**, v. 61, n. 11, p. 1710-1719, 2005.

COOPERATION ON INTERNATIONAL TRACEABILITY IN ANALYTICAL CHEMISTRY/EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods** – a laboratory guide to method validation and related topics. Teddington, 1998.

CLARA, M.; STRENN, B.; SARACEVIC, E.; KREUZINGER, N. Adsorption of bisphenol- A, 17 beta-estradiol and 17 alpha-ethinylestradiol to sewage sludge. **Chemosphere**, v. 56, n. 9, p. 843-851, 2004.

CLINE, J. M.; FRANKE, A. A.; REGISTER, T. C.; GOLDEN, D. L.; ADAMS, M. R. Effects of dietary isoflavone aglycones on the reproductive tract of male and female mice. **Toxicologic Pathology**, v. 32, p. 91-99, 2004.

COLBORN, T.; VOM SAAL, F. S.; SOTO, A. M. Developmental effects of endocrine disrupting chemical in wildlife and humans. **Environmental Health Perspectives**, v. 101, n. 5, p. 378-384, 1993.

COLBORN, T.; DUMANOSKI, D.; MYERS, J. P. **Our stolen future**. London: Abacus, 1996.

COLDHAM, N. G.; DAVE, M.; SIVAPATHASUNDARAM, S.; McDONNELL, D. P.; CONNOR, C.; SAUER, M. J. Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, p. 734-742, 1997.

COLUCCI, M. S.; TOPP, E. Persistence of estrogenic hormones in agricultural soils: II. 17 α -Ethinylestradiol. **Journal Environmental Quality**, v. 30, p. 2077-2080, 2001.

COLUCCI, M. S.; BORK, H.; TOPP, E. Persistence of estrogenic hormones in agricultural soils: I. 17 β -Estradiol and estrone. **Journal Environmental Quality**, v. 30, p. 2070-2076, 2001.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **The implementation of the Community strategy for endocrine disrupters**: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife (COM [1999] 706). Brussels, 2001. 45 p.

COOK, D. L.; LAFLEUR, L.; PARRISH, A.; JONES, J.; HOY, D. Characterization of plant sterols in a select group of US pulp and paper mills. In: INTERNATIONAL ASSOCIATION ON WATER QUALITY SYMPOSIUM, 5th, 1996, Vancouver. **Proceedings** Vancouver: [s.n.], 1996. p. 1;8.

DAUX, W. L.; GRIFFIN, J. F. Structural features which distinguish estrogen agonists from antagonists. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, p. 271-280, 1987.

DENTON, T. E.; HOWELL, W. M.; ALLISON, J. J.; McCOLLUM, J.; MARKS, B. Masculinization of female mosquitofish by exposure to plant sterols and mycobacterium smegmatis. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 35, p. 627-632, 1985.

DODDS, E. C.; GOLDBERG, L.; LAWSON, W.; ROBINSON, R. Oestrogenic activity of certain synthetic compounds. **Nature**, v. 141, p. 247-248, 1938.

DOWSON, P. H.; BUBB, J. M.; LESTER, J. N. Organotin distribution in sediments and waters of selected east coast estuaries in the UK. **Marine Pollution Bulletin**, v. 24, p. 492-498, 1992.

DOWSON, P. H.; PERSHKE, D.; BUBB, J. M.; LESTER, J. N. Spatial distribution of organotin in sediments of lowland river catchments. **Environmental Pollution**, v. 76, p. 259-266, 1992.

DUNN, T.; GREEN, A. Cysts of the epididymis, cancer of the cervix, granular cell myoblastoma and other lesions after estrogen injection in newborn mice. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 31, p. 425-455, 1963.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. SOJA. **Sistema de produção**: tecnologias de produção de soja, Paraná-2004. Londrina, 2003. n. 3, 218 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. SOJA. **Sistema de produção**: tecnologias de produção de soja, Região Central do Brasil. Londrina, 2006. n. 11, 225 p.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Special report on environmental endocrine disruption**: an effects assessment and analysis. N. EPA/630/R-96/012. Washington, 1997, 111 p.

ERBS, M.; HOERGER, C. C.; HARTMANN, N.; BUCHELI, D. T. Quantification of six phytoestrogens at the nanogram per liter level in aqueous environmental samples using $^{13}\text{C}_3$ -Labeled internal standards. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 21, p. 8339-8345, 2007.

FANG, H.; TONG, W.; BRANHAM, W. S.; MOLAND, C. L.; DIAL, S. L. D.; HONG, H.; XIE, Q.; PERKINS, R.; OWENS, W.; SHEEHAN, D. M. Study of 202 natural, synthetic, and environmental chemicals for binding to the androgen receptor. **Chemical Research Toxicology**, v. 16, p. 1338-1358, 2003.

FARRÉ, M.; GROS, M.; HERNÁNDEZ, B.; PETROVIC, M.; HANCOCK, P.; BARCELÓ, D. Analysis of biologically active compounds in water by ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, p. 41-51, 2008.

FLETCHER, R. J. Food sources of phyto-oestrogens and their precursors in Europe. **British Journal of Nutrition**, v. 89, p. 39-43, 2003.

FORESBERG, J. G. The development of a typical epithelium in the mouse uterine cervix and vaginal fornix after neonatal estradiol treatment. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 50, p. 187-195, 1969.

FRY, D. M. Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, p. 165-171, 1995.

GARCÍA-REYERO, N.; GRAU, E.; CASTILLO, M.; LÓPEZ DE ALDA, M.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. **Environmental and Toxicological Chemistry**, v. 20, p. 1152-1158, 2001.

GIBBS, P. E.; BRYAN, G. W. TBT-induced imposex in neogastropod snails: masculinization to mass extinction. In: MORA, S. J. de. **Tributyltin**: case study of an environmental contaminant. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.

GILL, W. B.; SCHUMACHER, G. F. B.; BIBBO, M. Structural and functional abnormalities in the sex organs of male offspring of mothers treated with diethylstilbestrol (DES). **Journal of Reproductive Medicine**, v. 16, p. 147-153, 1976.

GOBBO, N. L.; GATES, P. J.; LOPES, N. P. Negative ion 'chip-based' nanospray tandem mass spectrometry for analysis of flavonoids in glandular trichomes of *Lychnophora ericoides* Mart. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, p. 3802-3808, 2008.

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. A.; ASUERO, A. G. Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. **Talanta**, v. 48, n. 1, p. 729-736, 1999.

GREEN, S.; CHAMBON, P. The estrogen receptor: from perception to mechanism. In: PARKER, M. G. **Nuclear hormone receptors**. London: Academic Press, 1991, p. 15-38.

GRIFFIN, J. E.; OJEDA, S. R. **Textbook of endocrine physiology**. New York: Oxford University Press, 1996.

GUILLETTE, L. J. J.; PICKFORD, D. B.; CRAIN, D. A.; ROONEY, A. A.; PERCIVAL, H. F. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. **General and Comparative Endocrinology**, v. 101, p. 32-42, 1996.

GUILLETTE, L. J. J.; GROSS, T. S.; MASSON, G. R.; MATTER, J. M.; PERCIVAL, H. F.; WOODWARD, A. R. Development abnormalities of the gonad and the abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, n. 8, p. 680-688, 1994.

HANDELSMAN, D. J. Estrogens and falling sperm counts. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 13, p. 317-324, 2001.

HARTMANN, N.; ERBS, M.; WETTSTEIN, F. E.; HÖRGER, C. C.; VOGELGSANG, S.; FORRER, H-R.; SCHWARZENBACH, R. P.; BUCHELI, T. D. Environmental exposure to estrogenic and other Myco- and Phytotoxins. **Chimia**, v. 62, n. 5, p. 364-367, 2008.

HERBST, A.; ULFELDER, H.; POSKANZER, D. Adenocarcinoma of the vagina: association of the maternal stilbestrol therapy with tumour appearance in young women. **New England Journal of Medicine**, v. 284, n. 115, p. 878-881, 1971.

HERBST, A.; POSKANZER, D. C.; ROBBOY, S. J.; FRIEDLANDER, L.; SCULLY, R. E. Prenatal exposure to stilbestrol: a prospective comparison of exposed female offspring with unexposed controls. **New England Journal of Medicine**, n. 292, n. 7, p. 334-339, 1975.

HERTZ, R. The estrogen problem: retrospect and prospect. In: McLACHLAN, J. A. **Estrogens in the Environment II: influences on development**. New York: Elsevier, 1985. p. 1-11.

