

JOÃO BATISTA GOMES DE SOUZA

**ESTUDO DA OCORRÊNCIA DE TETRACICLINAS E ESTRÓGENOS EM ÁGUA
SUPERFICIAL, SUBTERRÂNEA E ESGOTO TRATADO NA CIDADE DE
CAMPO GRANDE (MS)**

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

Orientadora: Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi
Co-orientadora: Profa. Dra. Nilva Ré Poppi

ARARAQUARA
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

S729e Souza, João Batista Gomes de
Estudo da ocorrência de tetraciclinas e estrógenos em água superficial, subterrânea e esgoto tratado na cidade de Campo Grande (MS) / João Batista Gomes de Souza. -- Araraquara : [s.n], 2008
140: il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Mary Rosa Rodrigues de Marchi
Co-orientador: Nilva Ré Poppi

1. Química analítica. 2. Química ambiental. 3. Tetraciclina. 4. Estrógeno.
I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara

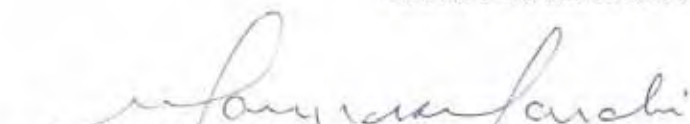
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

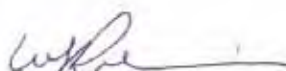
JOÃO BATISTA GOMES DE SOUZA


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

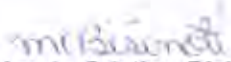
Araraquara, 24 de outubro de 2008.


BANCA EXAMINADORA


Profª Drª Mary Rosa Rodrigues de Marchi (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Profª Drª Maria Lucia Ribeiro
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Profª Drª Maria Lucia Arruda de Moura Campos
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras - USP, Ribeirão Preto


Profª Drª Marcia Cristina Bisinoti
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP, São José do Rio Preto


Profª Drª Anne Helene Fostier
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas

CURRICULO

Dados Pessoais

Nome: João Batista Gomes de Souza

Nascimento: 21/11/1979

Nacionalidade: Brasileiro

Filiação: Sebastião de Souza e Cleuza Gomes de Souza

Formação Acadêmica

Licenciado em Química, concluído em 2002, na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Mestre em Química, área de concentração: Físico-Química: na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Concluído em 29/03/2005.

POPPI, N. R., STRÖHER, G. L, RAPOUSO JUNIOR, J. L., SOUZA, J. B. G.
Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry and source identifications by methods of diagnostic ratio in the ambient air of Campo Grande, Brazil. *Microchemical Journal*. v.86, p.112-118, 2007.

GIROTTO, J. R.; GILDO, NOGUEIRA; K.; MOURA, J. A.; SOUZA, J. B. G.; LOPES, L. G.; MARCHI, M. R. R.; TOGNOLLI, J. O. Estrógenos em água: otimização da extração em fase sólida utilizando ferramentas quimiométricas. *Eclética Química (Araraquara)*, v.32, p.61-67, 2007.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi, pelos ensinamentos, pela disponibilidade e pela oportunidade concedida.

A todos os amigos do GRESCO, em especial ao José Antônio e Laudicéia Giacometti, que multiplicaram meus esforços no trabalho desenvolvido.

A todos os amigos que me acompanharam desde o começo dessa jornada.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pelo espaço cedido para realização deste trabalho e em especial à Profa. Dra. Nilva Ré Poppi, pela co-orientação, amizade, paciência e por todo o incentivo nestes anos de convivência.

Aos meus pais, Sebastião de Souza e Cleuza Gomes de Souza, e toda a minha família pelo incentivo e compreensão que tiveram comigo.

A FUNDECT pela concessão da bolsa no período de três anos.

A Deus, por todas as bênçãos recebidas ao longo da vida.

RESUMO

Os antibióticos, oxitetraciclina, tetraciclina, clorotetraciclina e doxiciclina, os estrógenos naturais, estrona, 17 β -estradiol, e o sintético 17 α -etinilestradiol tornaram-se objetos de estudo nos últimos anos devido aos impactos ambientais que podem causar, mesmo estando presentes em ambientes aquáticos em baixas concentrações provocando alterações biológicas através de diversos mecanismos de ação. Por este motivo, este trabalho teve como objetivo validar métodos para análise dessas substâncias em água superficial, água subterrânea e esgoto sanitário tratado. O método validado para análise de antibióticos baseou-se em cromatografia líquida com detector ultravioleta, foi utilizada extração em fase sólida com cartuchos Oásis-HLB, obtendo-se limites de quantificação de 6,5 ng L⁻¹ para a oxitetraciclina e tetraciclina e 15 ng L⁻¹ para clorotetraciclina e doxiciclina, em água superficial e água subterrânea, não foi possível a validação do método para esgoto sanitário tratado. A cromatografia líquida com detecção por fluorescência foi utilizada para a determinação dos estrógenos. A otimização do preparo das amostras foi obtida utilizando extração em fase sólida com cartuchos C18, o limite de quantificação para a estrona foi de 0,6 μ g L⁻¹ e de 6,25 ng L⁻¹ para o 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol, para as matrizes de água superficial, subterrânea e esgotos sanitário tratado. Os resultados referentes à validação do método mostraram níveis aceitáveis para a recuperação (entre 76 e 118%) e coeficiente de variação (entre 1 e 13%), o que atesta a exatidão e a precisão do mesmo para os níveis de concentração estudados, para todas as matrizes. No estudo em Campo Grande, as amostras de água superficial foram coletadas nos rios Lageado e Guariroba próximo aos pontos de captação do sistema de abastecimento público. Amostras de água subterrânea e esgoto sanitário tratado foram obtidas no campus da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. As tetraciclinas não foram detectadas em nenhuma das amostras, enquanto que os estrógenos puderam ser detectados em várias das amostras coletadas, porém abaixo do limite de quantificação do método, denotando uma contaminação muito baixa. Conclui-se que as amostras estudadas apresentam hormônios em níveis abaixo do possível de exercer efeito biológico (10 ng L⁻¹). Os métodos propostos e validados neste trabalho representam um avanço analítico por permitir a análise em baixas concentrações com seletividade, detectabilidade e sensibilidade compatíveis com os estudos ambientais, representando ainda análises mais econômicas e rápidas. Salienta-se também que este é o primeiro trabalho no Brasil visando a determinação de tetraciclinas em ambientes aquáticos.

ABSTRACT

The antibiotics, oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline and the estrogens: estrone, 17 β -estradiol, and the synthetic 17 α -ethinylestradiol became object of study in the last years due to environmental impacts and serious health problems that they can cause, even when they are present in aquatic environment at low concentrations provoking biological changes through the several mechanisms of action. For this reason, this work had as goal certificate methods to analyze these chemicals in superficial water, subterranean water and treated sanitary drainage. The certificate method to antibiotic analyzes was based in liquid chromatography with ultraviolet detector, it was used extraction in solid phase with cartridge Oasis-HLB, obtaining with that limits to quantification of 6,5ng L⁻¹ to the oxytetracycline and tetracycline and 15 ng L⁻¹ and 6,25 ng L⁻¹ to the 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol, it was not possible the method validation for treated sanitary drainage. The liquid chromatographic with fluorescence detection was used to estrogens determination. The optimization of samples prepare was obtained using extraction in solid phase with C18 cartridge, the limit of quantification to the estrone was 0,6 μ g L⁻¹ and 6,25 ng L⁻¹ to the 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol, to the matrixes of subterranean water and treat sanitary drainage. In Campo Grande resource, the samples of capitation of superficial water were collected at the rivers Lageado and Guariroba next to the capitation places of public supplying system. Subterranean water samples and treated sanitary drainage were obtained at the campus of Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. The results referring to the validation of the method shown acceptable levels to the recover (between 76 to 118%) and the variation coefficient (between 1 to 13%), these show the exactness and the precision of the method to studied levels of concentration, to all the matrixes. The TCs were not detected in any sample, while the estrogens were detected in many of the collect samples, although above the method limit of quantification, indicating a contamination very low. It is possible to conclude that the studied samples present hormones in levels above of the possible to exercise biological effect (10 ng L⁻¹). The proposed and certificated methods in this research represent in analytic advance to allow analyzes in low concentration with selectivity, detect ability and sensibility compatible to the environment studies, that also representing represents analyzes with less cost and more fastness. We also want to protrude that this is the first first work, in Brazil, with the objective to degraded tetracyclines in aquatic environment.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Reação do grupo silanol com silano para preparação de fase ligada. Fonte: Sewell & Clarke (1987). 2
- FIGURA 2 - Orbitais eletrônicos e a absorção e emissão de luz (LENZ, 1997). 3
- FIGURA 3 - Estrutura das Tetraciclinas: CTC, TC, OTC e DC. 29
- FIGURA 4 - Estado de Ionização da TC. Um dos tautomerismos possíveis é mostrado para cada estado de ionização (JIN et al., 2007). 31
- FIGURA 5 - Fluxograma descrevendo o procedimento utilizado para análise da Oxitetraciclina, Tetraciclina, Clorotetraciclina e Doxiciclina em água superficial, água subterrânea e esgoto sanitário tratado. 44
- FIGURA 6 - Espectros de absorbância ultravioleta para: A – Oxitetraciclina; B – Tetraciclina; C – Clorotetraciclina; D - Doxiciclina. Com varredura de 300 a 500 nm. Ácido oxálico 0,01 mol L⁻¹ 45
- FIGURA 7 - Cromatograma (HPLC/UV) obtido na separação das TCs usando o método de análise A (isocrático)- ACN/MeOH/Ác. Oxálico 0,01 mol L⁻¹. Nas concentrações de 0,05 mg L⁻¹ para OTC e TC, 0,12 mg L⁻¹ para CTC e DC. 46
- FIGURA 8 - Cromatograma (HPLC/UV) obtido na separação das TCs usando o método de análise B (gradiente) – (fase móvel A - ACN 1% de Ác. Fórmico; B – MeOH). Nas concentrações de, 0,05 mg L⁻¹ para OTC e TC, 0,12 mg L⁻¹ para CTC e DC. 47
- FIGURA 9 - A) - cromatograma da recuperação das TCs em esgoto tratado B) - cromatograma da recuperação das TCs em água superficial. Nas concentrações, 0,05 mg L⁻¹ para OTC e TC, 0,12 mg L⁻¹ para CTC e DC. 48
- FIGURA 10 - Cromatograma (HPLC/UV) obtido na separação das TCs, no método de análise C (gradiente) – (fase móvel (A):ACN/MeOH (22/8, v/v) e (B): Ác. Oxálico 0,01

mol L⁻¹) Início 80% B - 20 % A até 12 min. ; 20% B - 80% A até 25 min., vazão 1 mL min⁻¹. Nas concentrações de 0,05 mg L⁻¹ para OTC e TC, 0,12 mg L⁻¹ para CTC e DC.... 49

FIGURA 11 – Exemplo de curva de Linearidade para a Oxitetraciclina: A/C – área/concentração, Md – mediana das razões A/C, Ici – intervalo de confiança inferior, Ics – intervalo de confiança superior..... 50

FIGURA 12 – Exemplo de curva de Linearidade para a Tetraciclina: A/C – área/concentração, Md – mediana das razões A/C, Ici – intervalo de confiança inferior, Ics – intervalo de confiança superior..... 50

FIGURA 13 – Exemplo de curva de Linearidade para a Clorotetraciclina: A/C – área/concentração, Md – mediana das razões A/C, Ici – intervalo de confiança inferior, Ics – intervalo de confiança superior..... 51

FIGURA 14 – Exemplo de curva de Linearidade para a Doxiciclina: A/C – área/concentração, Md – mediana das razões A/C, Ici – intervalo de confiança inferior, Ics – intervalo de confiança superior..... 51

FIGURA 15 - Cromatograma (HPLC/UV) obtido na separação das TCs de uma solução padrão com o método de análise A (isocrático) – ACN/MeOH/Ác. oxálico 0,01 mol L⁻¹. Nas concentrações de, 3 µg L⁻¹ para OTC e TC, 9 µg L⁻¹ para CTC e DC. Correspondentes aos LDs do sistema HPLC/UV..... 54

FIGURA 16 - Estrutura dos sorbentes dos cartuchos Strata-X (A) e Oasis-HLB (B). 55

FIGURA 17 - (A) cromatograma HPLC/UV da amostra de esgoto tratado (500 mL) com adição de EDTA 0,02 mol L⁻¹; (B) cromatograma HPLC/UV de amostra de esgoto tratado com adição de padrões das TCs; (C) cromatograma HPLC/UV dos padrões em concentração de 150 µg L⁻¹ para OTC e TC, 480 µg L⁻¹ para CTC e DC..... 57

FIGURA 18 - Comparação entre o cromatograma da solução padrão misto contendo as TCs nas concentrações de 50 µg L⁻¹ para OTC e TC e 120 µg L⁻¹ para CTC e DC (A), branco de laboratório (B), testemunha de água de torneira (C) e testemunha de água superficial (D)..... 59

FIGURA 19 – Cromatogramas HPLC/UV, obtidos nas condições descritas no texto. (A) Amostra de água superficial(rio) fortificada com os padrões das TC nos LD do método (Tabela 18); (B) Amostra de água superficial (rio) sem fortificação; (C) Solução padrão das TC no limite de quantificação do sistema analítico (Tabela 18).....	65
FIGURA 20 - Representação esquemática das principais via de entrada de alteradores endócrinos hormonais em sistemas aquáticos (REIS FILHO et al., 2006; LOPES, 2007). ETE = estação de tratamento de esgoto; ETA = estação de tratamento de água.....	73
FIGURA 21 - Estrutura dos estrogênios estudados neste trabalho.	74
FIGURA 22 - Estruturas dos estrogênios conjugados.....	76
FIGURA 23 - Rota proposta de degradação do 17 β -estradiol (E2) por bactérias do esgoto (LEE e LIU, 2001).....	77
FIGURA 24 - Diferença estrutural dos estrógenos.	78
FIGURA 25 - Método otimizado e validado por Lopes (2007). Em destaque as condições modificadas neste trabalho, para a determinação de 17 α etinilestradiol.....	89
FIGURA 26 - Espectro de fluorescência 3 D de emissão e excitação da estrona (solvente: acetonitrila) (LOPES, 2007).	91
FIGURA 27 - Espectro de fluorescência 3 D de emissão e excitação do 17 β -estradiol (solvente: Acetonitrila) (LOPES, 2007).....	91
.....	91
FIGURA 28- Espectro de fluorescência 3 D de emissão e excitação do 17 α -etinilestradiol (solvente: Acetonitrila).....	91
FIGURA 29 - Gradiente de eluição utilizado para os estrógenos em análise por cromatografia.....	92
FIGURA 30 - Cromatograma obtido da separação dos hormônios Estrona (10 mg L ⁻¹), 17 β -estradiol (0,1 mg L ⁻¹) e 17 α -etinilestradiol (0,1 mg L ⁻¹) em Ác. Oxálico 0,01 mol L ⁻¹ ..	93

FIGURA 33 - Curva de Linearidade para a 17 α -etinilestradiol: A/C – área/concentração, Md – mediana das razões A/C, Ici – intervalo de confiança inferior, Ics – intervalo de confiança superior.	95
FIGURA 34 - Cromatogramas HPLC/FLU. (A) Extrato de água subterrânea fortificada 17 β -estradiol (E2), 17 α -etinilestradiol (EE2) e estrona (E1); (B) Extrato de amostra testemunha (água subterrânea sem fortificação); (C) branco (simulação da extração utilizando água ultrapura). Condições de extração por SPE e de análise como descritas no texto. Concentração: Estrona, 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol, 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$..	98
FIGURA 35 - Cromatogramas HPLC/FLU. (A) amostra de esgoto tratado fortificada com 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e estrona (B) amostra testemunha esgoto tratado sem fortificação; Condições de extração por SPE e de análise como descritas no texto. Estradiol, 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol, 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$	101
FIGURA 36 - Localização Geográfica do Município de Campo Grande (POPPI & SANTIAGO-SILVA, 2005).	105
FIGURA 37 - Mapa hidrogeológico do Aquífero Guarani (CETESB, 2005).....	106
FIGURA 38 - Localização do poço artesiano e da ETE em Campo Grande-MS.	108
FIGURA 39 - Localização das represas dos rios Lageado e Guariroba que abastecem a cidade de Campo Grande(MS). Fonte: Google Earth (2008)a.	109
FIGURA 40 - Ponto de coleta: represa do rio Guariroba. Fonte: Google Earth (2008)b..	110
FIGURA 41 - Ponto de coleta no rio Guariroba.....	110
FIGURA 42 - Ponto de coleta: represa do rio Lageado. Fonte: Google Earth (2008)c. ...	111
FIGURA 43 - Ponto de coleta no rio Lageado.	111