HEINONEN, S. M.; WAHALA, K.; ADLERCREUTZ, H. Identification of urinary metabolites of the red clover isoflavones formononetin and biochanin A in human subjects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 22, p. 6802-6809, 2004.

HOERGER, C. C.; WETTSTEIN, F. E.; HUNGERBUHLER, K.; BUCHELI, T. D. Occurrence and origin of estrogenic isoflavones in Swiss river waters. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 16, 2009.

HOWELL, W. M.; DENTON, T. E. Gonopodial morphogenesis in female mosquitofish, *Gambusia affinis affinis*, masculinized by exposure to degradation products from plant sterols. **Environmental Biology of Fishes**, v. 24, p. 43-51, 1989.

HUGHES, C. Are the differences between estradiol and other estrogens merely semantical? **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 81, p. 2405, 1996.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro, 2003. 36 p. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/kits/doqcgcre008r01.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2007.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Validation of analytical procedures: definitions and terminology**, n. Q2A (CPMP/ICH/381/95), Washington, 1995.

JAPAN ENVIRONMENT AGENCY. **Strategy programs on environmental endocrine disruptors**. Tóquio, 1998. 49 p.

JOBLING, S.; NOLAN, M.; TYLER, C. R.; BRIGHTY, G. C.; SUMPTER, J. P. Widespread sexual disruption in wild fish. **Environmental Science & Technology**, v. 32, n. 17, p. 2498-2506, 1998.

JORDAN, V. C.; MITTAL, S.; GOSDEN, B.; KOCH, R.; LIEBERMAN, M. E. Structure-activity relationships of estrogens. **Environmental Health Perspectives**, v. 61, p. 97-110, 1985.

KANG, J.; PRICE, W. E.; HICK, L. A. Simultaneous determination of isoflavones and lignans at trace levels in natural waters and wastewater samples using liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, p. 2411-2418, 2006.

KAUFMAN, R. H.; ADAM, E.; HATCH, E. E.; NOLLER, K.; BERBST, A. L.; PALMER, J. R.; HOOVER, R. N. Continued follow-up of pregnancy outcomes in diethylstilbestrol exposed offspring. **Obstetrics & Gynecology**, v. 96, n. 4, p. 483-489, 2000.

KAWANISHI, M.; TAKAMURA-ENYA, T.; ERMAWATI, R.; SHIMOHARA, C.; SAKAMOTO, M.; MATSUKAWA, K.; MATSUDA, T.; MURAHASHI, T.; MATSUI, S.; WAKABAYASHI, K.; WATANABE, T.; TASHIRO, Y.; YAGI, T. Detection of genistein as an estrogenic contaminant of river water in Osaka. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 23, p. 6424-6429, 2004.

KESTER, M. H. A.; BULDUK, S.; TIBBOIL, D.; MEINL, W.; GLATT, H.; FALANY, C. N.; COUGHTRIE, M. W. H.; BERGMAN, A.; SAFE, S. H.; KUIPER, G. G. J. M.; SCHUUR, A. G.; BROUWER, A.; VISSER, T. J. Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated PCB metabolites: a novel pathway explaining the estrogenic activity of PCBs. **Endocrinology**, v. 141, p. 1897-1900, 2000.

KESTER, M. H. A.; BULDUK, S.; VAN TOOR, H.; TIBBOEL, D.; MEINL, W.; GLATT, H.; FALANY, C. N.; COUGHTRIE, M. W. H.; SCHUUR, A. G.; BROUWER, A.; VISSER, T. J. Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated metabolites of polyhalogenated aromatic hydrocarbons reveals alternative mechanism for estrogenic activity of endocrine disrupters. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, p. 1142-1150, 2002.

KIPARISSIS, Y.; HUGHES, R. A.; METCALFE, C. D.; TERNES, T. A. Identification of the isoflavonoid, genistein in bleached kraft mill effluent. **Environmental Science and Technology**, v. 35, p. 2423-2427, 2001.

KIPARISSIS, Y.; BALCH, G. C.; METCALFE, T. L.; METCALFE, C. D. Effects of the isoflavones genistein and equol on the gonadal development of Japanese medaka *Oryzias latipes*. **Environmental and Resource Studies**, v. 111, n. 9, p. 1158-1163, 2003.

KO, K.; MALISON, J. A.; REED, J. R. Effect of genistein on the growth and reproductive function of male and female yellow perch *Perca flavescens*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 30, p. 73-78, 1999.

KÖRNER, W.; HANF, V.; SCHULLER, W.; CHRISTOPH, K.; METZGER, J.; HAGENMAIER, H. Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 33-48, 1999.

KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A.; COVAL, S. M.; BINKOSKI, A. E.; HILPERT, K. F.; GRIEL, A. E.; ETHERTON, T. D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **American Journal of Medicine**, v. 113, n. 30, p. 71-88, 2002.

KUIPER, G. G. J. M.; CARLSSON, B.; GRANDIEN, K.; ENMARK, E.; HÅGG-BLAD, J.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. Å. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. **Endocrinology**, v. 138, p. 863-870, 1997.

KUIPER, G. G. J. M.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B.; CORTON, J. C.; SAFE, S. H.; VAN DEER SAAT, P. T.; VAN DER BURG, B.; GUSTAFSSON, J. Å. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . **Endocrinology**, v. 139, p. 4252-4263, 1998.

KUSTER, M.; AZEVEDO, D. A.; LÓPEZ DE ALDA, M. J.; AQUINO NETO, F. R.; BARCELÓ, D. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). **Environment International**, v. 35, n. 7, p. 997-1003, 2009.

LAGANÀ, A.; BACALONI, A.; DE LEVA, I.; FABERI, A.; FAGO, G.; MARINO, A. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 501, n.1, p. 79-88, 2004.

LATONNELLE, K.; FOSTIER, A.; LEMENN, F. E.; BENNETAU-PELISSERO, C. Binding affinities of hepatic nuclear estrogen receptors for phytoestrogens in rainbow trout and Siberian sturgeon. **General and Comparative Endocrinology**, v. 129, p. 69-79, 2002.

LC LABORATORIES. **Reagents for signal transduction research**: handbook. Woburn, 2004.

LIGGINS, J.; BLUCK, L. J.; RUNSWICK, S.; ATKINSON, C.; COWARD, W. A.; BINGHAM, S. A. Daidzein and genistein content of fruits and nuts. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, p. 326-331, 2000.

LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A. Endocrine disruptors in the environment. **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n. 5, p. 631-681, 2003.

LISSIN, L. W.; COOKE, J. P. Phytoestrogens and cardiovascular health. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 35, n. 6. p. 1403-1410, 2000.

LIU, Z.; KANJO, Y.; MIZUTANI, S. A review of phytoestrogens: their occurrence and fate in the environment. **Water Research**, v. 44, n. 2, p. 567-577, 2009.

LUI, M. C. Y.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M. de; SCAMPARINI, A. R. P.; PARK, Y. K. Isoflavonas em isolados e concentrados protéicos de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 206-212, 2003.

LUNDH, T. Metabolism of estrogenic isoflavones in domestic animals. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 208, n. 1, p. 33-39, 1995.

MacLATCHY, D. L.; VAN DER KRAAK, G. J. The phytoestrogen β -sitosterol alters the reproductive endocrine status of goldfish. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 134, p. 305-312, 1995.

MAHMOOD-KHAN, Z.; HALL, E. R. Occurrence and removal of plant sterols in pulp and paper mill effluents. **Journal of Environmental Engineering and Science**, v. 2, p. 17-26, 2003.

MAKIN, H. L.; HEFTMANN, E. High-performance liquid chromatography of steroid hormones. **Monographs on Endocrinology**, n. 30, p. 183-234, 1988.

MALISON, J. A.; BEST, C. D.; KAYES, T. B.; AMUNDSON, C. H.; WENTWORTH, B. C. Hormonal growth promotion and evidence for a size-related difference in response to estradiol- 17β in yellow perch (*Perca flavescens*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 42, p. 1627-1633, 1985.

MALISON, J. A.; KAYES, T. B.; WENTWORTH, B. C.; AMUNDSON, C. H. Growth and feeding responses of male versus female yellow perch (*Perca flavescens*) treated with estradiol- 17β . **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 45, p. 1942-1948, 1988.

MATO GROSSO DO SUL. Secretaria de Estado de Meio Ambiente. Fundação Estadual de Meio Ambiente Pantanal. Coordenadoria de Recursos Hídricos e Qualidade Ambiental. Divisão Centro de Controle Ambiental. **Bacias hidrográficas do rio Dourados**: diagnóstico e implantação da rede básica de monitoramento da qualidade das águas. Campo Grande, 2000.

MATO GROSSO DO SUL. **Serviços Meteorológicos**. Disponível em: <<http://www.ufgd.edu.br/clima>>. Acesso em: 28 jul. 2009.

MATTHEWS, J.; CELIUS, T.; HALGREN, R.; ZACHAREWSKI, T. Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 74, n. 4, p. 223-234, 2000.

MATTHIESSEN, P. Is endocrine disruption a significant ecological issue? **Ecotoxicology**, n. 9, p. 21-24, 2000.

McLACHLAN, J. A.; NEWBOLD, R.; BULLOCK, B. Reproductive tract lesions in male mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. **Science**, v. 190, n. 4218, p. 991-992, 1975.

McLACHLAN, J. A.; NEWBOLD, R.; BULLOCK, B. Long term effects on the female mouse genital tract associated with prenatal exposure to diethylstilbestrol. **Cancer Research**, v. 40, n.11, p. 3988-3999, 1980.

MELNICK, S.; COLE, P.; ANDERSON, D.; HERBST, A. Rates and risks of diethylstilbestrol related clear-cell adenocarcinoma of the vagina and the cervix: an update. **New England Journal of Medicine**, v. 316, n. 9, p. 514-516, 1987.

MEYLAN, W. M.; HOWARD, P. H. Atom/fragment contribution method for estimating octanol-water partition-coefficients. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 84, n. 1, p. 83-92, 1995.

MINDERMAN, G. Addition, decomposition and accumulation of organic matter in forests. **Journal of Ecology**, v. 56, p. 355-362, 1960.

MORA, S. J. de. **Tributyltin**: case study of an environmental contaminant. Cambridge: Cambridge University Press, 1996.

MORRISON, M. J.; COBER, E. K.; SALEEM, M. F.; McLAUGHLIN, N. B.; FREGEAU-REID, J.; MA, B. L.; YAN, W.; WOODROW, L. Changes in isoflavone concentration with 58 years of genetic improvement of short-season soybean cultivars in Canada. **Crop Science**, v. 48, p. 2201-2208, 2008.

MURK, A. J.; BOUDEWIJIN, T. J.; MEININGER, P. L.; BOSVELD, A. T. C.; ROSSAERT, G.; YSEBAERT, T.; MEIRE, P.; DIRKSEN, S. Effects of polyhalogenated aromatic hydrocarbons and related contaminants on common tern reproduction: integration of biological, biochemical and chemical data. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 31, p. 128-140, 1996.

NATIONAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY AND EVALUATION. **The releases and transfers in Japan**. 2008. Disponível em: <<http://www.safe.nite.go.jp/english/index.html>>. Acesso em: 01 set. 2009.

NEHME, C. J. **Estudo da dinâmica circadiana e sazonal e da variabilidade populacional dos metabólitos secundários polares das folhas de *Cryptocarya moschata* Ness (Lauraceae)**. 2001. 113 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

NISHIHARA, T.; NISHIKAWA, J. I.; KANAYAMA, T.; DAKEYAMA, F.; SAITO, K.; IMAGAWA, M.; TAKATORI, S.; KITAGAWA, Y.; HORI, S.; UTSUMI, S. Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. **Journal of Health Sciences**, v. 46, p. 282-298, 2000.

NOGUEROL, T. N.; BORONAT, S.; JARQUE, S.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods. **Talanta**, v. 69, p. 351-358, 2006.

OSPAR-OSLO AND PARIS COMMISSIONS. Ospar strategy with regard to hazardous substances. In: OSPAR CONVENTION FOR THE PROTECTION OF THE MARINE ENVIRONMENT OF THE NORTH-EAST ATHANTIC, **Annex 34....Ospar**, 1998. 22 p.

PARK, Y. G.; CHOI, M. S.; YANG, J. K.; PARK, K. H. Alelopatic potencial and substances from cork tree. **Journal of the Korean Wood Science and Technology**, v. 29, p. 92-98, 2001.

PAWLOWSKI, S.; TERNES, T.; BONERZ, M.; KLUCZKA, T.; VAN DER BURG, B.; NAU, H.; ERDINGER, L.; BRAUNBECK, T. Combined *in situ* and *in vitro* assessment of the estrogenic activity of sewage and surface water samples. **Toxicological Sciences**, v. 75, p. 57-65, 2003.

PAWLOWSKI, S.; TERNES, T. A.; BONERZ, M.; RASTALL, A. C.; ERDINGER, L.; BRAUNBECK, T. Estrogenicity of solid phase-extracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n.1, p. 129-138, 2004.

PELISSERO, C.; LE MENN, F.; KAUSHIK, S. Estrogenic effect of dietary soya bean meal on vitellogenesis in cultured Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. **General Comparative Endocrinology**, v. 83, p. 447-457, 1991.

PELISSERO, C.; BENNETAU, B.; BABIN, P.; LE MENN, F.; DUNOGUES, J. Estrogenic activity of certain phytoestrogens in the Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 293-299, 1991.

PELISSERO, C.; BRETON, B.; BENNETAU, B.; CORRAZE, G.; LE MENN, F.; CUISSET, B.; HELOU, C.; KAUSHIK, S. J. Effect of genistein-enriched diets on the endocrine process of gametogenesis and on reproduction efficiency of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 121, p. 173-187, 2001.

PEREIRA, S. B.; ALVES SOBRINHO, T.; FEDATTO, E.; PEIXOTO, P. P. P.; BONACINA, R. Variação temporal do comportamento hidrológico na bacia do rio Dourados no período de 1973 a 2002. **Engenharia Agrícola**, v. 27, n. 2, p. 560-568, 2007.

PHILLIPS, B.; HARRISON, P. Overview of the endocrine disrupters issue. In: HESTER, R. E.; HARRISSON, R. M. **Endocrine Disrupting chemicals**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1999, p. 1-26.

POLLACK, S. J.; OTTINGER, M. A.; SULLIVAN, C. V.; WOODS III, L. C. The effects of the soy isoflavone genistein on the reproductive development of striped bass. **North American Journal of Aquaculture**, v. 65, p. 226-234, 2003.

PUGLISI, E.; NICELLI, M.; CAPRI, E.; TREVISAN, M.; DEL RE, A. A. M. Cholesterol, b-sitosterol, ergosterol, and coprostanol in agricultural soils. **Journal of Environmental Quality**, v. 32, p. 466-471, 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**, v. 8, p. 275-285, 1994.

QUIRÓS, L.; CÉSPEDES, R.; LACORTE, S.; VIANA, P.; RALDÚA, D.; BARCELÓ, D.; PINA, B. Detection and evaluation of endocrine-disruption activity in water samples from portuguese rivers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, p. 389-395, 2005.

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

RIBEIRO, C.; PARDAL, M. A.; MARTINHO, F.; MARGALHO, R.; TIRITAN, M. E.; ROCHA, E.; ROCHA, M. J. Distribution of endocrine disruptors in the Mondero River estuary, Portugal. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 149, p. 183-193, 2009 a.

RIBEIRO, C.; PARDAL, M. A.; TIRITAN, M. E.; ROCHA, E.; MARGALHO, R.; ROCHA, M. J. Spatial distribution and quantification of endocrine disrupting chemicals in Sado River estuary, Portugal. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 159, p. 415-427, 2009 b.

ROGERS, H.R. Sources, behaviour and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges. **Science of the Total Environment**, n. 185, p. 3-26, 1996.

ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Solid-phase extraction of soy isoflavonas. **Journal of Chromatography A**, v. 1076, p. 110-117, 2005.

ROTHWELL, J. A.; DAY, A. J.; MORGAN, M. R. A. Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 11, p. 4355-4360, 2005.

SABIK, H.; JEANNOT, R.; RONDEAU, B. Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products in ground and surface waters. **Journal of Chromatography A**, v. 885, p. 217-236, 2000.

SADIK, O. A.; WITT, D. M. Monitoring endocrine disrupting chemicals. **Environmental Science & Technology**, v. 33, p. 368A-374A, 1999.

SÃO PAULO (Estado). Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Relatório de qualidade das águas Interiores no estado de São Paulo**. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/publicacoes.asp>>. Acesso em: 28 nov. 2008.

SCHUBIGER, F. X.; BOSSHARD, H-R.; LEHMANN, J. Futterwert in Rotklee. **Agrarforschung**, v. 5, n. 4, p. 181-184, 1998.

SETCHELL, K. D. R.; CASSIDY, A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 758S-767S, 1999.