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Alguns métodos empregando SPE para análise de compostos orgânicos em matrizes ambientais e biológicas (PHENOMENEX, 2007).....	6
TABELA 2 - Antibióticos importantes como medicamentos para uso humano e animal (adaptada de KEMPER, 2008)	23
TABELA 3 – Valores obtidos de antibióticos detectados em diversas matrizes de água (adaptada de Kemper, 2008).....	26
TABELA 4 - Valores de pK_a para as Tetraciclinas (ANDERSON et al., 2005).....	30
TABELA 5 - Condições para uso de diferentes sorventes utilizados em SPE encontrados na literatura (SANDERSON et al., 2005)	32
TABELA 6 - Parâmetros utilizados em alguns métodos de análise de TCs em água usando SPE Oasis-HLB	33
TABELA 7 - Métodos de eluição avaliados na separação das TCs	39
TABELA 8 - Procedimento de extração utilizado para os adsorventes (adaptado de Granados et al., 2005).....	41
TABELA 9 - Níveis de fortificação - Estudo de recuperação do método.....	43
TABELA 10 – Tempo de retenção das TCs utilizando-se os métodos A e C (Tabela 7)...	49
TABELA 11 – Exemplo de equações da curva analítica obtidas, intervalo de trabalho e coeficientes de correlação para as TCs no sistema HPLC/UV nas condições do método de eluição A, descrito no texto.	52
TABELA 12 – Concentrações e coeficientes de variação (CV) das TCs, obtido da triplicata, para os 5 pontos da curva analítica (exemplo), utilizando o método A de eluição (Tabela 7).....	52

TABELA 13 - Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) do sistema cromatográfico (HPLC/UV) para as TCs utilizando o método A, descrito no texto.....	53
TABELA 14 - Recuperação e precisão obtidas (n= 3) em água subterrânea.....	55
TABELA 15 - Efeito do EDTA na recuperação de TCs em água superficial, SPE com Oásis-HLB (n=3).....	55
TABELA 16 - Recuperações percentuais e coeficientes de variação (CV) das TCs pelo método proposto em amostra de água enriquecida com os analitos (n=3).....	61
TABELA 17 – Comparação dos resultados obtidos para a exatidão do método proposto em relação a alguns trabalhos da literatura.....	62
TABELA 18 – Comparação dos limites de quantificação do método proposto com os de alguns artigos da literatura. Salvo indicação em contrário, os limites de quantificação do método aqui apresentados foram as menores concentrações das amostras enriquecidas, para as quais a recuperação esteve entre 70-120% com CV < 20%, de acordo com os dados reportados pelos autores.	63
TABELA 19 - Algumas substâncias químicas classificadas como AE (BILA & DEZOTTI, 2007).....	71
TABELA 20 - Excreção diária (μg) per capita de estrógenos por humanos (BILA & DEZOTTI, 2007).....	73
TABELA 21 - Propriedades físico-químicas dos estrógenos estudados	75
TABELA 22 - Alguns métodos analíticos utilizados para determinação de estrógenos em águas naturais ou tratadas (Adaptada, LOPES, 2007).....	81
TABELA 23 – Parâmetros da validação analítica para alguns dos métodos disponíveis na literatura para análise de hormônios estrogênicos em águas naturais (Adaptada, LOPES, 2007).....	84
TABELA 24 - Procedimentos de extração validado por Lopes (2007)	88

TABELA 25 - Estudo de recuperação do método - níveis de fortificação de água subterrânea.....	90
TABELA 26 - Equações da curva analítica, intervalo de trabalho, coeficientes de correlação e de variação do fator de resposta do sistema cromatográfico HPLC/FLU.....	96
TABELA 27 - Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ), em mg L ⁻¹ , do sistema cromatográficos obtidos pelas curvas analítica e de linearidade.....	96
TABELA 28 – Comparação das recuperações percentuais para métodos de extração de hormônios em água subterrânea (V = 1000 mL).....	97
TABELA 29 - Recuperações percentuais e coeficiente de variação (CV) dos compostos analisados pelo método proposto (n=3).....	100
TABELA 30 – Recuperação (%) dos estrógenos estudados, segundo trabalhos da literatura. Dados obtidos para amostras enriquecidas com os analitos.....	102
TABELA 31 - Limite de quantificação (LQ) determinado experimentalmente para os hormônios no método proposto para água subterrânea, superficial e esgoto tratado.....	103
TABELA 32 – Resultados das análises das análises de Estrógenos e Tetraciclinas obtidas neste estudo para os rios Lageado e Guariroba que abastecem o município de Campo Grande-MS, esgoto tratado e água subterrânea.....	112
TABELA 33 – Temperaturas e pluviosidade no Município de Campo Grande, durante o período de coleta (Agritempo, 2008).....	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AceOEt - Acetato de etila

Acet - Acetona

ACN - Acetonitrila

AE - Alterador Endócrino

APCI - Ionização Química a Pressão Atmosférica

BSTFA - Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida

C18 - Sílica funcionalizada com octadecil silano para fase reversa

CDPP - 5-(4''-clorosulfônico-1',1''difenil-4'-yl)-1,1,1,2,2-pentafluoro-3,5-pentanodiona.

CG/MS - Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas

CG/MS/MS ou GC/MS² - CG/MS com dois estágios de ionização

CTC - Clorotetraciclina

DC - Doxíciclina

DCM - Diclorometano

DTF - Ditioeritrol

E1 - Estrona

E2 - 17 β -estradiol

EE2 - 17 α -etinilestradiol

ESI - Ionização por Eletrospray

ETA - Estação de tratamento de água

ETE - Estação de tratamento de esgoto sanitário

Hex - Hexano

HPLC/FLU - Cromatógrafo líquido com detecção por fluorescência

HPLC/UV - Cromatógrafo líquido com detecção na região ultravioleta

MeOH - Metanol

MSTFA - N metil N (trimetilsilil) trifluoroacetamida

MVLN - Células de câncer

OTC - Oxitetraciclina

PDMS - Polidimetilsiloxano

PFBO - Cloreto de pentafluorobenzoila

TC- Tetraciclina

TMSI - Trimetilsilil imidazol

SUMÁRIO

CAPITULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	1
1.2 Fluorescência.....	3
1.3 Extração em fase sólida (SPE).....	4
1.4 Validação de metodologia analítica.....	7
1.4.1 Seletividade.....	7
1.4.2 Linearidade.....	8
1.4.3 Faixa de trabalho.....	8
1.4.4 Sensibilidade.....	9
1.4.5 Precisão.....	9
1.4.6 Exatidão.....	12
1.4.7 Limites de detecção e quantificação.....	14
1.4.8 Robustez.....	15
1.5 Teste de Huber.....	15
CAPITULO 2 - CONTEXTUALIZAÇÃO DA PROBLEMÁTICA ESTUDADA.....	17
CAPITULO 3 - TETRACICLINAS.....	21
3.1. rEVISÃO DA IITERATURA.....	21
3.1.1. Antibióticos.....	21
3.1.2 Antibióticos em água.....	24
3.1.3 Tetraciclina.....	27
3.1.4 Mecanismo de ação e mecanismo de resistência.....	27
3.1.5 Toxicidade e formas de administração.....	28
3.1.6 Características físicas e químicas das TCs.....	29
3.1.7 Análise de Tetraciclina.....	32
3.2. Parte experimental.....	36
3.2.1 Materiais, equipamentos, reagentes.....	36
3.2.1.1 Materiais.....	36
3.2.1.2 Equipamentos.....	37
3.2.1.3 Reagentes, solventes e padrões.....	37
3.2.2 Limpeza da vidraria.....	37
3.2.3 Preparo de soluções padrão.....	38
3.2.4 Desempenho analítico do sistema HPLC/UV.....	38
3.2.4.1 Escolha do comprimento de onda.....	38
3.2.4.2 Escolha da Fase Móvel.....	38
3.2.4.3 Avaliação do desempenho do Sistema Cromatográfico HPLC/UV.....	40
3.2.5 Desenvolvimento da metodologia de extração e pré-concentração das TCs.....	40
3.2.5.1 Escolha do sorvente para SPE.....	40
3.2.5.2 Otimização do método de tratamento das amostras.....	41
3.2.6 Validação do método SPE-HPLC/UV.....	42
3.2.6.1 Seletividade.....	42
3.2.6.2 Exatidão e precisão do método SPE-HPLC/UV.....	42

3.3 Resultados e discussão	45
3.3.1 Escolha da fase móvel e do comprimento de onda para análise das TCs por HPLC/UV	45
3.3.2 Avaliação do desempenho do sistema analítico HPLC/UV para as TCs	46
3.3.2.1 Avaliação da composição da fase móvel	46
3.3.2.2 Sistema de detecção HPLC/UV	50
3.3.3 Otimização da metodologia de extração das TCs usando SPE	54
3.3.4 Validação do método SPE-HPLC/UV para quantificação	58
3.3.4.1 Seletividade	58
3.3.4.2 Exatidão e precisão do método	60
3.6 Conclusões.....	66
CAPITULO 4 – ESTRÓGENOS	68
4.1 Revisão da literatura	68
4.1.1. Alteradores Endócrinos	68
4.1.2 Estrógenos	72
4.1.3 Características físicas e químicas	74
4.1.4 degradação ambiental	75
4.1.5 Efeitos da contaminação ambiental por estrógenos.....	77
4.1.6 Análise de estrógenos em água.....	78
4.2 Parte experimental	84
4.2.1 Materiais, equipamentos, reagentes.....	85
4.2.1.1 Materiais	85
4.2.1.2 Equipamentos	85
4.2.1.3 Reagentes, solventes e padrões.....	86
4.2.2 Limpeza da vidraria	86
4.2.3 Preparação das soluções-estoque.....	86
4.2.4 Avaliação do desempenho do sistema HPLC/FLU	87
4.2.5 Otimização e validação do método de tratamento das amostras	88
4.3 Resultados e discussão	91
4.3.1 Desempenho do sistema analítico HPLC/FLU.....	91
4.3.2 Validação do método	97
4.4 Conclusões.....	104
CAPITULO 5 - ESTUDO AMBIENTAL.....	105
5.1 Caracterização da área de estudo.....	105
5.2 Abastecimento de água em Campo Grande (MS)	107
5.2.1 Captação	107
5.3 Objetivos.....	107
5.4 Obtenção das amostras ambientais deste estudo	108
5.5 Resultados e discussão	111
5.6 Conclusão	116
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	117

6.1 Dificuldades Encontradas	117
6.2 Estudos Futuros	117
REFERÊNCIAS	118
Anexo 1 – Curvas analíticas para os antibióticos	133
Anexo 2 – Curvas analíticas para estrógenos.....	135
Anexo 3 – cromatogramas – recuperação estrógenos	137

APRESENTAÇÃO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Neste capítulo introdutório serão apresentados algumas informações que o grupo de pesquisa GRESCO (Grupo de Estudo em Saúde Ambiental e Contaminantes Orgânicos) acredita ser relevantes sobre as técnicas analíticas utilizadas: HPLC/UV (Cromatografia líquida com detecção na região UV), HPLC/Fluorescência (Cromatografia líquida com detecção por fluorescência) e SPE (extração em fase sólida), uma vez que essas questões estão envolvidas em muitas discussões ao longo desta tese. Também serão apresentadas considerações sobre a validação de métodos analíticos.

2 CONTEXTUALIZAÇÃO DA PROBLEMÁTICA ESTUDADA

Este capítulo apresentará aspectos da presença de antibióticos e estrógenos como contaminantes nos ambientes aquáticos, as vias de introdução destas moléculas no ambiente, bem como, as formas de tratamento de água utilizadas para remoção dessas substâncias. Serão citados também trabalhos desenvolvidos no Brasil enfocando problemáticas similares a estudada neste trabalho.

3 ANTIBIÓTICOS

Este capítulo inicia-se com a apresentação da extensiva dissiminação de antibióticos no ambiente, dentre eles as tetraciclina (TCs), com uma revisão sobre as principais características das quatro mais utilizadas: oxitetraciclina, tetraciclina, clorotetraciclina e doxiciclina. A seguir apresentam-se as etapas de otimização e validação do método utilizado neste trabalho para análise desses antibióticos em água superficial, potável e esgoto sanitário tratado, utilizando tratamento da amostra por extração em fase sólida (SPE) seguido da análise por cromatografia líquida com detecção por UV(HPLC/ UV).

4 ESTRÓGENOS

Devido aumento do interesse em estudar substâncias capazes de interferir no sistema endócrino de humanos e animais, neste capítulo será apresentada uma revisão sobre estes estudo e sobre as principais características dos alteradores endócrinos, com ênfase nos estrógenos: 17 β -estradiol, estrona e 17 α -etinilestradiol. Também serão apresentados os processos de otimização e validação das condições de análise dos estrógenos em água superficial, potável e esgoto sanitário tratado, utilizando cromatografia líquida com detecção por fluorescência (HPLC/Flu) e extração e *clean-up* do analito com extração em fase sólida (SPE).

5 ESTUDO AMBIENTAL

Neste capítulo apresentam-se as principais características da região de estudo (Campo Grande, MS), principalmente em relação à captação e tramanto de água para abastecimento público no município e ao tratamento de esgoto domiciliar na UFMS, local de obtenção das amostras de esgoto tratado. Serão também apresentados e discutidos os dados obtidos para as análises de estrógenos e tetraciclinas nas águas dos rios Lagedo e Guariroba, que abastecem a cidade de Campo Grande-MS, além de água subterrânea e esgoto sanitário tratado da mesma região.

CAPITULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Cromatografia (escrita colorida, do grego) é uma técnica de separação que se baseia na distribuição dos analitos entre duas fases, uma estacionária e outra a móvel (SEWELL & CLARKE, 1987). A distribuição por exclusão, partição ou adsorção seletiva dos componentes é um processo de equilíbrio dinâmico e as moléculas dos analitos ora estão retidas na fase estacionária ora deslocando-se com a fase móvel. De tal forma que cada um dos analitos é seletivamente retido pela fase estacionária levando a separação dos componentes de uma mistura complexa.

São vários os critérios usados para a classificação das diferentes modalidades de cromatografia, sendo os mais comuns relacionados à técnica empregada, ao mecanismo de separação envolvido e aos diferentes tipos de fases utilizadas. Este trabalho teve como ênfase a cromatografia líquida, que emprega como fase móvel um líquido. Esta pode ser classificada de acordo com o mecanismo de separação em cromatografia líquida de adsorção, de partição, de exclusão por tamanho ou de troca iônica. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE em inglês HPLC) utiliza uma pressão alta para forçar a passagem do solvente pelas colunas, estas possuem diâmetros internos reduzidos (3 a 5 mm) e fase estacionária contendo partículas muito pequenas (3-10 μm de diâmetro) que proporcionam separações muito eficientes. Atualmente um equipamento de HPLC possui um sistema de alimentação de solvente composto por bombas, controladores de pressão, controles de fluxo e filtro de entrada; uma válvula de injeção de amostra, uma coluna de alta pressão, um detector e um computador para monitorar o equipamento e apresentar os dados (HARRIS, 2005). Diversos sistemas incluem agora um forno para controle de temperatura da coluna. O aquecimento da coluna geralmente diminui a viscosidade do solvente permitindo um fluxo mais rápido. As colunas analíticas usadas são de aço e possuem entre 10 e 30 cm de comprimento e normalmente são protegidas por uma pequena pré-coluna (coluna guarda), que contém a mesma fase estacionária da coluna principal.

A cromatografia de partição é a mais utilizada entre os quatro tipos de cromatografia líquida sendo classificada em cromatografia líquido-líquido e de fase ligada. A diferença nessas técnicas está no modo como a fase estacionária é mantida nas partículas

do suporte do empacotamento. Na cromatografia líquido-líquido, a fase estacionária é retida na superfície do suporte por adsorção física, e na cromatografia de fase ligada, a fase estacionária está quimicamente ligada à superfície do suporte.

Partículas uniformes de sílica rígida, porosas com diâmetro de 3, 5 ou 10 μm têm sido utilizadas como suporte para as fases ligadas. Os grupos silanóis quimicamente ativos da superfície da sílica reagem com um organoclorossilano (Figura 1) para formar os recobrimentos mais usados em fase ligada que são os siloxanos. Neste caso, geralmente os grupos R são metilas (CH_3) e R' é um grupo alquil ou um alquil-substituído. Grupos silanóis residuais presentes na superfície da sílica são recobertos com grupos trimetilsilil pela reação com $\text{ClSi}(\text{CH}_3)_3$, para eliminar sítios polares de adsorção, que causam a formação de cauda aos picos cromatográficos (HARRIS, 2005).

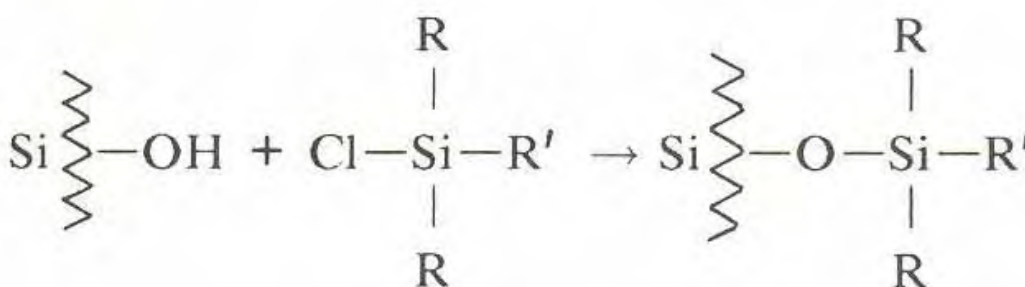


FIGURA 1 - Reação do grupo silanol com silano para preparação de fase ligada. Fonte: Sewell & Clarke (1987).

A natureza do grupo R' pode variar de acordo com a polaridade desejada para a fase estacionária. Geralmente R' é uma cadeia hidrocarbônica (C_6 , C_8 e C_{18}) a qual confere característica apolar à fase estacionária (SEWELL & CLARKE, 1987). De acordo com os autores, tal apolaridade pode ser reduzida com a substituição do grupo CH_3 terminal da cadeia carbônica por um grupo ciano (CN) ou amino (NH_2).

O tipo de coluna influencia diretamente a Resolução (R_s) cromatográfica. Resolução é uma medida da habilidade de uma coluna separar dois componentes. Ela pode ser obtida pela equação: $R_s = \Delta t / w_{1/2 \text{ méd}}$, onde Δt = é a variação do tempo entre as substâncias e $w_{1/2 \text{ méd}}$ = é a média da base dos picos das substâncias (HARRIS, 2005).

Os trabalhos iniciais em cromatografia líquida estavam baseados em cromatografia por adsorção, fase estacionária polar (sílica) e fase móvel um solvente menos polar. Por razões históricas, atualmente denomina-se esse tipo de cromatografia como cromatografia em fase normal. Na cromatografia com fase reversa a fase estacionária é apolar ou fracamente polar e o solvente mais polar, como uma solução aquosa contendo metanol ou acetonitrila. Os empacotamentos para fase ligada são classificados como sendo de fase reversa quando a fase estacionária tem caráter não polar, como C_8 (n-octil) e C_{18} (n-octuldecil), e de fase normal ligada quando o R' na estrutura do siloxano é um grupo funcional polar, como ciano ($-C_2H_4CN$), amina ($-C_3H_6NH_2$) e diol ($-C_3H_6OCH_2CHOHCH_2OH$).

Existem diversos detectores passíveis de utilização em cromatografia líquida, como os detectores na região UV-Vis, de fluorescência, eletroquímico e de espectrometria de massas.

1.2 FLUORESCÊNCIA

Um átomo ou molécula possui orbitais ocupados e orbitais não ocupados por elétrons. No estado fundamental os elétrons se distribuem de forma a minimizar a energia. Existe, porém, a possibilidade de ocupação de orbitais mais energéticos, se for proporcionada certa quantidade de energia. Isto pode acontecer quando um fóton de luz atingir um átomo ou molécula como visto na Figura 2.

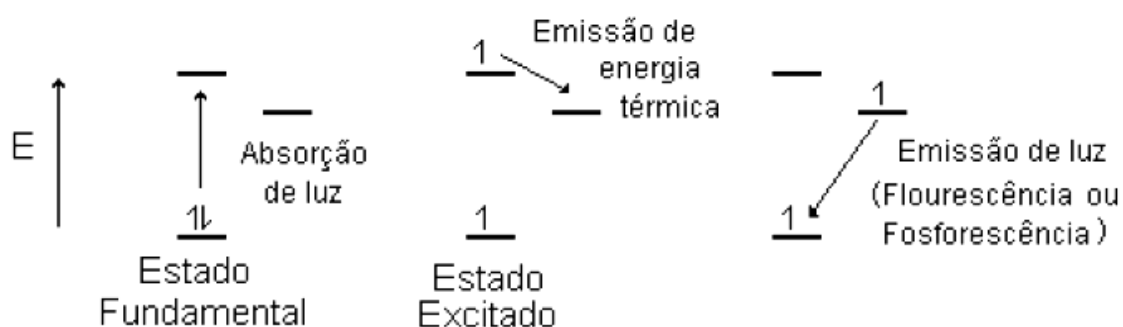


FIGURA 2 - Orbitais eletrônicos e a absorção e emissão de luz (LENZ, 1997).

Este elétron no estado excitado tenderá a voltar para o estado fundamental, no qual o elétron passa para um estado metaestável, emitindo com isso energia térmica, e deste estado volta ao estado fundamental, emitindo luz. Esta emissão de luz é classificada como

fluorescência quando a emissão cessa logo após a extinção da excitação e fosforescência quando a emissão espontânea continua por períodos de tempo mais elevados (até mesmo horas, mas caracteristicamente segundos ou frações de segundos) (LENZ, 1997).

Como descrito a fluorescência ocorre devido à emissão de luz após uma excitação. A fluorescência possui várias vantagens em relação à absorvância, entre as quais se pode destacar a maior sensibilidade, a maior seletividade e a maior dependência do meio circundante (SHELLY & WARNER, 1983). A sensibilidade da fluorescência é de aproximadamente duas ordens de grandeza maior do que a absorvância.

1.3 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

Diante da complexidade das amostras, não é possível a injeção direta das mesmas em um sistema cromatográfico, sendo necessário, geralmente, o preparo por meio da pré-concentração e da limpeza (*clean up*) do extrato concentrado.

A extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE) é uma das várias técnicas disponíveis a ser aplicada no preparo da amostra para análise. De acordo com Lanças (2004), a extração em fase sólida pode ser utilizada para alcançar os seguintes objetivos:

- Concentração do analito (enriquecimento): o objetivo principal é passar, através do cartucho um grande volume da amostra a fim de aprisionar somente o analito, deixando passar o solvente e os interferentes. Na etapa seguinte, elui-se o analito de interesse com pequenas quantidades de solventes, de forma que o analito coletado esteja bem mais concentrado que na amostra original;

- Isolamento do analito (*clean up*): neste caso o objetivo principal não é o de concentrar a amostra, mas sim isolar o analito de interesse dos interferentes da matriz. A amostra original pode ser concentrada o suficiente para a análise por uma técnica apropriada, mas os constituintes da matriz poderão interferir no processo;

- Isolamento da matriz: neste procedimento o objetivo é reter na fase sólida os interferentes da matriz, em vez do analito de interesse (o qual passa direto com o solvente da amostra). O analito é coletado em um frasco para a análise e os interferentes são retidos no cartucho, no qual é eliminado. Este procedimento é usualmente utilizado para *clean-up* e não para a concentração de amostras;

- Estocagem de Amostra: este procedimento é bastante empregado para análise de mostra que se encontram em local distante do laboratório analítico. Neste caso os cartuchos contendo o analito de interesse podem ser mantidos em baixas temperaturas. É importante realizar estudo preliminar para conhecer a estabilidade do analito de interesse no cartucho a ser empregado (tempo de estocagem, temperatura, natureza do cartucho, etc.)

Esses objetivos são alcançados nos quatro passos que envolvem a extração por SPE descrito por Lanças (2004).

- Condicionamento: Esta etapa destina-se a ativar o material existente dentro do cartucho, o solvente empregado dependerá principalmente do material a ser ativado. Tendo como exemplo um cartucho de C-18, esse consiste na passagem seqüencial de solventes com polaridade crescente, para promover arranjo das cadeias carbônicas do sorvente de forma a facilitar o acesso do analito às mesmas, viabilizando a recuperação desejável (PESEK & MATYSKA, 2000).

- Adição da amostra: é feita a passagem da amostra pelo sorvente, onde há a retenção do analito e eventualmente de outras substâncias (SIMPSON & WELLS, 2000). A fim de obter resultados reprodutíveis, a transferência da amostra para o cartucho deve ser quantitativa. A velocidade de aplicação da amostra pode ser crítica em alguns casos, idealmente, esta etapa deve ser lenta, com vazão inferior a 2 mL por minuto.

- Remoção dos interferentes: esta etapa visa eliminar os interferentes com um solvente que não possua força suficiente para retirar o analito de interesse do material de empacotamento. O solvente ideal é o próprio solvente da amostra, caso ele não remova também o analito de interesse;

- Eluição do analito: o ideal é eluir o analito de interesse em um pequeno volume de eluente, de forma que a solução coletada já se encontre em concentração apropriada para a análise. A escolha do eluente é importante neste ponto, pois ele deve eluir o analito de interesse, mas não permitir a eluição de interferentes que não tenham sido eliminados na etapa anterior, por estarem muito retidos. Em geral o solvente de eluição deverá ter maior força de eluição que o solvente usado na etapa anterior.

Na Tabela 1 apresenta-se os detalhes de alguns métodos utilizando SPE na análise de compostos orgânicos em matrizes ambientais e biológicas

TABELA 1 - Alguns métodos empregando SPE para análise de compostos orgânicos em matrizes ambientais e biológicas (PHENOMENEX, 2007)

Solvente	Fase Reversa			Fase Normal		Troca Iônica
	SDB, C18, C8, PH, CN	Sílica, Florisil, NH ₂ , CN	Compostos com polaridade moderada ou alta	Sílica, Florisil, NH ₂ , CN	Compostos ionizados	
Propriedade do analitos	Polaridade baixa ou moderada	Produtos Farmacêuticos, Pesticidas e herbicidas	Compostos com polaridade moderada ou alta	Pesticidas	Compostos ionizados	Troca iônica -: analitos ácidos Troca catiônica – Drogas Básicas
Amostra/Matriz	Soluções aquosas diluídas com tampão	Fluidos Biológicos, Água	Solvente orgânico apolar ou solvente orgânico polar ou com polaridade moderada	Hexano, clorofórmio, éter de petróleo tolueno ou diclorometano	Tampão com baixa força iônica (<30mM), pH ajustável	Fluidos Biológico mais tampão
Condiccionamento	1. Solvente orgânico polar 2. Solução aquosa, tampão	1. Metanol 2. Água ou tampão	1. Solvente orgânico apolar (opcional) 2. Solvente onde se encontra Amostra/Matriz	1. Metanol 2. Hexano ou clorofórmio	1. Solventes orgânicos polar 2. Tampão com baixa força iônica, pH ajustável	1. Metanol 2. 25 mM Tris-OAc, pH 7 (tampão biológico)
Limpeza (cien-up)	Solução aquosa, tampão com 5 a 50% solvente orgânico polar	Metanol:Água (1:9)	solvente orgânico apolar com baixa concentração (1 a 5%) de solventes orgânico com polaridade moderado ou baixa	Hexano com 1% tetrahydrofurano (THF), acetato de etila, acetona, acetonitrila	Tampão com baixa concentrações com ou sem solvente orgânico	Troca iônica: tampão pH 7: Metanol (50:50) Troca catiônica: 1. tampão pH6 2. 1M ácido acético 3. Metanol
Eluição	Solvente (s) orgânico polar ou apolar com ou sem água, tampão e/ou um ácido ou base forte	Metanol:Acetonitrila: HCl (4:4:2)	Solvente orgânico apolar com alta concentração (5 a 50%) de um solvente orgânico moderado ou com alta polaridade	Hexano com 10% THF, acetato de etila, acetona, acetonitrila	Neutralizar a carga do ânion ou cátion e aumentar a força iônica e a concentração do íon	Troca iônica: Hexane: acetato de etila (75:25) + 1% ácido acético glacial Troca catiônica: Metanol + 5% NH ₃

SDB (fase polimérica: estireno-divinilbenzeno), PH (Fenil), CN (ciano), SAX (cartuchos de extração aniônica), SCX (cartuchos de extração catiônica)

1.4 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

A validação de um método deve atender, através de estudos experimentais, às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003). Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para avaliação de métodos de separação são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção (LOD); limite de quantificação (LOQ) e robustez (RIBANI et al., 2004).

Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho (THOMPSON et al., 2002) e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito (SWARTZ et al., 1998). A seguir serão discutidos esses parâmetros de validação.

1.4.1 Seletividade

Seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI et al., 2004).

A seletividade pode ser avaliada de diversas maneiras. Uma delas é a utilização de detectores de arranjo de fotodiodos ou MS, que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza isso para demonstrar que o pico cromatográfico atribuído a um só componente (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). A comparação dos cromatogramas de análise da matriz isenta da substância de interesse e da matriz adicionada com o padrão se constitui num método de avaliação da seletividade, neste caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção do analito. O método da adição de padrão também é utilizado para avaliação da seletividade quando não se tem a matriz isenta do analito. Neste caso comparam-se os coeficientes angulares da curva analítica com a adição de padrão com o da curva analítica sem a presença da matriz.

Quando os coeficientes forem similares pode-se dizer que não há interferência de matriz e que o método é seletivo.

1.4.2 Linearidade

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de pelo menos 5 concentrações diferentes (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

A linearidade pode ser observada a partir de um método matemático conhecido como regressão linear, no qual além dos coeficientes angular e linear, também é possível calcular, através dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação r . Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de correlação (RIBANI, et al., 2004). A ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003) recomenda um coeficiente de correlação igual ou maior que 0,99 e o INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2003) um valor acima de 0,90.

1.4.3 Faixa de trabalho

A faixa de aplicação corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior da substância em exame, que atenda aos requisitos de precisão e exatidão (SWARTZ et al., 1998). A faixa de aplicação é normalmente expressa nas mesmas unidades dos resultados obtidos pelo método, e depende do uso em questão.

A ANVISA recomenda um intervalo compreendido entre 80-120% da concentração teórica para fármacos e medicamentos e de até 120% do limite máximo especificado para determinação de impurezas. Para resíduos, a Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP, 1999) recomenda uma faixa de concentração com valores variando entre a metade e o quádruplo da concentração do limite de quantificação.

1.4.4 Sensibilidade

A sensibilidade é a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. Sob o ponto de vista prático, a sensibilidade constitui o coeficiente angular da curva analítica e é determinada simultaneamente aos testes de linearidade (BRITO et al., 2003; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2003).

Em métodos sensíveis, uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido. Esse critério expressa a capacidade do procedimento analítico de gerar variação no valor da propriedade monitorada ou medida, causada por pequena variação na concentração ou quantidade do analito. Entretanto, tornou-se comum o uso errôneo desse termo para designar método com baixo limite de detecção como sendo um método sensível a determinado analito (BRITO et al., 2003).

1.4.5 Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas (RIBANI et al., 2004). Usualmente a precisão é expressa como o desvio padrão, variância ou coeficiente de variação.

A precisão também pode ser expressa através do intervalo de confiança da média, que nada mais é do que uma faixa de valores no qual existe uma determinada probabilidade de se encontrar um certo valor de uma variável, esta é calculada por:

$$\text{Intervalo de confiança da média} = \bar{x} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Onde: t_{n-1} = valor crítico da distribuição de *Student* com n-1 graus de liberdade. O valor t é tabelado e apresenta valores para diferentes níveis de confiança (RIBANI et al., 2004).

Outra forma muito utilizada de se avaliar a precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV). Estes são calculados através da expressão:

$$\text{RSD(\%)} \text{ ou } \text{CV(\%)} = \frac{s}{x} \times 100$$

Onde: s = desvio padrão das medidas e x = média das medidas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003; BRITO et al. 2003; RIBANI, et al., 2004).

O valor máximo admitido para o RSD é definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método. Em geral métodos que quantificam compostos em macro quantidades admitem um RSD de 1 a 2% e métodos de análise de traços um RSD de até 20% (RIBANI et al., 2004).

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade (mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local e repetições em curto espaço de tempo) (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2003). A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações, e é, algumas vezes, denominada precisão intra-ensaio ou intra-corrída e pode ser expressa através do RSD (RIBANI et al., 2004). Para o cálculo da repetitividade a ANVISA e o ICH recomendam um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex: três níveis, baixo, médio e alto, com três repetições cada um) ou seis determinações a 100% da concentração do teste. O INMETRO sugere sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão e apresenta uma forma diferente de se expressar a repetitividade através da seguinte expressão:

$$r = 2,8 \times S_r$$

Sendo: r = limite de repetitividade e;

S_r = desvio padrão de repetitividade associada aos resultados considerados.

O valor de 2,8 é uma constante, o INMETRO não especifica como essa ela é obtida.

A precisão intermediária refere-se a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). A precisão intermediária é a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da precisão intermediária é verificar se no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI et al., 2004).

O número de ensaios necessários para se avaliar a precisão intermediária segue a mesma recomendação do ICH e ANVISA para o cálculo de repetitividade descrito acima. A precisão intermediária pode ser avaliada através do RSD.

Reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, submetida as condições variadas de medição (mudança de operador, local, equipamentos, etc) (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2003; RIBANI et al., 2004). A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopéias (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

A reprodutibilidade pode ser expressa através dos valores de RSD (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). Outra maneira de verificar a reprodutibilidade é através do limite de reprodutibilidade (R) descrito pelo INMETRO:

$$R = 2,8\sqrt{S_R^2}$$

Sendo: S_R^2 – variância de reprodutibilidade associada aos resultados considerados, para cada laboratório.