SHARPE, R. M.; SKAKKEBAEK, N. E. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? **Lancet**, v. 341, p. 1392-1395, 1993.

SHEAHAN, D. A.; BRIGHTY, G. C.; DANIEL, M.; JOBLING, S.; HARRIES, J. E.; HURST, M. R.; KENNEDY, J. KIRBY, S. J.; MORRIS, S.; ROUTLEDGE, E. J.; SUMPTER, J. P.; WALDOCK, M. J. Reduction in the estrogenic activity of a treated sewage effluent discharge to an English river as a result of a decrease in the concentration of industrially derived surfactants. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 515-519, 2002.

SINGER, A. C.; THOMPSON, I. P.; BAILEY, M. J. The tritrophic trinity: a source of pollutant-degrading enzymes and its implications for phytoremediation. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 239-244, 2004.

SIVESIND, E.; SEGUIN, P. Effects of the environment, cultivar, maturity, and preservation method on red clover isoflavone concentration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 16, p. 6397-6402, 2005.

SONG, T. T.; HENDRICH, S.; MURPHY, P. A. Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1607-1610, 1999.

SPENGLER, P.; KORNER, W.; METZGER, J. W. Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 1. Chemical analysis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 2133-2141, 2001.

STUMPF, M.; TERNES, T. A.; HABERER, K.; BAUMANN, W. Determination of natural and synthetic estrogens in sewage plants and river water. **Vom Wasser**, v. 87, p. 251-261, 1996.

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

SUMPTER, J. P.; JOBLING, S. Vitellogenesis as a biomarker for oestrogenic contamination of the aquatic environment. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, p. 173-178, 1995.

SWARTZ, M.; KRULL, I. **Analytical method development**. New York: Marcel Dekker. 1997.

TAKASUGI, N.; BERN, H. A. Tissue changes in mice with persistent vaginal cornification induced by early postnatal treatment with estrogen. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 33, p. 855-865, 1964.

TASHIRO, Y.; TAKAHIRA, K.; NAKANISHI, Y. Improved application of recombinant yeast assays on environmental samples by size exclusion chromatography. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 6, n. 6, p. 546-551, 2004.

THAM, D. M.; GARDNER, C. D.; HASKELL, W. L. Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological and mechanistic evidence. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 83, n. 7, p. 2223-2235, 1998.

TERNES, T. A.; EGGERT, T.; MEISENHEIMER, M. **Pflanzliche hormonell wirksame Stoffe in der aquatischen Umwelt und deren Verhalten bei der Trinkwasseraufbereitung**. Project sponsored by Projektträger des BMBF für Wassertechnologie und Schlammbehandlung. Wiesbaden: BMBF, 2001.

THIER, H. P.; ZEUMER, H. **Manual of pesticide analysis**. New York: Verlag Chemie, 1987. p. 37-41.

TOLLEFSON, K. E.; MATHISEN, R.; STENERSEN, J. Estrogen mimics bind with similar affinity and specificity to the hepatic estrogen receptor in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 126, p. 14-22, 2002.

TOPPARI, J.; SKAKKEBAEK, N. E. Endocrine disruption in male human reproduction. In: GUILLETTE, L. J. J.; CRAIN, D. A. **Environmental endocrine disrupters: an evolutionary perspective**. London: Taylor and Francis, 2000.

UNITED KINGDOM ECONOMICS ACCOUNT. **Endocrine disrupting substances in the environment**. London: The Environment Agency's Strategy, 2000. p. 23.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F.; RIEDO, C. R. F. **Análise quantitativa por cromatografia**. Disponível em: < <http://www.chemkeys.com/artigo/12/0>>. Acesso em: 10 out. 2006.

VOULVOULIS, N.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. Alternative antifouling biocides. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 13, p. 135-143, 1999.

WHITTEN, P. L.; PATISAUL, H. B. Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 5-20, 2001.

WHITTEN, P. L.; PATISAUL, H. B.; YOUNG, L. J. Neurobehavioral actions of coumestrol and related isoflavonoids in rodents. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 24, p. 47-54, 2002.

WITTSTOCK, U.; GERSCHENZON, J. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 300-307, 2002.

WORLD WILDLIFE FOUNDATION. **Chemicals in the environment reported to have reproductive and endocrine disrupting effects**. Disponível em: <<http://www.worldwildlife.org/toxics/prog-areas/ed/index.htm>>. Acesso em: 30 set. 2006.

WU, W.; LIU, Z.; SONG, F.; LIU, S. Structural analysis of selected characteristic flavone by electrospray tandem mass spectrometry. **Analytical Sciences**, v. 20, p. 1103-1105, 2004.

YULIANA, N. G.; HANSON, S.; MALISON, J. A.; WENTWORTH, B.; BARRY, T. P. Genistein and other isoflavones found in soybeans inhibit estrogen metabolism in salmonid fish. **Aquaculture**, v. 254, p. 658-665, 2006.

ZIELONKA, J.; GEBICKI, J.; GRYNKIEWICZ, G. Radical scavenging properties of genistein. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, p. 958-965, 2003.

ZOCOLO, G. J.; SOUSA, A. C.; LOPES, M. N. T.; MARCHI, M. R. R. Determination of estrogens (estriol, β -estradiol, estrone and 17 β -ethynylestradiol) in river water from a rural area in Midwest Brazil. **Toxicology Letters**, v. 196, p. S63-S63, 2010.

Apêndice

Tabela 1: Sumário dos resultados da primeira coleta realizada no mês de abril de 2009. Valores em ng L^{-1} . Número de replicatas = 3.

PONTO PLANTAÇÃO (MARGEM DO RIO)							
	Genistina	Daidzina	Daidzeína	Equol	Genisteína	Formononetina	Biochanina A
1° coleta abril de 2009	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV
PAQ1	nd	nd	nd	nd	13,4 ± 2	nd	nd
PAQ2	nd	nd	nd	nd	23,2 ± 2	nd	nd
PAQ3	nd	nd	nd	nd	11,0 ± 10	nd	nd
PAQ4	nd	nd	nd	nd	19,4 ± 7	nd	nd
PAQ5	nd	nd	nd	nd	23,4 ± 19	nd	nd
PAQ6	nd	nd	nd	nd	12,0 ± 3	nd	nd
PAQ7	nd	nd	nd	nd	12,0 ± 3	nd	nd
PAQ8	nd	nd	nd	nd	16,7 ± 1	nd	nd
PONTO PLANTAÇÃO (AFASTADO DA MARGEM DO RIO)							
	Genistina	Daidzina	Daidzeína	Equol	Genisteína	Formononetina	Biochanina A
PAE1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PAE2	nd	nd	nd	nd	12,6 ± 2	nd	nd
PAE3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PAE4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PONTO DEPOIS DA PLANTAÇÃO (MATA CILIAR)							
	Genistina	Daidzina	Daidzeína	Equol	Genisteína	Formononetina	Biochanina A
DAQ1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DAQ2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DAQ3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DAQ4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DAE1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DAE2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DAE3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DAE4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PONTOS ANTES DA PLANTAÇÃO							
	Genistina	Daidzina	Daidzeína	Equol	Genisteína	Formononetina	Biochanina A
AAQ1	nd	nd	14,1 ± 11	nd	nd	nd	nd
AAQ2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AAQ3	nd	nd	14,5 ± 2	nd	nd	nd	nd
AAQ4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AAE1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AAE2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AAE3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AAE4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PONTO AFLORAMENTO DO LENÇOL FREÁTICO (PLANTAÇÃO DE SOJA NA FAZENDA DA UFGD)							
	Genistina	Daidzina	Daidzeína	Equol	Genisteína	Formononetina	Biochanina A
FAZENDA1	nd	nd	nd	161,4 ± 6	16,6 ± 1,0	80,0 ± 2	nd
FAZENDA2	nd	nd	nd	nd	nd	14,8 ± 1	nd
FAZENDA3	nd	nd	123,9 ± 7	1957,3 ± 9	230,5 ± 3	952,5 ± 5	nd
FAZENDA4	nd	nd	20,8 ± 7	nd	nd	nd	nd

Perto da plantação de soja – ponto 2 (PAQ – próximo a margem e PAE – distante da margem), depois da plantação – ponto 3 (DAQ - próximo a margem e DAE – distante da margem) e antes da plantação – ponto 1 (AAQ - próximo a margem e AAE – distante da margem) e ponto Fazenda (afloramento do lençol freático – água utilizada para irrigação), nd – não detectado, CV – coeficiente de variação.