1.4.6 Exatidão

A exatidão é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2003; BRITO et al., 2003).

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, ou seja, aparece sempre associado a valores de precisão. Estes limites podem ser estreitos em análises a níveis de concentração elevados e mais amplos na análise de traços (RIBANI et al., 2004).

Os principais métodos propostos para estudo de exatidão, são baseados no uso de materiais de referência certificados (MRC), na comparação do método proposto com um método de referência, no uso de ensaios de recuperação na matriz e em estudos colaborativos (BRITO et al., 2003).

Os MRC são materiais de referência acompanhados de um certificado que possui o valor de concentração de uma ou mais substâncias. Os MRC devem ser utilizados sempre que possível na validação de um método analítico. O processo de avaliação por meio de MRC consiste em analisar um número suficiente de replicatas desse material e comparar os resultados obtidos com o valor certificado. Para esta comparação podem ser utilizados, entre outros, o erro relativo, o teste de hipóteses, o índice z (*Score*) e o erro normalizado (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2003).

A comparação entre métodos consiste na comparação entre resultados obtidos, empregando-se o método em desenvolvimento e os resultados conseguidos através de um método de referência, avaliando o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, o grau de exatidão do método testado em relação ao de referência (RIBANI et al., 2004).

O estudo colaborativo é uma forma especial de ensaio para avaliar o desempenho de um método nas condições normais de trabalho em vários laboratórios, através de ensaio de amostras homogêneas preparadas cuidadosamente (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2003). Para estes estudos são necessários no mínimo oito laboratórios. A validação em estudos colaborativos

é realizada utilizando-se a análise de variância (ANOVA), que determina a existência de diferenças significativas entre os valores obtidos pelos laboratórios envolvidos (BRITO et al., 2003).

O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos. A recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de quantificação (RIBANI et al., 2004).

A exatidão pode também ser avaliada por meio da recuperação de quantidades conhecidas do analito adicionadas a matrizes em branco ou à amostra (dopagem, enriquecimento, fortificação).

O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características da pesquisa. A ICH (1995) estabelece que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração deve ser obedecido. Por exemplo, ensaios em triplicata para três níveis de concentração. Esta recomendação é também adotada pela ANVISA (2003).

Para análises em nível de resíduos, o GARP (GRUPOS DE ANÁLISE EM RESÍDUO DE PESTICIDA) recomenda que se trabalhe nos níveis de adição de 1, 2 e 10 vezes o valor de limite de quantificação. Para componentes em maiores concentrações, os níveis de adição podem ser 50, 75, 100, 125 e 150% do nível esperado para a substância (RIBANI et al., 2004).

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até 20%. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até 15% (RIBANI et al., 2004).

A exatidão pode ainda ser avaliada através do teste de hipótese. Nesse teste estabelece-se como hipótese nula (H_0) $Rec. = 100\%$ e como hipótese alternativa (H_1) $Rec. \neq 100\%$. Para tanto é aplicado o teste t com 95 ou 99% de confiança e $n-1$ graus de liberdade. Os valores de t tabelados são comparados com os calculados pela equação a seguir e se o valor de t tabelado for maior que o valor calculado aceita-se a hipótese nula, o que significa que não há diferenças significativas entre valor encontrado e o valor considerado como verdadeiro (BRITO et al., 2002).

$$t_{\text{calculado}} = \frac{(\overline{\text{Rec}} - 100)}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

Onde: **Rec** é a recuperação média; **s** é o desvio padrão das recuperações e **n** é o número de replicatas.

1.4.7 Limites de detecção e quantificação

Limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada sob as condições experimentais estabelecidas. Enquanto o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob condições experimentais estabelecidas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). O LQ é um parâmetro determinado para ensaios de quantificação. Ambos, LD e LQ podem ser determinados de três maneiras distintas: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica.

O método visual consiste em determinar os limites utilizando a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de tal modo que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável) (RIBANI et al., 2004).

O método da relação sinal-ruído é aplicável em procedimentos analíticos que mostram o ruído da linha base. Para determinar a relação sinal-ruído, é feita a comparação entre os sinais analíticos gerados pelo branco da matriz (matriz isenta do analito) com os de amostras contendo baixas concentrações do analito (adição de quantidade conhecidas do padrão a matriz) destas amostras. Assim, são estabelecidas as concentrações mínimas na qual a substância pode ser detectada e quantificada (RIBANI et al., 2004). A relação sinal-ruído proposta pela ANVISA é de 3:1 para o limite de detecção e de 10:1 para o limite de quantificação.

Outra maneira de se calcular é através de parâmetros da curva analítica. Neste método os limites podem ser expressos como $LD = 3,3 (DP/b)$ e $LQ = 10 (DP/b)$, onde **b** é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica (em níveis próximos ao LQ) e o **DP** é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do

branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação (SWARTZ et al., 1998). Softwares como *Microsoft Excel*[®] ou *Microcal Origin*[®] podem calcular os parâmetros da curva e a estimativa do desvio padrão relativo a estes parâmetros.

Também é bastante usual e plenamente aceitável a determinação dos limites de detecção e quantificação a partir da curva de linearidade, também conhecida como gráfico de resíduos ou Teste de Huber. Neste caso o limite de detecção é o ponto mais próximo ao limite inferior do intervalo linear, e que não pertença à linearidade. Já o limite de quantificação é o limite inferior do intervalo de linearidade.

1.4.8 Robustez

A robustez de um método analítico mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Um método é dito robusto quando este não é afetado por uma pequena e deliberada modificação em seus parâmetros (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2003). A avaliação da robustez de um método cromatográfico é feita, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em CLAE, programação da temperatura, natureza do gás de arraste em CG, bem como o tempo de extração, agitação, etc (RIBANI et al., 2004).

O INMETRO recomenda o teste de *Youden* para determinar a robustez de um método. Trata-se de um teste capaz não só de avaliar a robustez como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual tipo de influência de cada uma dessas variações.

1.5 TESTE DE HUBER

Para rejeitar anômalos com base na curva de linearidade pode-se utilizar o procedimento chamado Teste de Huber (VALENTE, 2006). Quando dispendo das áreas cromatográficas o que se faz é (as etapas de 1 a 6 constituem o chamado Teste de Huber, baseado em medianas para rejeição de anômalos):

- 1) Dividir as áreas pelas correspondentes concentrações, para plotar um gráfico da curva de linearidade: área/concentração vs concentração (A/C vs C);
- 2) Calcula-se a mediana (md) das razões A/C. Para efetuar este cálculo ordena-se as razões de A/C em ordem crescente e faz-se a média dos dois pontos do centro da tabela formada, essa média é a md.
- 3) Calculam-se as diferenças absolutas entre as A/C e md;
- 4) Obter a mediana (mad) dessas diferenças. Para obter a mad ordena-se os valores dessa diferença em ordem crescente (módulo) e faz-se a média dos dois pontos do centro da tabela formada, essa média é a mad;
- 5) Determina-se o intervalo de confiança (IC) pela equação $IC = k \cdot mad$ e estabelece o limite superior e inferior ($IC_{S,I} = md \pm k \cdot mad$) onde k é um valor é um fator que pode variar de 2 a 8, este fator determina a rigidez com que os dados são desprezados;
- 6) Rejeita-se as A/C de valor acima dos $IC_{S,I}$ e, conseqüentemente, as áreas correspondentes a elas;
- 7) Aplica-se a regressão linear às médias das áreas não rejeitadas e concentrações para obter uma equação para a curva analítica.

CAPITULO 2 - CONTEXTUALIZAÇÃO DA PROBLEMÁTICA ESTUDADA

A indústria química introduz no mercado, anualmente, um grande número de novas substâncias, enquanto que a capacidade para estudos e pesquisas conclusivas sobre potenciais impactos desses produtos não acompanha a velocidade de inserção destes produtos no ambiente. Deste modo, somente são conhecidos os reais efeitos maléficos de uma minoria das substâncias e produtos químicos de uso corrente (SANTAMARTA, 2001).

As substâncias orgânicas são utilizadas praticamente em todos os setores do desenvolvimento humano: indústria, agricultura, agropecuária, medicina e produtos domésticos, após o uso podem chegar aos mananciais hídricos e alí representar um impacto à biota. Estas substâncias passam através dos sistemas de tratamento de esgoto e de água que frequentemente não são projetadas para removê-las.

Dentre as diversas substâncias que apresentam este histórico, então os antibióticos e os estrógenos. Trabalhos científicos documentam as implicações ambientais e à saúde humana de estrógenos e antibióticos. Embora, as concentrações destas substâncias em água potável e em efluente de estações de tratamento de esgoto estejam em concentrações baixas (da ordem de ng L^{-1}), são o suficiente para desencadear alterações hormonais em organismos aquáticos, no caso dos estrógenos, ou de fomentar o aparecimento de bactérias resistentes, no caso dos antibióticos (KOYUNCU et al., 2008).

Nos EUA no ano de 2002 uma pesquisa realizada pelo Serviço Nacional de Estatística Agrícola (NASS) mostrou que a produção de animais para alimentação humana era de 104 milhões de cabeças de gado, 8,6 bilhões de aves, 60 milhões de suínos e 275 milhões de peru. O intenso mercado de produção animal, particularmente nos últimos 25 anos, resultou em problemas na qualidade da água associadas ao aumento dos resíduos gerados por este tipo de produção. A produção de gado envolve atualmente o uso de grandes quantidades de diferentes substâncias químicas como antibióticos, hormônios e metais (aditivo alimentar) (ARIKAN et al., 2008).

A contaminação por este tipo de produção se dá, tanto pela disposição da excreta animal diretamente no solo (no caso do manejo extensivo) quanto pela disposição diretamente nos mananciais destes dejetos (no caso do manejo intensivo, ou confinado). O

uso de adubo à base de esterco animal também é outra fonte a ser considerada, pois quando este produto é disposto no solo, geralmente para atuar como melhorador agrícola, os estrógenos, antibióticos e outros constituintes da excreta podem alcançar águas superficiais ou subterrâneas pela lixiviação ou percolação. Corrobora com estas inferências o fato de que muitas destas substâncias usadas na produção animal são encontradas em adubo (JEMBA, et al., 2004) e em água superficial (LAGANA, et al., 2004). Estas substâncias são denominadas micropoluentes ambientais. Seus efeitos adversos podem afetar tanto o ecossistema ambiental quanto o homem.

Duas classes de antibióticos são comumente utilizadas na alimentação animal: sulfonamidas e tetracinas (ARIKAN et al., 2008). Enquanto que as sulfonamidas são substâncias sintéticas, as tetracinas são obtidas naturalmente ou a partir de processos semi-sintéticos. Resíduos destes antibióticos no ambiente são de risco considerável por causa do surgimento de bactérias que possam ser resistentes a eles no ambiente.

No Brasil não se tem referências sobre trabalhos envolvendo análise de tetracinas em amostras ambientais, os trabalhos encontrados envolvem matrizes biológicas e alimentos (RUELA, 2005), ou o desenvolvimento de estudos para detectar bactérias que estejam adquirindo resistência aos antibióticos (MÜRMAN et al., 2008). Este é o primeiro trabalho na análise de tetracinas em amostras ambientais no Brasil.

Os estrógenos fazem parte de um grupo de hormônios esteróides definidos por suas estruturas químicas e pelo seu ciclo de ação. Eles atuam como alteradores endócrinos (substâncias que interferem no sistema endócrino) rompendo as funções fisiológicas de hormônios. As conseqüências da presença destas substâncias no ambiente aquático ainda não são totalmente conhecidas, mas alguns impactos negativos são relatados, por exemplo, a feminização de peixes em rios e efeitos toxicológicos na vida selvagem (GABET et al., 2007).

Embora estes contaminantes sejam encontrados em águas superficiais não está totalmente claro se a contaminação é proveniente de efluentes ou de resíduos da produção animal. Estudos sobre a variação sazonal destas substâncias químicas em água superficial são muito limitados. Em 1973 foi reportado (NORPOTH et al., apud KOYUNCU et al., 2008) que o uso de contraceptivos poderia causar problemas a longo prazo devido à sua persistência no ambiente e à alta atividade biológica que possuem.

Contraceptivos como o 17 β -etinilestradiol (hormônio sintético) foi encontrado em água superficial em diversas partes do mundo (KOYUNCU et al., 2008) o que evidencia que hormônios e produtos farmacêuticos são liberados nos sistemas aquáticos através dos sistemas de tratamento de esgoto, por este motivo os efluentes de tratamento de esgoto é considerado uma das principais vias de contaminação de ambientes aquáticos (ARIKAN et al., 2008).

Em estudos realizados no Brasil, Ghiselli (2006) quantificou estrógenos em águas do rio Atibaia, responsável por 95% do abastecimento do município de Campinas-SP. Raimundo (2007) e Sodr e et al. (2007) analisaram amostras de diferentes pontos da bacia do rio Atibaia, sendo encontrados estrógenos em 35% das amostras. Lopes (2007) realizou estudos em vários pontos do córrego Rico que abastece o município de Jaboticabal-SP, na nascente do rio foi detectada a presença de estrona. Lopes (2007) também encontrou 17 β -estradiol na água potável distribuída no município. Estes estudos estão concentrados basicamente em uma única região do país (interior do estado de São Paulo), por este motivo existe a necessidade de pesquisas em outras regiões para se obter um perfil de como estão às condi es das águas no Brasil.

A ocorrência destas substâncias em águas naturais induziu a busca por métodos de tratamento capazes de remover hormônios e antibióticos de efluentes domiciliares. A coagula o geralmente não   efetiva para remo o destas substâncias em  gua. Porém a adsor o com carbono ativado, processos oxidativos avançados e ultrafiltra o com membrana podem removê-las. A oxida o de alteradores endócrinos e antibióticos pode resultar em rea o e transforma o destas substâncias. Filtra o com membrana que se baseia em nano filtra o e osmose reversa são algumas das técnicas mais promissoras para a remo o de hormônios e antibióticos (KOYUNCU et al., 2008).

A grande quantidade de substâncias orgânicas que tem sido introduzida no ambiente está afetando o desenvolvimento sexual e a reprodu o, não só de diversas espécies animais, senão que, também, dos seres humanos (SANTAMARTA, 2001), por este motivo a obten o de dados sobre a ocorrência dessas substâncias em ambientes aquáticos tornou-se de grande importância.

O crescimento populacional desordenado nas grandes cidades tem sido considerado juntamente com a fragilidade das políticas públicas que fornecem serviços de saneamento básicos precários para a popula o, como os principais responsáveis pela diminui o da

qualidade das águas superficiais. A inexistência de um planejamento ambiental que possa atrair recursos financeiros proporciona uma situação onde o esgoto doméstico é lançado sem tratamento em conjunto com cargas industriais, a liberação desses efluentes vem causando sérios impactos nos sistemas aquáticos superficiais. (RAIMUNDO, 2007).

Considerando-se que não existem estudos no Brasil visando o diagnóstico da ocorrência de tetraciclínas em águas superficiais e que os estudos desenvolvidos no país, enfocando a ocorrência e distribuição de estrógenos, concentram-se nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro. Considerando-se, ainda, que Campo Grande é um dos principais municípios da região Centro-Oeste brasileira, a qual possui uma das maiores biodiversidades do país e cujos recursos hídricos são de grande importância tanto para o Brasil como para os países vizinhos e que, apesar disso, poucos são os dados sobre a contaminação ambiental desta região por micro-poluentes orgânicos. Este trabalho tem como objetivo geral o diagnóstico da ocorrência de tetraciclínas e estrógenos em água superficial da região de Campo Grande(MS).

CAPITULO 3 - TETRACICLINAS

Para consecução do objetivo geral deste trabalho, um dos objetivos específicos incluiu a otimização e validação de método para análise de tetraciclinas em água superficial, subterrânea e esgoto doméstico. As atividades desenvolvidas os dados obtidos e sua discussão estão apresentados neste capítulo.

3.1. REVISÃO DA LITERATURA

3.1.1. Antibióticos

Os antibióticos são utilizados extensivamente em humanos e como medicamento veterinário. Na pecuária, o uso de antibióticos ocorre como promotor de crescimento e também como agentes terapêuticos. O adubo animal que contém antibióticos é freqüentemente aplicado em campos agrícolas onde podem, potencialmente, contaminar águas subterrâneas e águas de superfície. Antibióticos usados em procedimentos terapêuticos em humanos também podem entrar no ambiente, através da excreção (principalmente urina) ou pela disposição de medicamentos vencidos em sistemas de esgoto (BATT et al., 2005) ou pela disposição incorreta de resíduos industriais (JØRGENSEN & HALLING-SØRENSEN, 2000).

O uso extensivo de farmacos veterinários pode ser um problema de saúde pública, pois proporciona o aparecimento e expansão de bactérias resistentes, o que pode causar graves problemas ambientais. Os antibióticos são usados em seres humanos e como medicamento veterinário para prevenir doenças. Eles são definidos como substâncias naturais, combinações semi-sintéticas e sintéticas com atividade antimicrobiana, e podem ser aplicados de forma parenteral, oral e dérmica (KEMPER, 2008).

Essa aplicação em larga escala conduziu a uma ampla disseminação de bactérias resistentes a eles. Bactérias resistentes a antibióticos têm sido encontradas em fezes humanas e na flora intestinal de pessoas saudáveis que, desta forma atuam como reservatório para estas super-bactérias. Reinthaler et al. (2003) encontraram bactérias resistentes a antibióticos em 80,5% de amostras de fezes de pessoas saudáveis. Das

bactérias isoladas, 98% eram *E. coli*. Depois de terem sido concentradas em sistemas de tratamento de esgoto doméstico, estas bactérias entram no ambiente através da água superficial.

A ocorrência de antibióticos em ambientes aquáticos é de interesse ecotoxicológico por causa das alterações que podem provocar em ecossistemas atingidos. A exposição prolongada em baixas concentrações de antibióticos gera a proliferação seletiva de bactérias resistentes que podem transferir os genes de resistência para outras (KEMPER, 2008). Esse tipo de bactéria tem sido encontrada em esgoto doméstico (SCHWARTZ et al., 2003; VOLKMANN et al., 2004), águas superficial e água potável (SCHWARTZ et al., 2003) o que tornou-se um problema de saúde pública crescente nos últimos anos.

Os principais grupos de antibióticos utilizados em humanos e como medicamento veterinário estão listados na Tabela 2.

TABELA 2 - Antibióticos importantes como medicamentos para uso humano e animal (adaptada de KEMPER, 2008)

Classe	Composto	Uso primário	Possíveis efeito colaterais
Aminoglicosídeos	Apramicina	Somente porcos	
	Gentamicina	Todos animais, humanos	Neurotóxico
	Canamicina	Cães, porcos, bovinos, cavalos	Neurotóxico
	Neomicina	Todos os animais	Ototoxíco, nefrotóxico
	Sisomicina	Somente humanos	
	Spectinomycin	Porcos, bovinos, aves e ovelhas	Ototoxícos, nefrotóxico
	Streptomycin	Obsoleto	
β-Lactamas: penicilinas	Amoxicilina	Todos os animais	
	Ampicilina	Todos os animais	
	Benzylpenicilina	Todos os animais	
	Cloxacilina	Bovinos	
	Dicloxacilina	Bovinos	
	Flucloxacilina	Humanos	Reações alérgicas
	Meticilina	Humanos	
	Mezlocilina	Humanos	
	Nafcilina	Humanos	
	Oxacilina	Bovinos	
	Piperacilina	Humanos	
Fenoximetilcilina	Humanos		
	Penicilina G	Humanos	
Cephalosporines	Cefaloxina	Cães	
	Cefalotina	Humanos	
	Cefazolina	Humanos	Reações alérgicas para β-lactamas
	Ceftiofur	bovinos e porcos	
	Cefotaxima	Humanos	
	Cefotiam	Humanos	
	Cefquinoma	bovinos e porcos	
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	Humanos	
	Enrofloxacina	Todos os animais	
	Marbofloxacina	Todos os animais	Artrite em animais jovens
	Flumequina	Humanos	
	Ofloxacina	Humanos	
Macrolídeos	Azitromicina	Humanos	
	Claritromicina	Humanos	
	Eritromicina	Humanos, bovinos e aves	
	Roxitromicina	Humanos	
	Espiramicina	Todos os animais	
	Tilosina	Somente animais	
	Vancomicina	Humanos	
Sulfonamidas	Sulfanilamida	Humanos	
	Sulfadimetoxina	bovinos, porcos, aves	
	Sulfadimidina	bovinos, ovelha, aves	Nefrotóxico
	Sulfametoxazole	Humanos	
	Sulfapiridina	Porcos	
	Sulfatiazole	Humanos	
Tetraciclina	Clortetraciclina	bovinos e porcos	
	Doxiciclina	Humanos, gatos e cães	
	Oxitetraciclina	Humanos, bovinos, ovelha e porcos	Hepatotóxico
	Tetraciclina	Humanos, cavalos, ovelha e porcos	

3.1.2 Antibióticos em água

A ocorrência e destino de antibióticos em ambientes aquáticos tem sido assunto para muitas investigações em vários países (KEMPER, 2008). Mais de 30 substâncias antibióticas foram encontradas em efluentes e afluentes de esgoto, em águas de superfície e até mesmo em água potável. Os fármacos administrados aos animais, ou os seus produtos de biodegração, alcançam os recursos hídricos tanto pelo uso de adubo animal (esterco) nas imediações de corpos d'água superficiais, quanto pela excreção animal diretamente no solo que poderá ser carregado por lixiviação até os mananciais. Deste modo o solo pode agir como uma fonte de contaminação de antibióticos para o ambiente aquático. A maioria dos antibióticos são solúveis em água e então aproximadamente 90% pode ser excretada pela urina e até 75% pelas fezes animais (KEMPER, 2008).

De acordo com Sarmah et al. (2006), a ocorrência de resíduos de antibióticos em rios, lagos ou outro ambiente aquático no EUA não é improvável, quando se determina uma estimativa de 100,000 milhões de kg de fezes e urina estão sendo produzido anualmente pelos 60 milhões de porcos criados no EUA, tendo uma prática comum: o uso de seus dejetos como fertilizante em solo.

Além disto, combinações de antibióticos também podem ser liberadas no ambiente pela aqüicultura. Resíduos e bactérias resistentes em aqüicultura foram relatadas por alguns autores (OLSEN et al., 2001).

Os efeitos das concentrações de antibióticos em bactérias aquáticas e principalmente não aquáticas são desconhecidos. Sabe-se que antibióticos possuem efeitos em organismos que vivem em ambientes aquáticos como algas e *Daphnia (Daphnia Magna)* em concentrações entre 5 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (WOLLENBERGER et al., 2000).

Em condições de teste, em sistemas aquáticos, a maioria das combinações antibióticas examinadas foi persistente, enquanto só poucas foram parcialmente biodegradados (KUMMERER et al., 2000).

A estrutura de β -lactamas como penicilina, benzilpenicilina ou cloxacilina, constituída pelo anel β -lactam, contribui para estabilidade deste grupo no ambiente: o anel pode ser aberto através da β -lactamase, uma enzima difundida em bactérias, ou através de hidrolise química. Assim, normalmente não são encontradas penicilinas intactas no ambiente aquático (MYLLYNIEMI et al., 2000).

Hamscher et al. (2002) não detectou tetraciclina nem tilosina (da família dos macrolídeos) em amostra de água superficial próximo a uma granja de suínos (Suíça). Porém, estas substâncias foram encontradas em baixas concentrações, em amostras de água superficial (Estados Unidos) (KOLPIN et al., 2002). Kim et al (2005) realizaram estudos em efluentes de esgoto e detectou a presença de tetraciclina ($4 \mu\text{g L}^{-1}$) e clorotetraciclina ($1,2 \mu\text{g L}^{-1}$) (Nova Iorque, Estados Unidos). De acordo com um estudo realizado por Lindsey et al (2001), as TCs foram detectadas em água superficial com concentrações variando de $0,07$ a $15 \mu\text{g L}^{-1}$ (Kansas, Estados Unidos). Apenas em uma amostra de água subterrânea foram detectadas TCs. A OTC foi encontrada com maior frequência (KOYUNCU et al., 2008). Um fator que contribui para a não detecção de tetraciclina está relacionado com a forte adsorção na matéria orgânica (KAMPER, 2008).

A contaminação dos ambientes aquáticos através de antibióticos e outros fármacos ocorrem através dos sistemas de esgoto domésticos e hospitalares ou provocadas pela contaminação agrícola e pecuária (KUMMERER, 2001; ZHU et al., 2001; METCALFE et al., 2003; BATT et al., 2005; BATT et al., 2006). A Tabela 3 mostra algumas classes de antibióticos encontrados em água.

TABELA 3 – Valores obtidos de antibióticos detectados em diversas matrizes de água (adaptada de Kemper, 2008)

Classe	Substância	Concentração (ng L ⁻¹)	Matriz	Referência
Macrolídeos	Lincomicina	21,1	Água superficial	Boxall et al. (2005)
		730	Água superficial	Kolpin et al. (2002)
	Claritromicina	260	Água superficial	Hirsch et al. (1999)
	Eritromicina	1,7	Água superficial	Hirsch et al. (1999)
	Roxitromicina	560	Água superficial	Hirsch et al. (1999)
	Tilosina	50	Água superficial	Ashton et al. (2004) Daughton & Ternes (1999)
Sulfonamidas	Sulfadiazina	4,13	Água superficial	Boxall et al. (2005)
	Sulfametazina	240	Água subterrânea	Hamscher et al. (2005)
	Sulfametoxazole	410	Água subterrânea	Sacher et al. (2001)
		480	Água superficial	Hirsch et al. (1999)
		66	Água potável	Mückter (2006)
Trimetopim		20	Água superficial	Boxall et al. (2005)
		200	Água superficial	Hirsch et al. (1999)
Fluoroquinolona	Ciprofloxacina	405	Efluente de ETE	Golet et al. (2001)
	Norfloxacina	120	Efluente de ETE	Golet et al. (2001)
		120	Água superficial	Kolpin et al. (2002)
Tetraciclina	Tetraciclina	400	Água subterrânea	Krapac et al. (2005)
		0,002-0,005	Água superficial	Arikan et al. (2008)
		0,11-1,41	Esgoto	Choi et al. (2007)
	Oxitetraciclina	32,0	Água subterrânea	Kay et al. (2005)
		0,24-6,53	Esgoto	Choi et al. (2007)
		0,005-0,388	Água superficial	Arikan et al. (2008)
	Clorotetraciclina	690	Água superficial	Kolpin et al. (2002)
		0,001-0,186	Água superficial	Arikan et al. (2008)
		0,18-0,50	Esgoto	Choi et al. (2007)
Doxiciclina	0,001-0,146	Água superficial	Arikan et al. (2008)	
	0,03-0,22	Esgoto	Choi et al. (2007)	

3.1.3 Tetraciclínas

As Tetraciclínas (TCs) fazem parte de uma família de antibióticos naturais e semi-sintéticos isolados de várias espécies de *Streptomyces*, e o primeiro membro do grupo, clorotetraciclina (CTC), foi obtida em 1948 por Duggar a partir do microorganismo *Streptomyces aureofaciens*. Há, porém, relatos de que as TCs foram descobertas em meados do ano de 1900, sendo largamente aplicadas desde então (ANDERSON et al., 2005).

As TCs são um grupo de antibióticos de largo espectro de atividade sendo utilizadas contra uma série de bactérias Gran-positivas e Gran-negativas, riquetsias, micoplasma, clamídias e alguns protozoários (ZHU et al., 2001; VIÑAS et al., 2006; KAALE et al., 2008). Relata-se, entretanto, que essa classe de antibióticos é menos eficiente no combate a bactérias Gran-negativas (RUELA et al., 2005).

As mais utilizadas são a oxitetraciclina (OTC), tetraciclina (TC), clorotetraciclina (CTC), doxiciclina (DC) e Minociclina (MC). Além de serem obtidas naturalmente de microorganismos elas podem ser produzidas por processos semi-sintéticos a partir da CTC e da OTC.

3.1.4 Mecanismo de ação e mecanismo de resistência

As tetraciclínas são antibióticos bacteriostáticos que agem inibindo a síntese protéica bacteriana, por se ligar na subunidade ribossomal 30S (tal como os aminoglicosídeos) bloqueando a ligação do aminoacil-RNA transportador no complexo ribossoma-RNA mensageiro (CHERLET et al., 2003).

A resistência antibiótica ocorre quando a bactéria adquire genes que permitem a interferência no mecanismo de ação do antibiótico por mutação espontânea de DNA ou por transformação e transferência de plasmídeos.

Os dois principais mecanismos de resistência às tetraciclínas são (MARK & PLUMER, 2008):

(1) alterações da estrutura ribossomal, reduzindo a afinidade do antibiótico pela subunidade 30S - principal mecanismo para os organismos Gram positivos;

(2) efluxo ativo da droga pela membrana plasmática da bactéria - principal mecanismo para os organismos Gram-negativos.

As principais tetraciclina disponíveis no mercado mundial são: *Tetraciclina* e *Oxitetraciclina* (derivados hidrofílicos) e *Doxiciclina* e *Minociclina* (derivados lipofílicos).

O espectro anti bacteriano das tetraciclina é o mesmo entre todos os seus congêneres, apesar dos derivados lipofílicos serem mais eficazes *in vivo*. As tetraciclina são ativas contra *S. pneumoniae* e *H. influenzae*, podendo ser utilizadas como drogas alternativas (no caso, a doxiciclina) no tratamento da sinusite e exacerbações da bronquite crônica ou bronquiectasias. Contudo, diversas cepas de *S. pneumoniae* são resistentes às tetraciclina. As que apresentam resistência à penicilina são ainda mais resistentes às tetraciclina. Esses antibióticos são eficazes contra *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* e *Bacteroides fragilis* (ação anaerobicida), porém, são consideradas drogas de segunda linha nessas infecções (no caso da meningite, não devem ser usadas por serem bacteriostáticas). A doxiciclina é o antibiótico de escolha para o tratamento das rickettsioses (ex.: febre maculosa), infecções por *Chlamydia trachomatis* (uretrite ou cervicite inespecíficas e o tracoma), e uma excelente alternativa aos macrolídeos para infecções por *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydia pneumoniae* (germes causadores de pneumonia “atípica”) (BRUTON et al., 2007).

3.1.5 Toxicidade e formas de administração

Pelo risco de toxicidade fetal as TCs não podem ser utilizadas em gestantes. A absorção gastro-intestinal da tetraciclina e da oxitetraciclina é reduzida em mais de 50% na presença de alimento. Nas crianças de até 8 anos, as tetraciclina são contra indicadas, pois podem causar uma descoloração nos dentes, com hipoplasia do esmalte - esta alteração é irreversível. Um outro motivo é o suposto prejuízo ao desenvolvimento ósseo na infância. As tetraciclina podem causar ulcerações esofagianas ou gástricas, principalmente quando ingeridas sem líquido. A intolerância gastro-intestinal é um efeito adverso bastante relatado. A diarreia é mais comum com os derivados hidrofílicos (ex.: tetraciclina), por serem mal absorvidos e modificarem a flora intestinal. A colite pseudomembranosa pode ocorrer pela proliferação do *C. difficile*. A hepatotoxicidade (do tipo esteato-hepatite) é rara, mas pode ser fatal em alguns casos. Outros efeitos adversos relatados são: aumento da

relação uréia/creatinina nos nefropatas, descompensação da uremia, vertigens e hipersensibilidade cutânea etc. (BRUTON et al., 2007).

3.1.6 Características físicas e químicas das TCs

As TCs são derivadas de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares. Suas estruturas (Figura 3) baseiam-se num sistema de quatro anéis fundidos linearmente. Suas estruturas são complexas devido à presença de até 4 anéis quirais no sistema. Normalmente, eles ocorrem nas posições 4, 4a, 5, 5a, 6 e 12a, dependendo da simetria da molécula. As configurações dos centros quirais ativos foram obtidas utilizando a técnica de cristalografia de raios-X. Essa técnica também confirmou que C₁ a C₃ e de C₁₁ até C₁₂ as estruturas são conjugadas (COUTO et al., 2000).

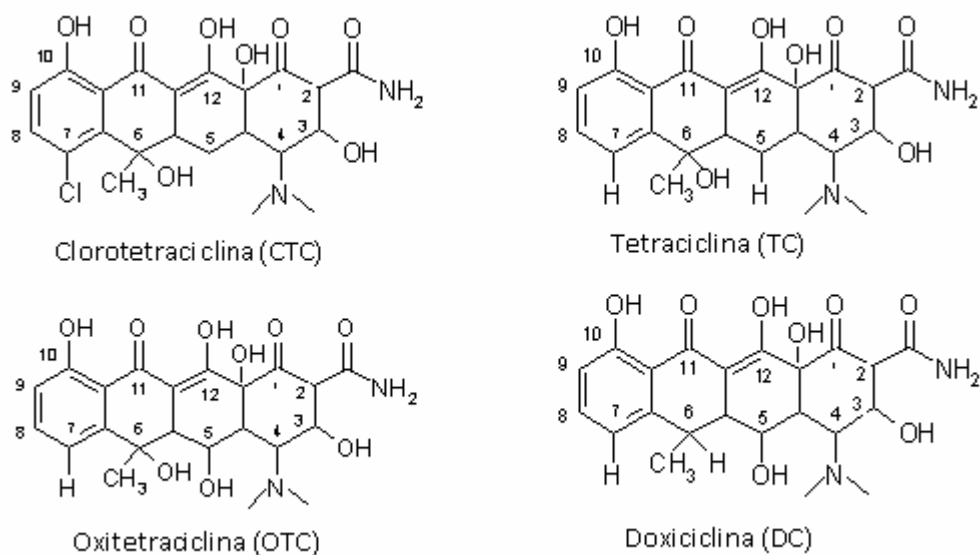


FIGURA 3 - Estrutura das Tetraciclina: CTC, TC, OTC e DC.