Tabela 2: Sumário dos resultados da segunda coleta realizada no mês de agosto de 2009. Valores em ng L⁻¹. Número de replicatas = 3.

PONTO PLANTAÇÃO (MARGEM DO RIO)							
2° coleta Agosto de 2009	Genistina	Daidzina	Daidzeína	Equol	Genisteína	Formononetina	Biochanina A
	Média ± SD	Média ± SD	Média ± SD	Média ± SD	Média ± SD	Média ± SD	Média ± SD
PAQ1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PAQ2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PAQ3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PAQ4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PAQ5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PAQ6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PAQ7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PAQ8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PONTO PLANTAÇÃO (AFASTADO DA MARGEM DO RIO)							
	Genistina	Daidzina	Daidzeína	Equol	Genisteína	Formononetina	Biochanina A
PAE1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PAE2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PAE3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PAE4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PONTO DEPOIS DA PLANTAÇÃO							
	Genistina	Daidzina	Daidzeína	Equol	Genisteína	Formononetina	Biochanina A
DAQ1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DAQ2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DAQ3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DAQ4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DAE1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DAE2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DAE3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
DAE4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PONTOS ANTES DA PLANTAÇÃO (MATA CILIAR)							
	Genistina	Daidzina	Daidzeína	Equol	Genisteína	Formononetina	Biochanina A
AAQ1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AAQ2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AAQ3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AAQ4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AAE1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AAE2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AAE3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AAE4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
PONTO AFLORAMENTO DO LENÇOL FREÁTICO (PLANTAÇÃO DE SOJA NA FAZENDA DA UFGD)							
	Genistina	Daidzina	Daidzeína	Equol	Genisteína	Formononetina	Biochanina A
FAZENDA1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
FAZENDA2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
FAZENDA3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
FAZENDA4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Perto da plantação de soja – ponto 2 (PAQ – próximo a margem e PAE – distante da margem), depois da plantação – ponto 3 (DAQ - próximo a margem e DAE – distante da margem) e antes da plantação – ponto 1 (AAQ - próximo a margem e AAE – distante da margem) e ponto Fazenda (afloramento do lençol freático – água utilizada para irrigação), nd – não detectado, CV – coeficiente de variação.

Tabela 3: Sumário dos resultados da terceira coleta realizada no mês de dezembro de 2009. Valores em ng L⁻¹. Número de replicatas = 3.

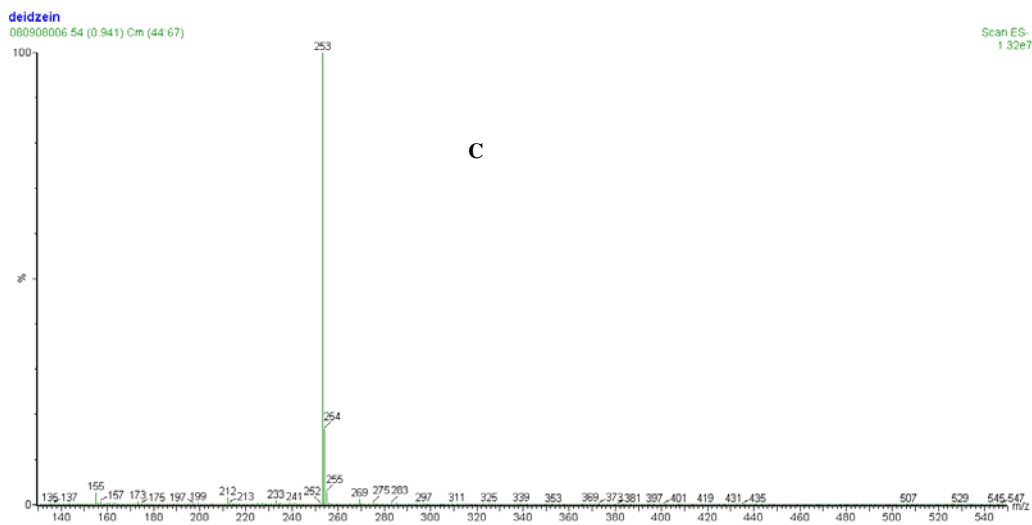
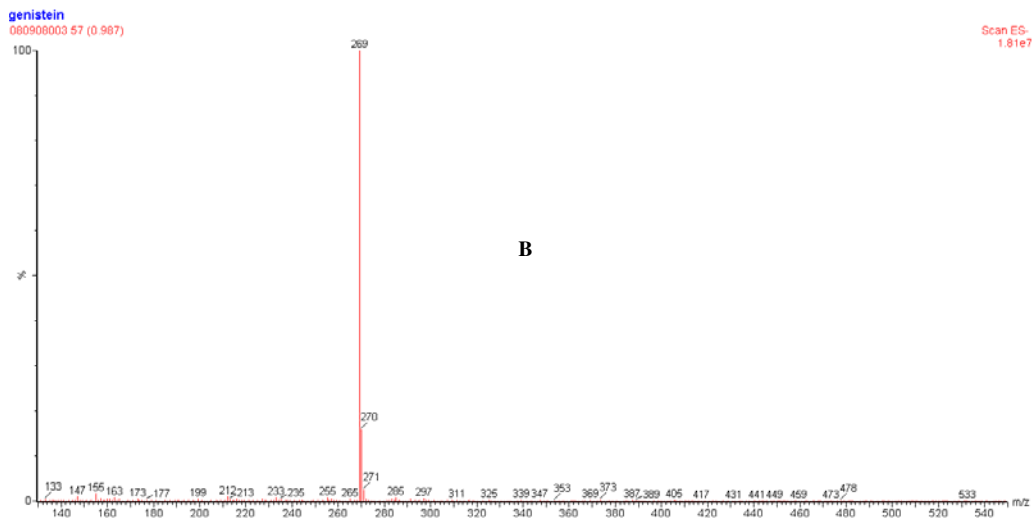
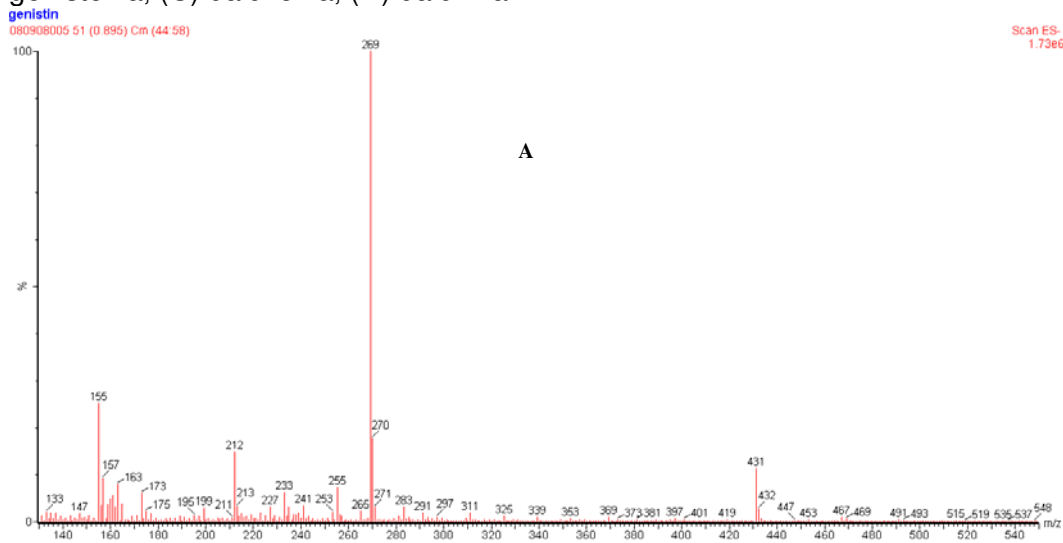
PONTO PLANTAÇÃO (MARGEM DO RIO)							
3° coleta dezembro de 2009	Genistina	Daidzina	Daidzeína	Equol	Genisteína	Formononetina	Biochanina A
	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV
PAQ1	nd	nd	nd	415,0 ± 13	54,1 ± 2	115,0 ± 15	nd
PAQ2	nd	nd	730,0 ± 1	554,3 ± 5	59,0 ± 11	90,3 ± 5	nd
PAQ3	nd	nd	667,6 ± 1	945,8 ± 2	70,1 ± 1	86,1 ± 1	nd
PAQ4	nd	nd	nd	857,3 ± 5	46,7 ± 5	32,0 ± 8	nd
PAQ5	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
PAQ6	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
PAQ7	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
PAQ8	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
PONTO PLANTAÇÃO (AFASTADO DA MARGEM DO RIO)							
	Genistina	Daidzina	Daidzeína	Equol	Genisteína	Formononetina	Biochanina A
PAE1	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
PAE2	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
PAE3	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
PAE4	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
PONTO DEPOIS DA PLANTAÇÃO							
	Genistina	Daidzina	Daidzeína	Equol	Genisteína	Formononetina	Biochanina A
DAQ1	nd	nd	nd	nd	80,0 ± 9	48,7 ± 4	nd
DAQ2	nd	nd	nd	nd	62,4 ± 7	74,0 ± 9	nd
DAQ3	nd	nd	nd	nd	68,5 ± 5	61,7 ± 3	nd
DAQ4	nd	nd	nd	nd	89,5 ± 8	52,3 ± 7	nd
DAE1	nd	nd	nd	nd	81,6 ± 10	75,5 ± 21	nd
DAE2	nd	nd	nd	nd	60,7 ± 9	59,1 ± 10	nd
DAE3	nd	nd	nd	nd	80,2 ± 3	65,5 ± 5	nd
DAE4	nd	nd	nd	nd	85,1 ± 8	62,2 ± 7	nd
PONTOS ANTES DA PLANTAÇÃO (MATA CILIAR)							
	Genistina	Daidzina	Daidzeína	Equol	Genisteína	Formononetina	Biochanina A
AAQ1	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
AAQ2	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
AAQ3	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
AAQ4	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
AAE1	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
AAE2	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
AAE3	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
AAE4	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
PONTO AFLORAMENTO DO LENÇOL FREÁTICO (PLANTAÇÃO DE SOJA NA FAZENDA DA UFGD)							
	Genistina	Daidzina	Daidzeína	Equol	Genisteína	Formononetina	Biochanina A
FAZENDA1	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
FAZENDA2	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
FAZENDA3	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc
FAZENDA4	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc

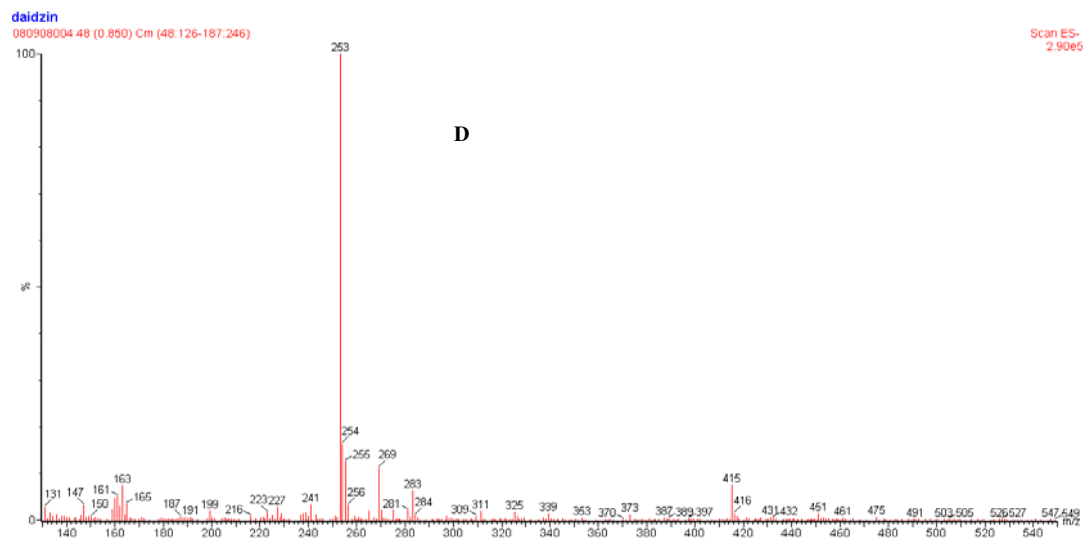
Perto da plantação de soja – ponto 2 (PAQ – próximo a margem e PAE – distante da margem), depois da plantação – ponto 3 (DAQ - próximo a margem e DAE – distante da margem) e antes da plantação – ponto 1 (AAQ - próximo a margem e AAE – distante da margem) e ponto Fazenda (afloramento do lençol freático – água utilizada para irrigação), nd – não detectado, nc – não coletado, CV – coeficiente de variação.

Tabela 4: Sumário dos resultados da quarta coleta realizada no mês de abril de 2010.
Valores em ng L⁻¹. Número de replicatas = 3.

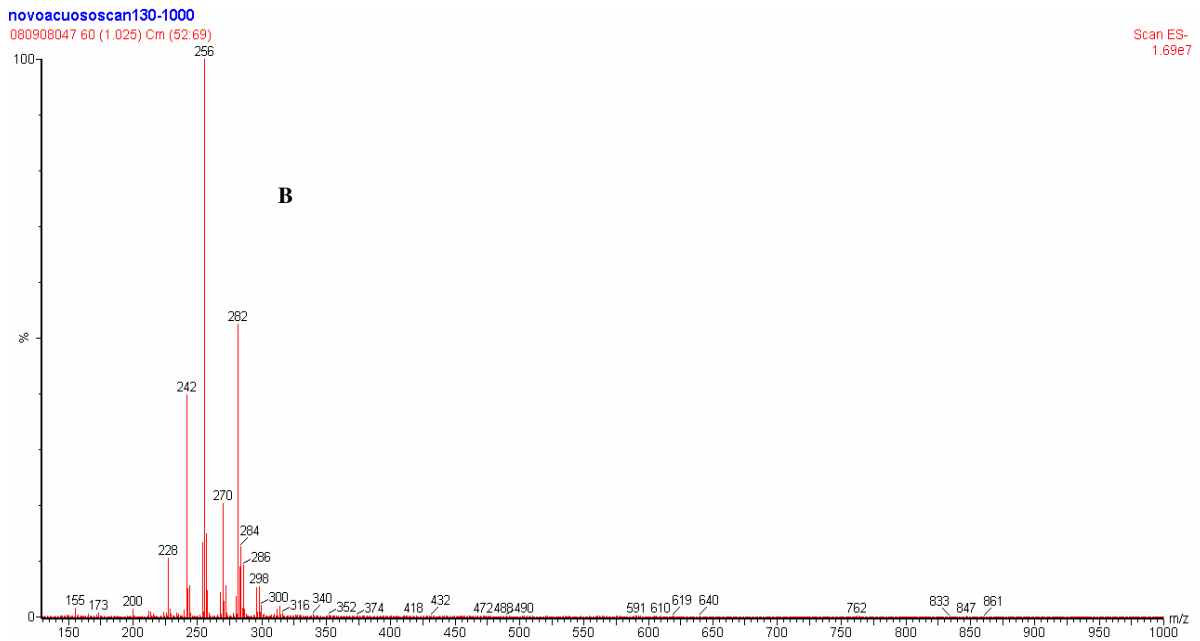
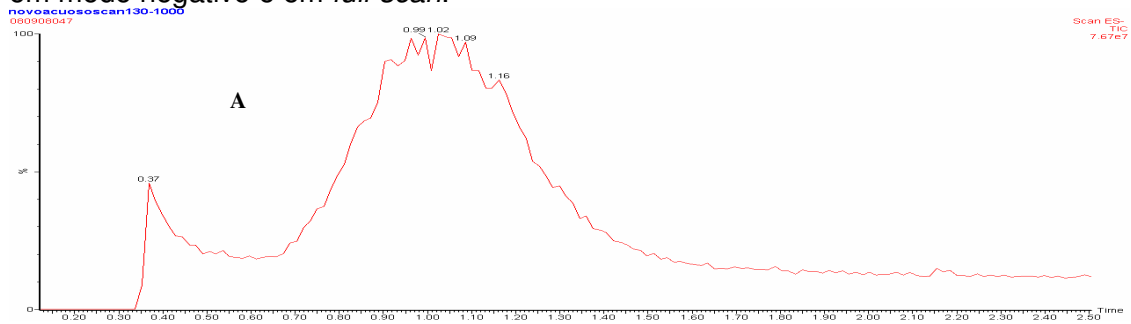
PONTO PLANTAÇÃO (MARGEM DO RIO)							
4° coleta abril de 2010	Genistina	Daidzina	Daidzeína	Equol	Genisteína	Formononetina	Biochanina A
	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV
PAQ1	nd	nd	nd	108,2 ± 4	73,0 ± 3	32,3 ± 4	22,9 ± 5
PAQ2	nd	nd	nd	34,0 ± 13	41,8 ± 1	17,1 ± 10	38,2 ± 6
PAQ3	nd	nd	nd	nd	73,2 ± 6	28,2 ± 29	47,5 ± 13
PAQ4	nd	nd	17,3 ± 2	155,3 ± 4	123,3 ± 4	17,9 ± 7	61,2 ± 11
PAQ5	nd	nd	nd	50,6 ± 1	121,1 ± 6	20,8 ± 1	60,4 ± 1
PAQ6	nd	nd	14,4 ± 5	57,1 ± 5	100,4 ± 8	15,4 ± 4	18,8 ± 3
PAQ7	nd	nd	19,2 ± 2	47,1 ± 3	54,4 ± 5	15,8 ± 2	33,0 ± 5
PAQ8	nd	nd	13,1 ± 1	69,4 ± 2	56,4 ± 7	17,7 ± 5	50,4 ± 6
PONTO PLANTAÇÃO (AFASTADO DA MARGEM DO RIO)							
	Genistina	Daidzina	Daidzeína	Equol	Genisteína	Formononetina	Biochanina A
	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV
PAE1	nd	nd	nd	288,4 ± 6	106,8 ± 4	60,4 ± 6	nd
PAE2	nd	nd	39,3 ± 7	nd	75,9 ± 2	15,4 ± 11	27,3 ± 8
PAE3	nd	nd	nd	nd	86,9 ± 2	13,4 ± 5	25,2 ± 1
PAE4	nd	nd	nd	nd	93,7 ± 8	nd	87,2 ± 1
PONTO DEPOIS DA PLANTAÇÃO							
	Genistina	Daidzina	Daidzeína	Equol	Genisteína	Formononetina	Biochanina A
	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV
DAQ1	nd	nd	nd	nd	40,6 ± 4	30,1 ± 9	12,4 ± 12
DAQ2	nd	nd	46,0 ± 10	nd	38,2 ± 11	29,6 ± 4	14,6 ± 5
DAQ3	nd	nd	36,0 ± 3	nd	28,3 ± 11	32,6 ± 4	12,5 ± 3
DAQ4	nd	nd	nd	nd	26,8 ± 1	28,7 ± 3	nd
DAE1	nd	nd	73,0 ± 4	199,4 ± 2	nd	41,7 ± 2	nd
DAE2	nd	nd	22,0 ± 2	nd	nd	32,3 ± 3	nd
DAE3	nd	nd	nd	nd	nd	23,7 ± 4	19,7 ± 2
DAE4	nd	nd	nd	nd	nd	23,6 ± 4	18,2 ± 2
PONTOS ANTES DA PLANTAÇÃO (MATA CILIAR)							
	Genistina	Daidzina	Daidzeína	Equol	Genisteína	Formononetina	Biochanina A
	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV
AAQ1	nd	nd	nd	260,9 ± 5	32,3 ± 2	nd	nd
AAQ2	nd	nd	nd	251,7 ± 7	31,6 ± 1	nd	nd
AAQ3	nd	nd	nd	nd	33,4 ± 17	nd	nd
AAQ4	nd	nd	nd	nd	32,9 ± 1	nd	nd
AAE1	nd	nd	nd	nd	82,1 ± 8	nd	20,5 ± 4
AAE2	nd	nd	17,3 ± 4	nd	179,8 ± 1	11,3 ± 2	17,4 ± 5
AAE3	nd	nd	nd	nd	97,8 ± 1	13,9 ± 14	26,1 ± 5
AAE4	nd	nd	nd	nd	60,8 ± 10	12,5 ± 5	42,0 ± 1
PONTO AFLORAMENTO DO LENÇOL FREÁTICO (PLANTAÇÃO DE SOJA NA FAZENDA DA UFGD)							
	Genistina	Daidzina	Daidzeína	Equol	Genisteína	Formononetina	Biochanina A
	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV	Média ± CV
FAZENDA1	nd	nd	27,4 ± 4	nd	1475 ± 2	nd	21,4 ± 7
FAZENDA2	nd	nd	24,4 ± 9	nd	1402 ± 1	nd	21,0 ± 1
FAZENDA3	nd	nd	30,8 ± 3	nd	1458 ± 1	nd	30,4 ± 10
FAZENDA4	nd	nd	nd	nd	927 ± 1	nd	14,4 ± 13

Perto da plantação de soja – ponto 2 (PAQ – próximo a margem e PAE – distante da margem), depois da plantação – ponto 3 (DAQ - próximo a margem e DAE – distante da margem) e antes da plantação – ponto 1 (AAQ - próximo a margem e AAE – distante da margem) e ponto Fazenda (afloramento do lençol freático – água utilizada para irrigação), nd – não detectado, CV – coeficiente de variação.

APÊNDICE A – Espectros de Massas em *full-Scan* para os padrões de: (A) genistina, (B) genisteína, (C) daidzeína, (D) daidzina

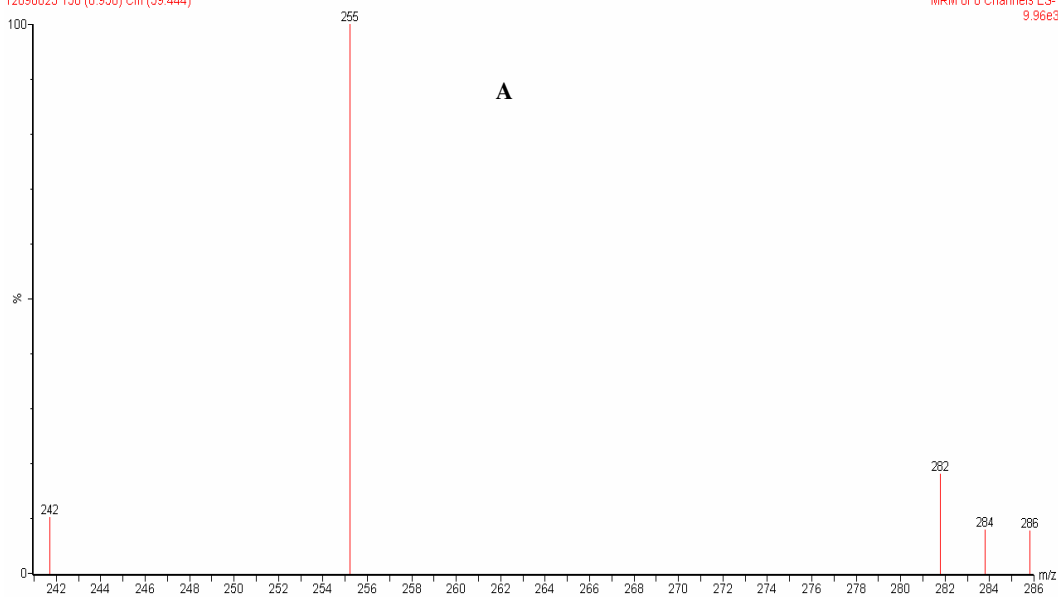


APÊNDICE B – Perfil injeção direta: (A) TIC do extrato aquoso da palha da soja; (B) Espectro de massas obtido por injeção direta do extrato aquoso da palha da soja e adquirido em modo negativo e em *full-scan*.

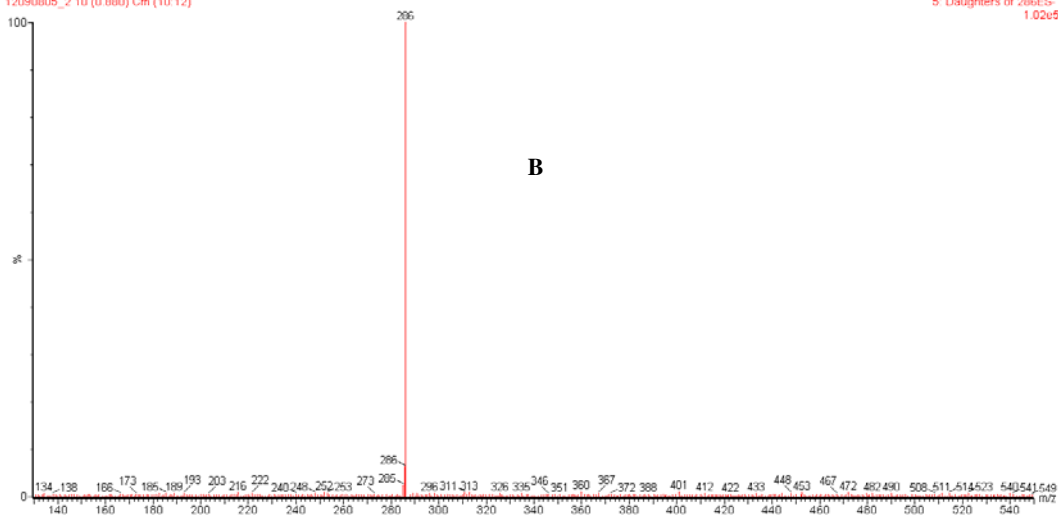


APÊNDICE C – (A) Espectros de Massas *Full-Scan* dos íons detectados no extrato aquoso da palha da soja: (B) m/z 286; (C) m/z 284; (D) m/z 282; (E) m/z 255; (F) m/z 242 Da.