As TCs são substâncias cristalinas de natureza anfótera que apresentam três faixas de pK_a (Tabela 4) (KAALE et al., 2008). O primeiro valor de pK_a está relacionado com a desprotonação do grupo hidroxila ligado ao carbono 3 (C3), o segundo e terceiro valores de pK_a são obtidos quando ocorre a perda de um próton do oxigênio ligado ao carbono 12 e do grupo dimetilamônio ligado ao carbono 4, respectivamente (ANDERSON et al., 2005).

TABELA 4 - Valores de pK_a para as Tetraciclina (ANDERSON et al., 2005)

Substâncias	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}
Oxitetraciclina-HCl	3,2	7,5	8,9
Tetraciclina-HCl	3,3	7,8	9,6
Clorotetraciclina-HCl	3,3	7,6	9,3
Doxiciclina-HCl	3,0	8,0	9,2

Estas substâncias apresentam em suas estruturas um grande número de substituintes -OH (hidroxila), que proporcionam alta solubilidade em álcoois como metanol e etanol, apresentam uma solubilidade moderada em outros solventes orgânicos como acetato de etila, acetona e acetonitrila. Também apresentam uma boa solubilidade em água, sendo, por isso empregada a extração com água ou soluções aquosas, quando as TCs encontram-se em concentrações na ordem de $mg\ mL^{-1}$ em matrizes ambientais e/ou biológicas. (ANDERSON et al., 2005).

Como indicado pelos valores de pK_a as TCs possuem cargas em uma faixa ampla de pH e só alcançam um estado neutro global quando atingem o estado zwitterion (íon que possui carga positiva e negativa). Em condições alcalinas as TCs assumem uma configuração que permite que o hidrogênio una-se ao N ligado ao C4 e a OH ligado ao C12a (ANDERSON et al., 2005). As TCs são capazes de assumir várias outras conformações dependendo do meio onde elas se encontram. A Figura 4 apresenta um esquema de algumas possibilidades para cada estado de ionização da TC (JIN et al., 2007).

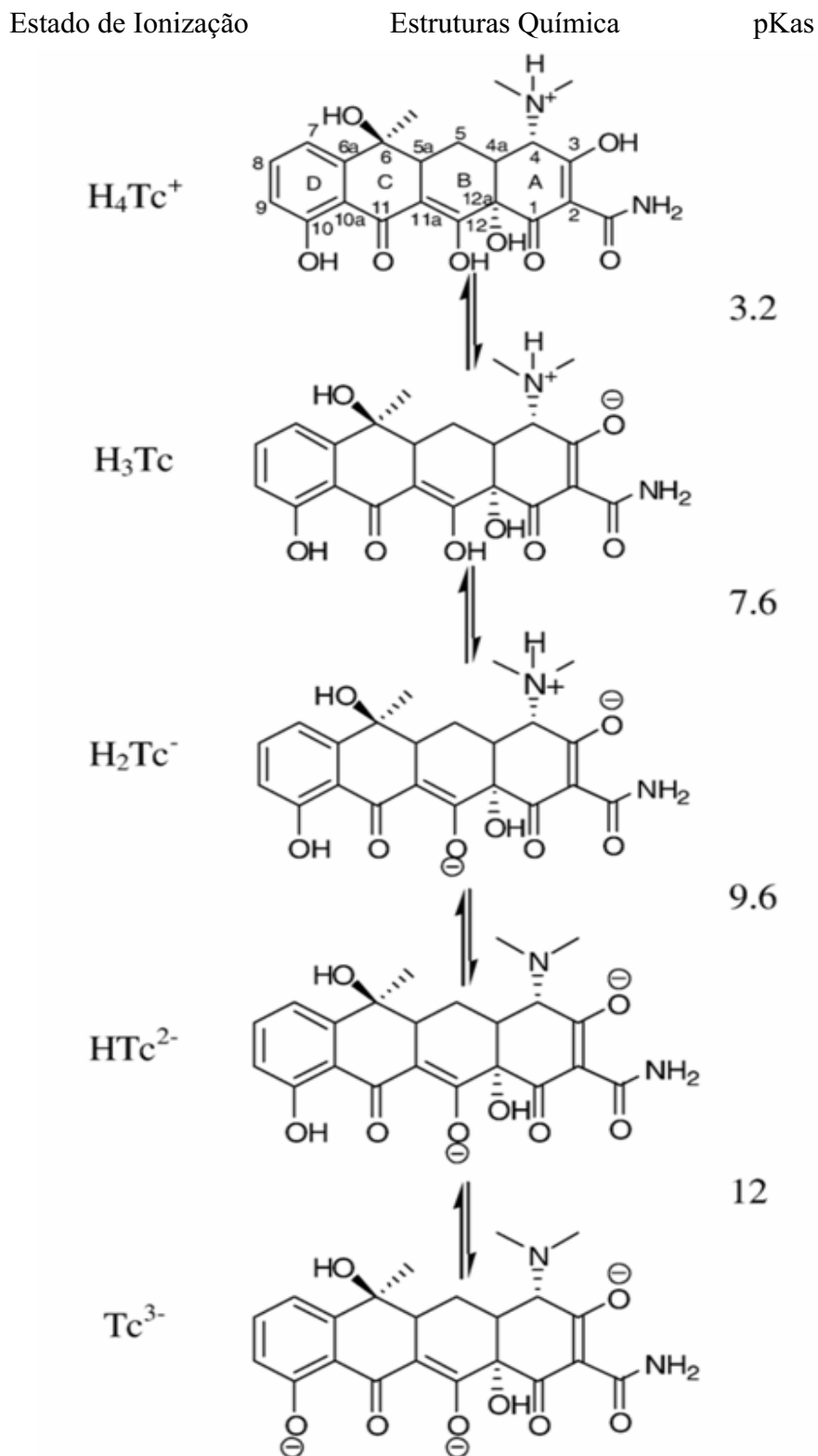


FIGURA 4 - Estado de Ionização da TC. Um dos tautomerismos possíveis é mostrado para cada estado de ionização (JIN et al., 2007).

3.1.7 Análise de Tetraciclina

A extração em fase sólida (SPE) é empregada comumente no tratamento de amostras para análise das TCs.

As TCs possuem uma grande região apolar, os 4 anéis fundidos, devido a essa característica utiliza-se SPE de fase reversa como C18 ou fases poliméricas. Estas substâncias possuem um anel aromático localizado em uma das extremidades da cadeia, este fato permite a utilização de SPE com fase estacionária fenólica para extração.

Devido ao grande número de substituintes que as moléculas das TCs possuem (carbonil, hidroxil e amino), pode-se usar diversas fases de SPE que sofrem interação com esses grupos, como as fases aminopropil e ciano (ANDERSON et al., 2005). A Tabela 5 mostra algumas condições de uso para SPE.

TABELA 5 - Condições para uso de diferentes sorventes utilizados em SPE encontrados na literatura (SANDERSON et al., 2005)

Tipo de Fase	Condicionamento	Limpeza	Eluição
Polimérica (i.e. Oasis HLB)	1.MeOH 2. água 3. ácido (opcional)	Água ou tampão	Contendo 5% MeOH MeOH
C18	1.MeOH 2. água 3. Tampão contendo EDTA (opcionall)	Água ou tampão	MeOH
Fenil	1. ACN 2.Solução EDTA	Água ou tampão	ACN
Amino	ACN	ACN	0,5M Tampão pH 7,5 contendo 10% MeOH

Mesmo com o grande número de fases estacionárias que podem ser utilizadas para SPE na determinação de antibióticos em águas, muitos autores têm publicados trabalhos utilizando basicamente a fase polimérica Oasis-HLB (poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona)), nos procedimentos de extração (CINQUINA et al., 2003; PENA et al., 2003; BATT et al., 2005; BATT et al., 2006). Boas recuperações utilizando Oasis-HLB ocorrem em condições ácidas quando o pH está próximo ou abaixo do primeiro valor de pKa (Tabela 5). Na Tabela 6 são apresentados alguns parâmetros utilizados na análise de TCs utilizando Oasis-HLB na SPE.

TABELA 6 - Parâmetros utilizados em alguns métodos de análise de TCs em água usando SPE Oasis-HLB

Referência	Matriz	Tratamento da amostra	SPE	Análise cromatográfica	TCs/detecção
BATT, et al. (2006)	Água de superfície e esgoto 500 mL	10 mL de Na ₂ EDTA 5%, ajuste do pH de 2,8 a 3, com ácido fosfórico 40 %	Oasis-HLB (500 mg)	LC-MS-MS	LD do método TC 0,044 µg L ⁻¹
			Condicionado com 6 mL de ACN, 6 mL de água deionizada	Coluna Betabasic-18 (C18) (100x2,1 mm, partícula de 3 µm). Fase móvel: A - ACN B - MeOH com 0,3 % de AC. fórmico	
SANDERSON et al. (2005)	Água de superfície 300 mL	0,8 g de Na ₂ EDTA, ajuste do pH 3, com ácido sulfúrico 40 %	Oasis-HLB (200 mg)	LC-MS-MS	LD do método (µg L ⁻¹)
			Condicionado com 3 mL de MeOH, 3 mL de HCl 0,5 M e 3 mL de água deionizada	Coluna Xterra MS (C18) (100x2,1 mm, partícula de 3 µm). Fase móvel A: 20% MeOH:80% de água + 8,25 mmol de AC. Fórmico. B - 95% MeOH:5% de água + 8,25 mmol de AC. Fórmico.	OTC=1,4 TC=2,4 CTC=3,2 DC=2,9
GRANADOS, et al, (2005)	Água superfície, água do mar, 500 mL	Adição de EDTA até uma concentração de 0,02 mol L ⁻¹ , ajuste pH 3,4 ác. com Fórmico, derivação com Mg ⁺² em meio levemente alcalino	Oasis-HLB (200 mg)	HPLC-Fluorescência	LD do método (µg L ⁻¹)
			Condicionado com 5 mL de MeOH, 5 mL de água deionizada	Coluna polimérica PLRP-S (150x4,6 mm, 5µm) 374-499 nm Fase móvel A - 10-2 M ác. Oxálico. B - ACN	OTC=0,04 TC=0,03 CTC=0,125 DC=0,150
BATT e AGA (2005)	Água de superfície 500 mL	0,1 mM do tampão Na ₂ EDTA-McIlvaine, ajuste do pH de 2,8 a 3 com ácido fosfórico 40 %	Oasis-HLB (500 mg)	LC-MS-MS	LQ do método (µg L ⁻¹)
			Condicionado com 6 mL de MeOH, 6 mL de água deionizada	Coluna Betabasic-18 (C18) (100x2,1 mm, partícula de 3 µm). Fase móvel: A - ACN B - MeOH com 0,3 % de AC. fórmico	OTC=0,2 TC=0,15 CTC=0,2
			Eluido com 4 mL de MeOH +10 mM de ác. Oxálico		
			Seco com N ₂ até 0,2 µL resissolução com água até 1 mL		

A recuperação de TCs utilizando C18 no processo de extração sofre algumas interferências, pois, elas possuem afinidade com grupos silanóis residuais do sorbente octadecilsilano, além de formar complexos com resíduos de metais que podem estar presentes nesta fase estacionária (ANDERSON et al., 2005). Fases estacionárias contendo

grupamentos fenil e cicloexil também são empregadas na SPE para determinação de TCs (ANDERSON et al., 2005).

Sorventes que atuam como trocadores de íons não são utilizados como adsorventes para extração das TCs, devido aos valores extremos de pH necessários para a adsorção, este tipo de fase pode ser usado para remover interferentes das matrizes antes de serem eluídas por uma coluna SPE de fase reversa (JACOBSEN et al., 2004).

A maior parte dos métodos relatados utiliza como fase móvel um tampão na presença de ACN. MeOH é utilizado como o único modificador orgânico na maior parte das vezes com ACN. Outros solventes como Tetraidrofurano (THF) em colunas poliméricas ou Dimetilsulfoxido (DMSO) com solução de ácido perclórico em colunas de C8 também são usados sempre na presença de um tampão. Durante o desenvolvimento de um método a escolha de um solvente orgânico, a porcentagem do solvente contra o componente aquoso, a molaridade e tipo do modificador aquoso e a temperatura da coluna, podem provocar efeitos cromatográficos significantes. A possibilidade das TCs formarem complexos inesperados com a fase móvel deve ser levada em consideração na avaliação do sistema cromatográfico (CHERLET et al., 2003; GENTILI et al., 2005; ANDERSON et al., 2005).

Pela polaridade das TCs e pela sua baixa estabilidade térmica, a cromatografia líquida é a mais utilizada na análise destas moléculas. Os principais detectores utilizados para detecção e quantificação de TCs são os de espectrofotometria na região UV, Fluorescência e espectrometria de massas no modo *tandem* (MS/MS).

A utilização de coluna cromatográfica C18 não é recomendada, pois as TCs podem se ligar com os grupos silanóis do sorbente octadecilsilano, outro fator que pode ocorrer é a formação de complexos com resíduos de metais existentes na fase estacionária. Estes fatos fazem com que o uso desta coluna seja restrito mesmo tendo possibilidades de diminuir o impacto sobre as TCs como: pré-eluição, a passagem de EDTA que promove a complexação com metais residuais e a utilização de ácido oxálico na fase móvel para interagir com grupos silanóis e a utilização de colunas C8 e C18 *endcapped* (KAALE et al., 2008).

Colunas de fase reversa *endcapped*, são colunas que possuem um segundo revestimento para cobrir os grupos silanóis residuais na superfície da sílica. Esse tipo de fase apresenta seletividade melhor do que a reversa comum, possibilitando melhor

separação dos analitos polares devido a menor interação com os grupos silanóis (GRACE DAVISON DISCOVERY SCIENCES, 2008).

Colunas poliméricas (polistireno/divinilbenzeno) são largamente aplicadas para análises de moléculas anfóteras como as tetraciclinas. O material polimérico não contém resíduos de metais e nem de grupos silanóis, eliminando assim os problemas que possam interferir no desempenho da separação, além de apresentar estabilidade e excelente reprodutibilidade. Para determinação de TCs por HPLC/UV, são usados comprimentos de onda entre 200 – 450 nm em meio ácido (NAOTO et al., 2003; ANDERSON et al., 2005).

Esse mesmo procedimento (acidificação da fase móvel) é utilizado nas análises por MS/MS (CHERLET et al., 2003; GENTILI et al., 2005). Para este fim pode-se usar vários tampões como fosfato, acetato, ácido cítrico, ácido o-fosfórico, ácido perclórico ou ácido trifluoacético. (LINDSEY et al., 2001; CHERLET et al., 2003; NAOTO et al., 2003; VIÑAS et al., 2004; ANDERSON et al., 2005). Porém, os ácidos mais usados são os ácidos oxálico e fórmico, pois possuem a capacidade de diminuir o efeito de grupos silanóis residuais da fase estacionária, pois possuem grupos hidroxilas (-OH) capazes de efetuarem ligações entre eles. O ácido oxálico pode afetar a seletividade da coluna permanentemente, por este motivo sugere-se que a coluna analítica seja usada apenas para estas análises (ANDERSON et al., 2005). A adição de EDTA na fase móvel é uma forma de diminuir o efeito de metais residuais sobre as TCs.

Alguns autores alertam que o uso de tampões e a existência de resíduos de metais podem distorcer os espectros obtidos na região abaixo de 240 nm, na determinação de TCs por HPLC/UV (WALSH et al., 1992; SOKOL & MATISOVA, 1993).

É conhecido que as TCs formam quelatos com alguns íons metálicos que são altamente fluorescentes; as reações de complexação são rápidas, e a derivação das TCs pode ocorrer antes ou pós-coluna e na própria fase móvel. A reação para obter quelatos fluorescentes é uma opção para a análise de TCs através de cromatografia líquida (GRANADOS et al., 2005)

Para determinação por fluorescência, as TCs passam por um processo de derivação. São submetidas a uma solução neutra ou ligeiramente básica na presença de íons metálicos, Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , ou Al^{3+} , esse procedimento pode ocorrer antes ou após a separação na coluna cromatográfica. A detecção ocorre em torno de 380–390 nm de excitação e entre

490–520 nm de emissão dependendo do metal utilizado na derivação (ANDERSON et al., 2005; GRANADOS et al., 2005).

A intensidade fluorescente é constante entre pH 6,5–7,5 e máxima em torno de pH 7,5 (IWAKI et al., 1992). Na maioria dos casos descritos na literatura a reação de derivação ocorre pós-coluna, utilizando-se ACN-ácido oxálico como fase móvel seguida pela introdução de acetato de magnésio em pH 9 com tampão borato ou solução de cloreto de alumínio. (PENA et al., 2005). Vários outros tampões podem ser usados para fornecer as condições propícias à derivação e detecção por fluorescência, como imidazol 1,0 M pH 7,2, Glicina 0,1M pH 12 e acetato 0,1M pH 6,5 (BRILHANTE et al., 2001).

3.2. PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1 Materiais, equipamentos, reagentes

3.2.1.1 *Materiais*

- vidraria de uso comum em laboratório (béquer, erlenmeyer, pipeta, balão volumétrico);
- seringa de vidro de 5 mL, fabricada pela *Yale*;
- microseringa de vidro de 100 e 250 μ L, fabricada pela *Hamilton*;
- unidade filtrante PVDF (fluoreto de polivinilideno), Durapore, *Millipore*, 0,45 μ m de diâmetro de poro e 13 mm diâmetro do filtro;
- filtro de fibra de vidro GF-C, 47 mm de diâmetro, 1,2 μ m de diâmetro de poro, marca *Schleicher & Schuell*;
- conjunto de filtração para extração em fase sólida, com 12 posições, *Millipore*;
- conjunto de filtração, marca *Millipore*;
- compressor-aspirador modelo *DIA PUMP CAL*, marca *Fanem*;
- cartuchos: Oasis-HLB da *Waters* (200 mg, 6 mL poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona) e Strata-X da *Phenomenex* (200 mg, 6 mL, poliestireno-divinilbenzeno)
- outros materiais: suporte, garra, papel indicador de pH *colorpHast*.

3.2.1.2 Equipamentos

- Banho de ultra-som, 40 Hz, 20 L, *Thornton*;
- Balança analítica *Mettler Toledo AG 245* (0,0001 g);
- Sistema de cromatografia líquida marca *Varian* e modelo *ProStar* (San Francisco, USA), com duas bombas modelo 210, detector UV-Vis modelo 320, injetor de amostra manual e loop de 20 µL. Equipado com uma pré-coluna ZORBAX Eclipse XDB-C18 *endcapped* com 30 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno e coluna analítica ZORBAX Eclipse XDB-C18 *endcapped* com 250×4,6 mm, com partículas de 5 µm (*Agilent Technologies, USA*). Os dados cromatográficos foram processados utilizando-se o programa do equipamento *Star Workstation* versão 6.0;
- Sistema de purificação de água *Milli-Q* Gradiente, da *Millipore (USA)*;
- Espectrômetro Ultravioleta-Visível, *Hitachi*, U-3000.

3.2.1.3 Reagentes, solventes e padrões

O metanol e acetonitrila, grau HPLC (*J.T.Baker, USA*), foram os solventes utilizados como fase móvel nas separações cromatográficas.

Extran alcalino (*Merck, Brasil*) foi o detergente utilizado na limpeza dos materiais de vidro.

Padrões das TCs na forma de cloridratos (*Sigma-Aldrich, USA*): OTC (95%), TC (97%), CTC (99%) e DC (98%).

EDTA sal dissódico, grau P. A. da *Synth (Brasil)*, foi utilizado para a formação de complexo com metais na amostra e eluido através da coluna cromatográfica com o mesmo objetivo.

Acido oxálico e ácido fórmico, grau P.A da *Synth (Brasil)*, foram utilizados para ajuste de pH da fase móvel.

3.2.2 Limpeza da vidraria

A vidraria foi lavada utilizando detergente alcalino Extran (2%) em banho de ultrassom por 15 minutos, exceto a vidraria volumétrica que foi deixada imersa nesta

solução. Em seguida, foi enxaguada com água de torneira, água destilada, água deionizada e seca ao ar.

3.2.3 Preparo de soluções padrão

Todas as soluções padrão foram preparadas em ácido oxálico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Essas soluções foram utilizadas na avaliação da resolução cromatográfica, sensibilidade e obtenção das curvas de linearidade e analítica.

No estudo para otimização da resolução cromatográfica utilizou-se solução padrão contendo todas as TCs na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ em ácido oxálico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução de EDTA na concentração de $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ foi eluída através da coluna analítica (*ZORBAX Eclipse XDB-C18 endcapped*) para minimizar o efeito da formação de complexo das TCs com metais residuais da coluna e na adição na amostra.

3.2.4 Desempenho analítico do sistema HPLC/UV

3.2.4.1 Escolha do comprimento de onda

Os espectros de absorção na região ultravioleta das TCs foram obtidos para as soluções em ácido oxálico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 10 mg L^{-1} de cada um dos analitos, efetuando-se a varredura de comprimento de onda de 300 a 500 nm em cubeta de 1,0 cm.

3.2.4.2 Escolha da Fase Móvel

Para otimizar a separação cromatográfica foram avaliadas diferentes composições da fase móvel, como mostra a Tabela 7. A escolha dos solventes e de suas proporções iniciais foi efetuada a partir de informações disponíveis na literatura (GRANADOS et al., 2005; RUELA et al., 2005). Utilizou-se para este estudo soluções padrão das TCs nas concentrações de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ para OTC e TC, $0,12 \text{ mg L}^{-1}$ para CTC e DC e volume $20 \mu\text{L}$ injetado diretamente no sistema HPLC/UV.

TABELA 7 - Métodos de eluição avaliados na separação das TCs

Método A				Método B				Método C			
A = ACN/MeOH (22:8 v/v) B = Ác. Oxálico 0,01 mol L ⁻¹				A = ACN com 0,01% ác.fórmico B = MeOH				A = ACN/MeOH/ (22:8, v/v) B = Ác. oxálico 0,01 mol L ⁻¹			
Tempo Min	% A	% B	Vazão mL min ⁻¹	Tempo min	% A	% B	Vazão mL min ⁻¹	Tempo min	% A	% B	Vazão mL min ⁻¹
0 - 12*	30	70	1,0	0 - 8,45*	35	65	1,0	0 - 12*	20	80	1,0
				13**	40	60	1,0	25**	80	20	1,0
				17**	65	35	1,0				

* eluição no modo isocrático; ** eluição no modo gradiente.

3.2.4.3 Avaliação do desempenho do Sistema Cromatográfico HPLC/UV

O desempenho do sistema cromatográfico foi avaliado pelos parâmetros obtidos nos gráficos de linearidade (área/concentração x concentração) e curva analítica (área x concentração), tais como os coeficientes de correlação angular e linear da curva analítica e coeficientes de variação calculados para cada ponto da curva.

Também foram calculados os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) pelos parâmetros da curva analítica, usando a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear.

A curva analítica foi construída com 5 pontos e 3 repetições para cada ponto, conforme recomendado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA, 2003).

Também se utilizou o método da relação sinal/ruído (RIBANI et al., 2004) para determinação dos LD e LQ. Para isso tomou-se uma solução contendo as quatro TCs fazendo a comparação entre a medição dos sinais da solução em baixas concentrações com a de um branco (solução isenta do composto de interesse). A relação adotada para o LD foi de 3:1 e para LQ de 10:1.

3.2.5 Desenvolvimento da metodologia de extração e pré-concentração das TCs

Para desenvolvimento da metodologia de extração e pré-concentração testes de recuperação foram efetuados pela adição de padrão à água inicialmente de torneira do Departamento de Química da UFMS, que consiste em água subterrânea sem tratamento. Realizou-se o estudo para a escolha do solvente, condicionamento do cartucho, da capacidade de adsorção da fase sólida polimérica, solventes para eluição e tratamento de amostra. Os resultados foram avaliados efetuando a comparação entre a área dos padrões por injeção direta e a área dos padrões após extração.

3.2.5.1 Escolha do sorvente para SPE

Para escolha do sorvente a ser utilizado no método de extração e pré-concentração dos analitos foram testados dois tipos de cartuchos: Strata-X (Phenomenex, 200 mg,

poliestireno-divinilbenzeno) e Oasis-HLB (Waters, 200 mg, poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona). Neste trabalho optou-se por avaliar o desempenho dos cartuchos Strata-X e Oasis-HLB e MeOH como eluente, devido à prevalência destas características na maioria dos métodos apresentados na literatura (GRANADOS et al., 2005; BATT et al., 2006; CHICO et al., 2008).

Foram testados dois tipos de extração para cada cartucho, a Tabela 8 mostra como foi realizado o condicionamento dos cartuchos e o procedimento de extração.

TABELA 8 - Procedimento de extração utilizado para os adsorventes (adaptado de Granados et al., 2005)

Cartucho	Etapas					
	Condicionamento	Amostra		Solventes de limpeza	Tempo de Secagem	Eluição
		Volume	pH			
Oasis-HLB	5 ml MeOH 5 mL água 10 mL ac. oxálico pH 3,4	1 L	3,5	10 mL água c/ 1% MeOH	2 min.	3 mL MeOH
Strata-X	10 ml MeOH 10 mL água 10 mL ác. Oxálico pH 3,4	1L	3,5	10 mL água c/ 1% MeOH	2 min	3 mL MeOH

3.2.5.2 Otimização do método de tratamento das amostras

Nesta etapa do trabalho, utilizou-se para a extração e *clean-up* dos analitos o cartucho Oasis-HLB que havia apresentado melhor recuperação e precisão que o Strata-X.

Para desenvolvimento da metodologia de extração e pré-concentração testes de recuperação foram efetuados inicialmente em água de torneira do Departamento de Química da UFMS, que consiste em água subterrânea sem tratamento.

A metodologia testada para extração e pré-concentração das TCs mostrou-se adequada aos objetivos quando aplicada a água subterrânea. Esta foi então utilizada em outras matrizes como água superficial e esgoto sanitário tratado. Observou-se a necessidade de introduzir alguns procedimentos para viabilizar as análises dessas matrizes. Realizou-se então a filtração em fibra de vidro GF/C (47 mm de diâmetro, 1,2 µm diâmetro de poro) para remoção de material em suspensão antes da extração em fase sólida.

No decorrer dos estudos alguns outros testes foram realizados na tentativa de adequação da metodologia para a análise de esgoto sanitário tratado. Para condicionamento do cartucho testou-se o uso de acetonitrila em substituição ao metanol que vinha sendo utilizado. Testou-se também o aumento do volume de metanol para eluição de 3 mL para 5 mL e o uso de acetonitrila com solvente de eluição, adição de NaCl a amostra, redução do volume de amostra (volumes testados: 1000, 500, 250, 100 mL).

3.2.6 Validação do método SPE-HPLC/UV

3.2.6.1 Seletividade

Para avaliar a seletividade do método usando SPE-HPLC/UV, foram analisados brancos de laboratório, solução padrão mista contendo as quatro TCs nas concentrações de 0,05 mg L⁻¹ para OTC e TC e 0,12 mg L⁻¹ para CTC e DC e amostras de água subterrânea, água superficial e de esgoto sanitário tratado enriquecidas com as TCs nas mesmas concentrações. Para obter o branco de laboratório utilizou-se água ultrapura. Os analitos nestas amostras foram extraídos usando o método SPE otimizado e analisados conforme metodologia de análise anteriormente estabelecida.

3.2.6.2 Exatidão e precisão do método SPE-HPLC/UV

A exatidão foi avaliada por ensaios de recuperação realizados em três níveis de concentração em amostras de água superficial, subterrânea, esgoto e esgoto tratado. Os ensaios de recuperação foram realizados em triplicata. Os níveis de fortificação estão apresentados na Tabela 9 e a Figura 5 mostra todo o procedimento utilizado.

TABELA 9 - Níveis de fortificação - Estudo de recuperação do método

Tetraciclinas	Níveis (ng L ⁻¹)		
	Inferior	Médio	Superior
OTC	6,0	25,0	75,0
TC	6,0	25,0	75,0
CTC	15,0	60,0	240,0
DC	15,0	60,0	240,0

As amostras fortificadas foram submetidas ao *aging* (envelhecimento) durante 4 horas, a 4 °C, sob proteção da luz, a fim de promover a interação do padrão adicionado com os componentes das amostras.

Nas amostras de água subterrânea e esgoto tratado foi adicionada uma solução de EDTA na concentração de 0,02 mol L⁻¹, para minimizar o efeito da formação de complexo das TCs com metais que possam estar no meio.

A precisão foi avaliada em nível de repetitividade para os valores de recuperação obtidos e expressos em termos da estimativa do desvio padrão relativo.

Foram realizadas extrações em triplicata para todos os níveis de concentração, para amostras testemunha (matriz sem enriquecimento) e brancos do cartucho (todos os solventes e meios utilizados, sem a amostra).

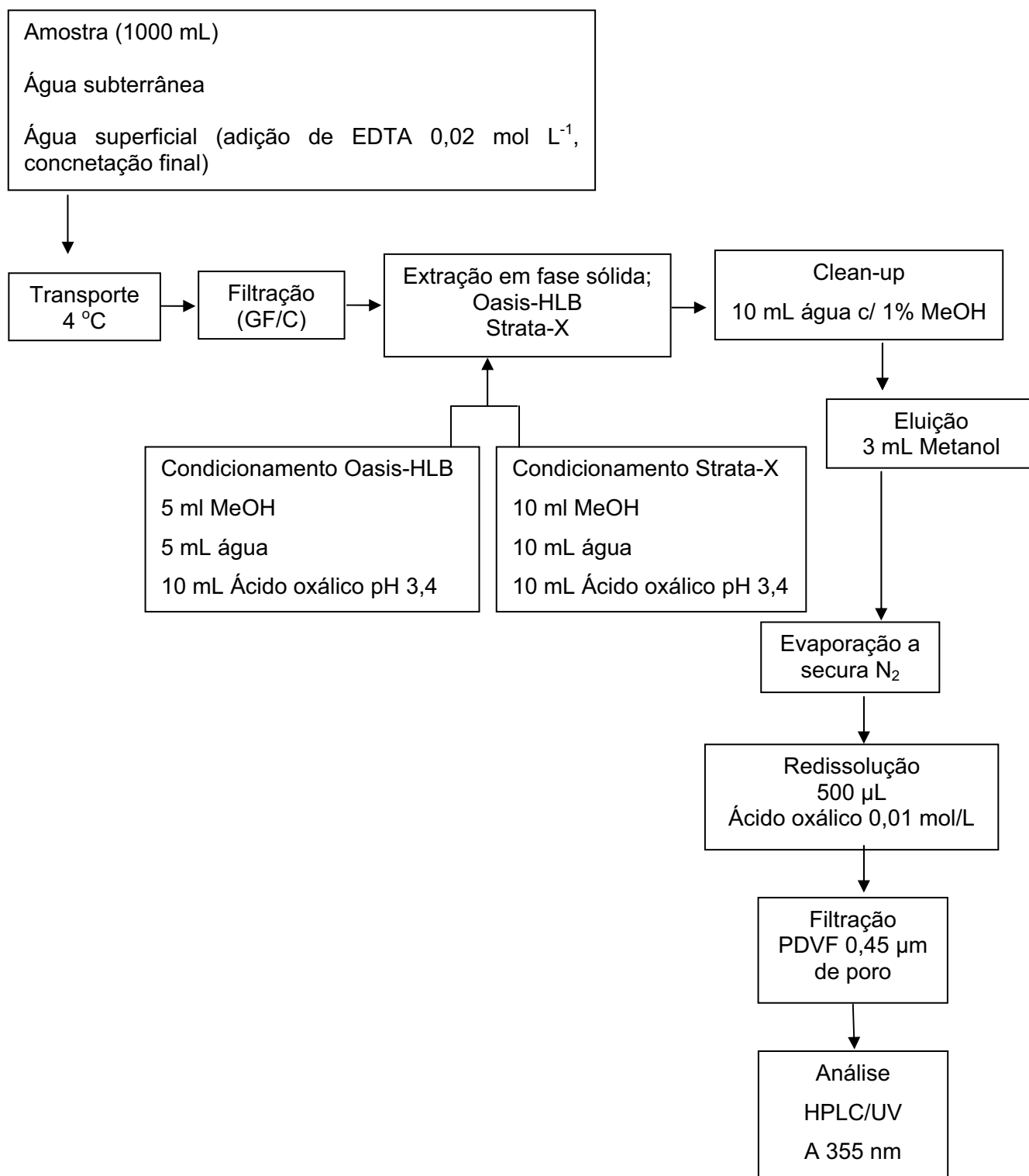


FIGURA 5 - Fluxograma descrevendo o procedimento utilizado para análise da Oxitetraciclina, Tetraciclina, Clorotetraciclina e Doxiciclina em água superficial, água subterrânea e esgoto sanitário tratado

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Escolha da fase móvel e do comprimento de onda para análise das TCs por HPLC/UV

A Figura 6 mostra os espectros na região ultravioleta das TCs. Observou-se absorção máxima (λ_{\max}) entre 350 e 370 nm para OTC, TC e CTC e dois máximos de absorção para DC, 270 e 350 nm. O comprimento de onda de 355 nm foi escolhido para análise das 4 TCs.