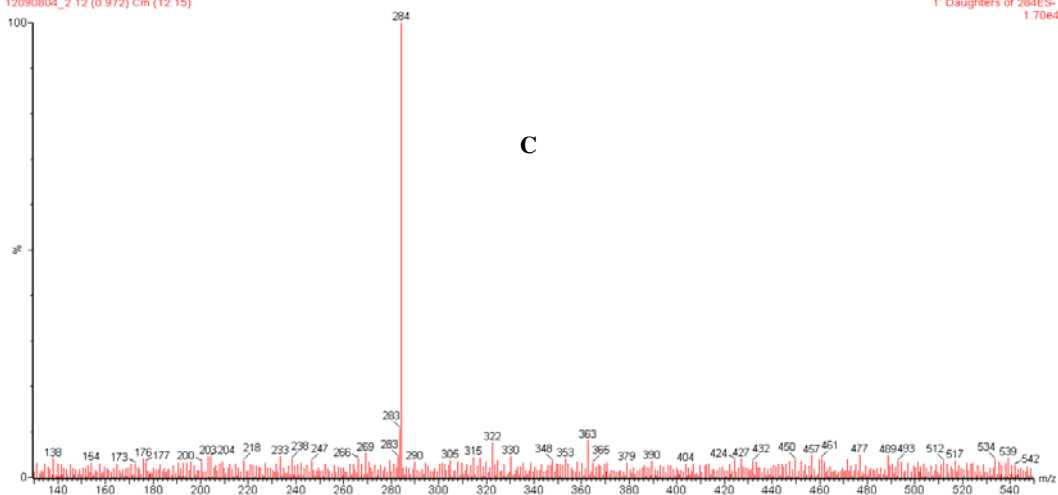
extractoacuoso
12090823_158 (0.956) Cm (59.444)

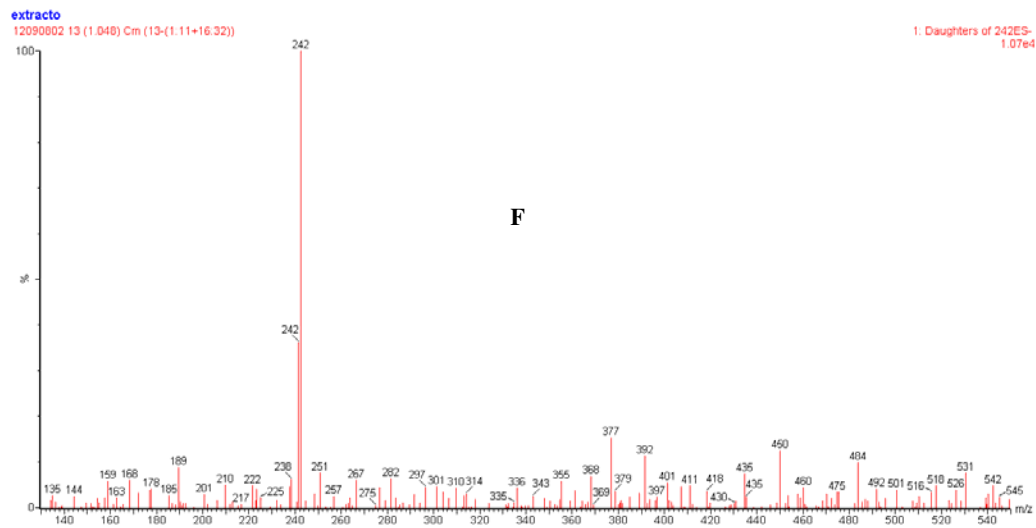
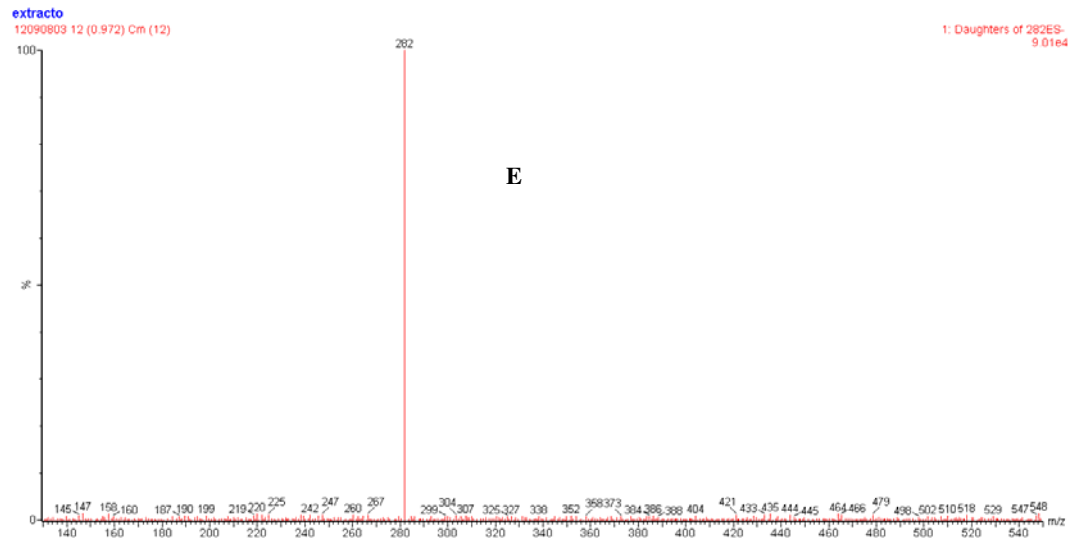
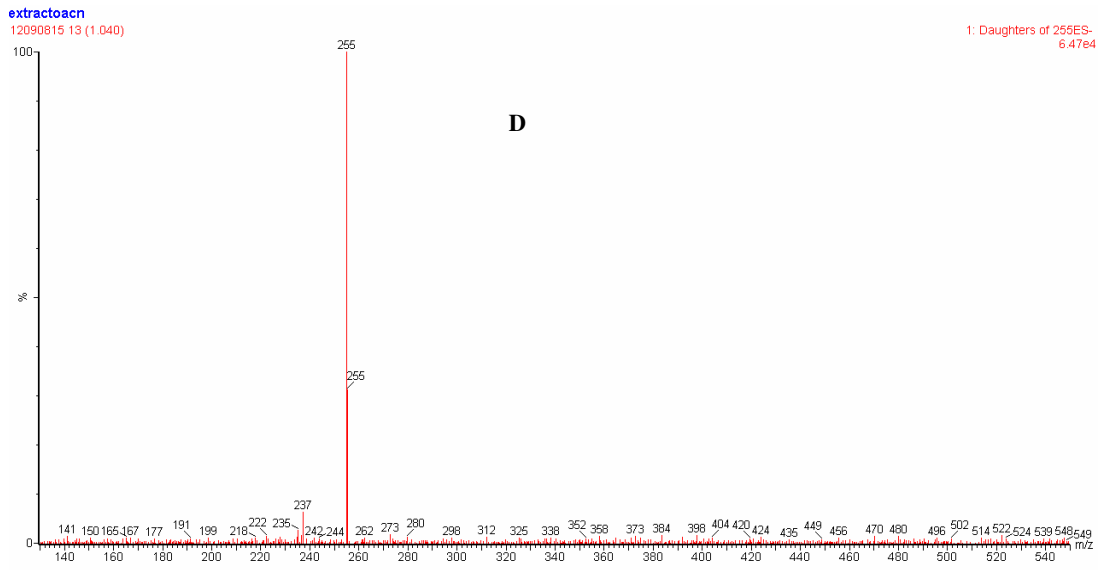


extracto
12090805_2_10 (0.880) Cm (10.12)



extracto
12090804_2_12 (0.972) Cm (12.15)





APÊNDICE D – Cromatogramas representativos do padrão das isoflavonas e das amostras ambientais coletadas.