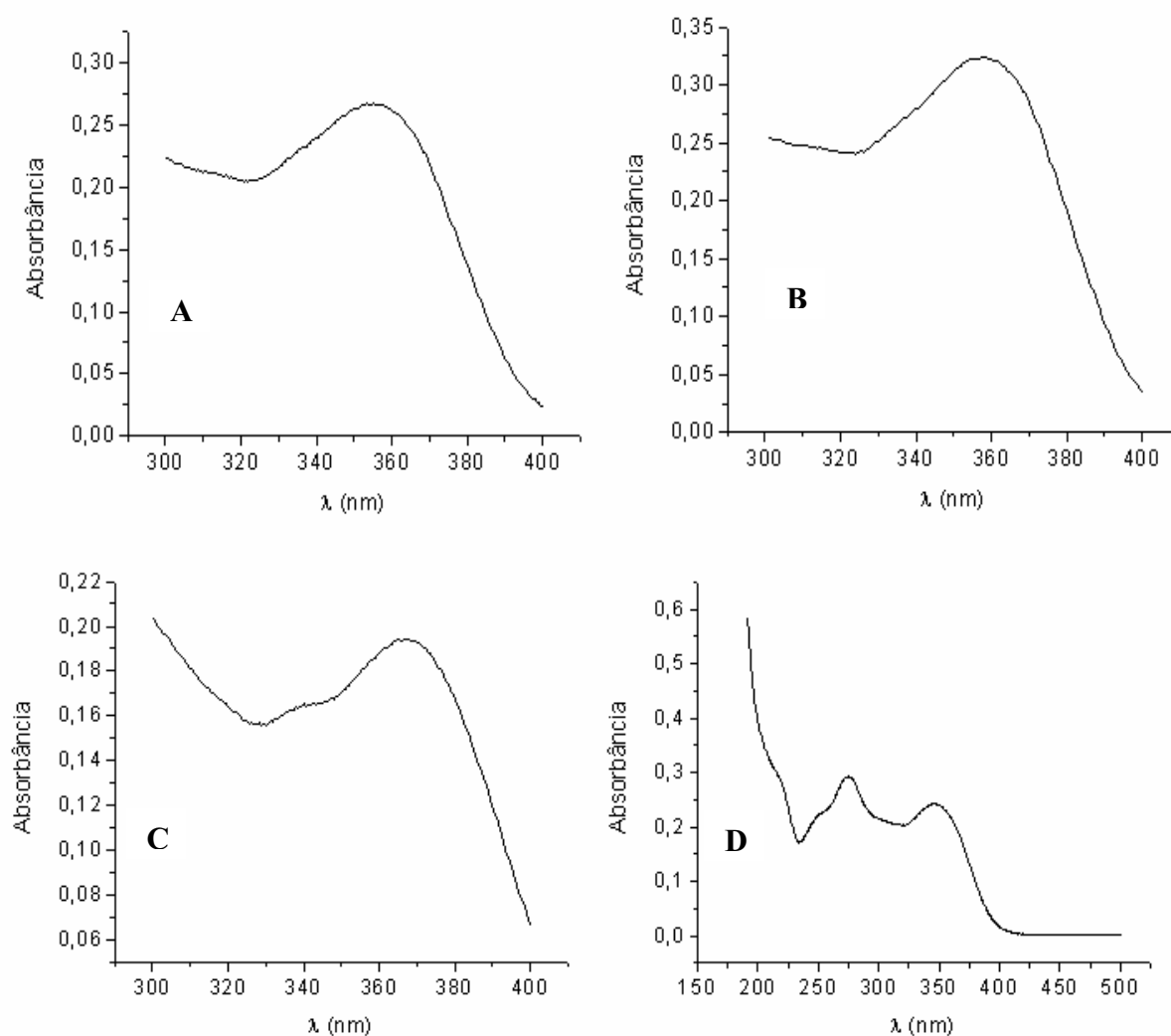


FIGURA 6 - Espectros de absorbância ultravioleta para: A – Oxitetraciclina; B – Tetraciclina; C – Clotetraciclina; D - Doxiciclina. Com varredura de 300 a 500 nm. Ácido oxálico 0,01 mol L⁻¹.

3.3.2 Avaliação do desempenho do sistema analítico HPLC/UV para as TCs

3.3.2.1 Avaliação da composição da fase móvel

A utilização da fase móvel neste trabalho baseou-se inicialmente em adaptações do método publicado por Ruela et al. (2005). Este método (método A, Tabela 7), que em linhas gerais corresponde a Ác. Oxálico 0,01 mol L⁻¹/ACN/MeOH/ (70:22:8, v/v/v), mostrou-se bastante eficiente para separação das TCs (Figura 7).

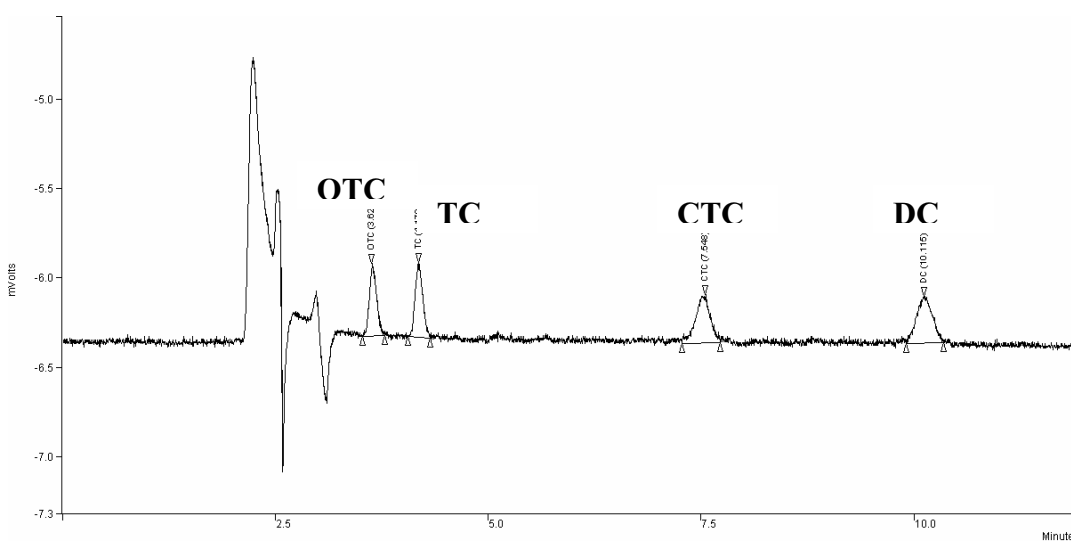


FIGURA 7 - Cromatograma (HPLC/UV) obtido na separação das TCs usando o método de análise A (isocrático)- ACN/MeOH/Ác. Oxálico 0,01 mol L⁻¹. Nas concentrações de 0,05 mg L⁻¹ para OTC e TC, 0,12 mg L⁻¹ para CTC e DC.

No entanto a utilização dessa fase móvel apresentou variações de ruído muito grande com intervalos de 39 a 75 mVolts e um CV de 14 a 16 %, que levaria a obtenção de LD e LQ elevados. As condições de análise do método B foram desenvolvidas com o intuito de diminuir a variação do ruído, apresentado no método A. O cromatograma deste método está mostrado na Figura 8.

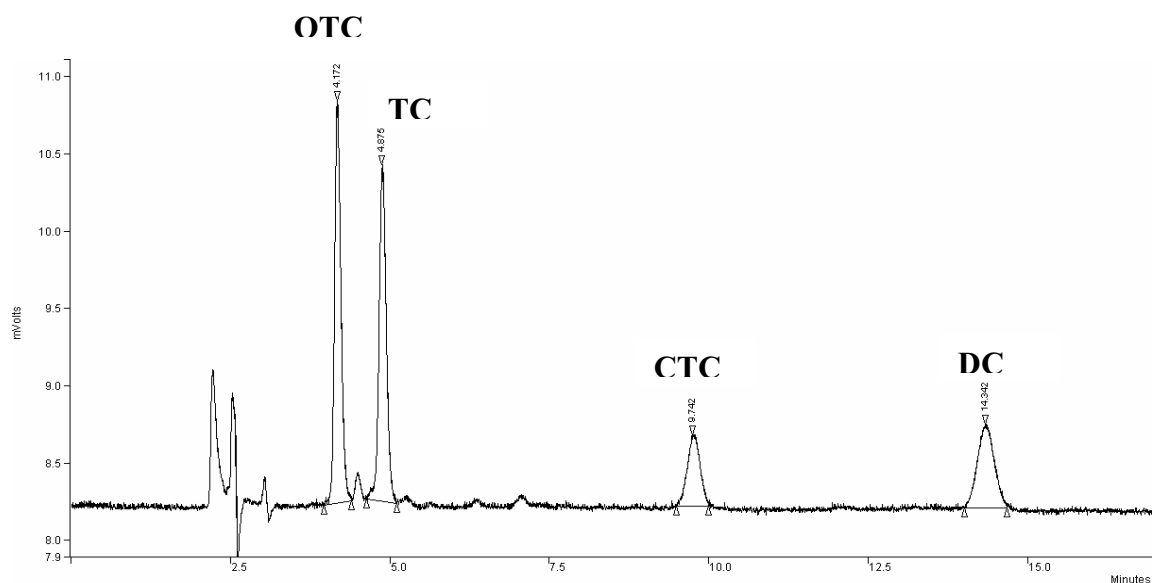


FIGURA 8 - Cromatograma (HPLC/UV) obtido na separação das TCs usando o método de análise B (gradiente) – (fase móvel A - ACN 1% de Ác. Fórmico; B – MeOH). Nas concentrações de, 0,05 mg L⁻¹ para OTC e TC, 0,12 mg L⁻¹ para CTC e DC.

A fase móvel do método A, foi modificada substituindo-se o ácido oxálico pela adição de 1% de ácido fórmico em ACN, para averiguar se este não seria o responsável por distorções da linha de base. O cromatograma obtido neste método também apresentou valores de variações de ruído semelhantes ao método A com CV na faixa de 16% só que com um intervalo de variação muito maior: de 40 a 194 mVolts. Com base nestes dados as condições cromatográficas do método A foram escolhidas para dar continuidade ao trabalho.

O método A foi utilizado até a primeira análise de recuperação de água superficial e esgoto tratado, nesta etapa é observada uma elevação da banda cromatográfica no início do cromatograma que se estende até aproximadamente 10 minutos (Figura 9).

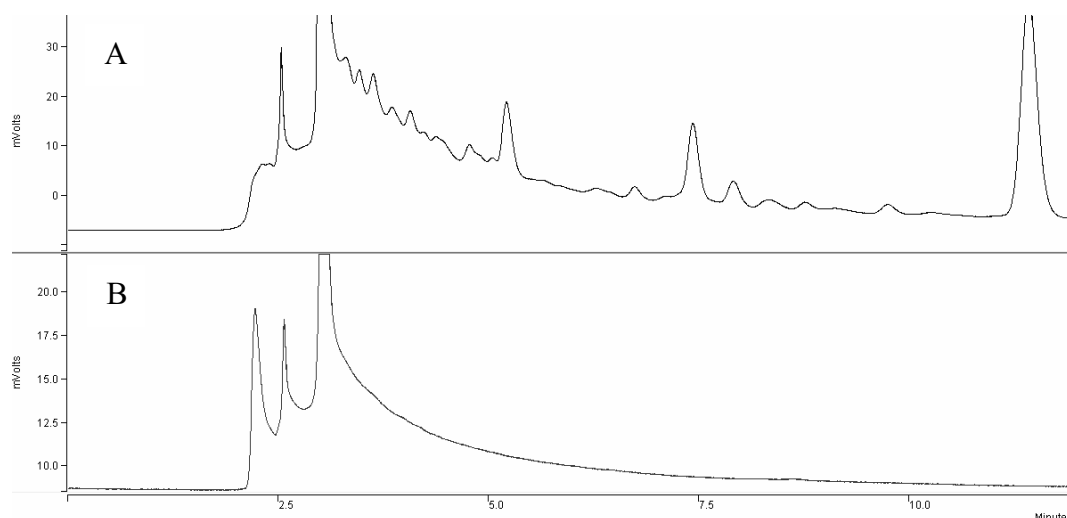


FIGURA 9 - A) - cromatograma da recuperação das TCs em esgoto tratado B) - cromatograma da recuperação das TCs em água superficial. Nas concentrações, $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ para OTC e TC, $0,12 \text{ mg L}^{-1}$ para CTC e DC.

A banda no início do cromatograma comprometeu a integração dos dois primeiros picos das TCs. Na tentativa de redução da banda cromatográfica, vários testes foram realizados, tais como:

- a substituição de metanol por acetonitrila no condicionamento do cartucho;
- aumento no volume de eluição do metanol de 3 para 5 mL;
- substituição de metanol por acetonitrila como solvente de eluição ;
- adição de NaCl a amostra, o aumento da força iônica, facilita a retenção dos analitos na coluna de SPE;
- redução do volume de amostra.

Não foram observadas alterações significativas nestes procedimentos. Desenvolveu-se então o método C, com o objetivo de aumentar o tempo de retenção das TCs tirando-as da região encoberta pela banda.

O método de análise C aumentou o tempo de retenção das TCs em relação ao método A como pode ser visto na Figura 10 e na Tabela 10.

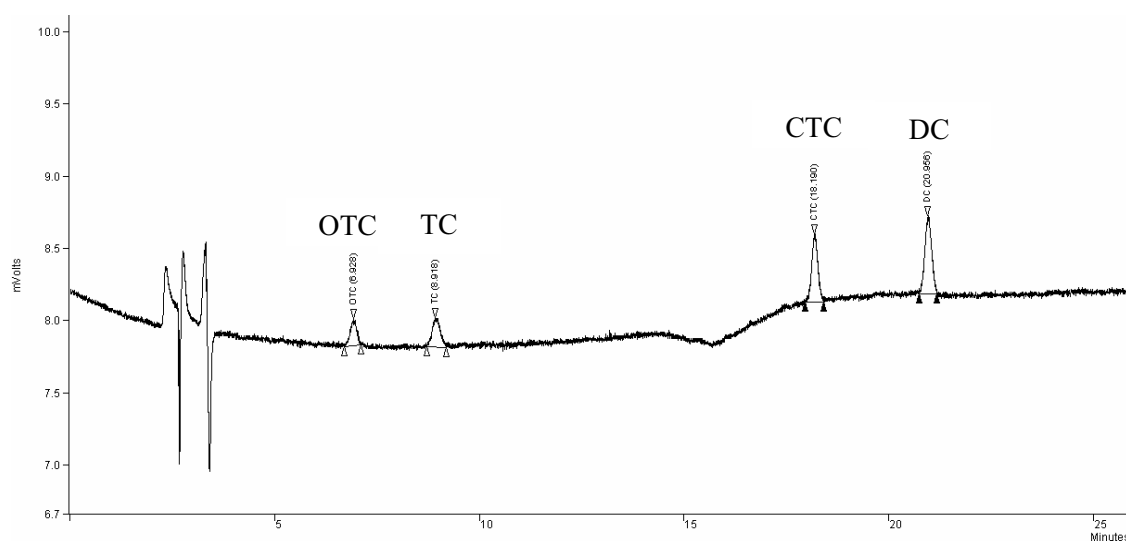


FIGURA 10 - Cromatograma (HPLC/UV) obtido na separação das TCs, no método de análise C (gradiente) – (fase móvel (A):ACN/MeOH (22/8, v/v) e (B): Ác. Oxálico 0,01 mol L⁻¹) Início 80% B - 20 % A até 12 min. ; 20% B - 80% A até 25 min., vazão 1 mL min⁻¹. Nas concentrações de 0,05 mg L⁻¹ para OTC e TC, 0,12 mg L⁻¹ para CTC e DC.

TABELA 10 – Tempo de retenção das TCs utilizando-se os métodos A e C (Tabela 7)

Tetraciclinas	Tempo de Retenção (min)	
	Modo A	Modo C
OTC	3,50	7,14
TC	4,07	9,20
CTC	7,19	18,23
DC	9,64	20,92

Por ter aumentado o tempo de retenção das TCs o método C foi escolhido como fase móvel para análise cromatográfica quando feita as recuperações de água superficial e efluente de estação de tratamento de esgoto.

A resolução (Rs) obtida mostrou-se satisfatória entre as TCs (entre OTC e TC foi de 2,3 e da CTC e DC de 5,9 para o método A ($R_s = \Delta t / w_{1/2 \text{ méd}}$)) e a separação/detecção dos analitos ocorreu em tempo inferior a 12 minutos (Figura 7), e a 25 minutos (Figura 10) para o método C.

3.3.2.2 Sistema de detecção HPLC/UV

As curvas analíticas foram construídas a cada conjunto de amostras, neste item são apresentadas alguns dos gráficos de linearidade e algumas das equações das curvas analíticas.

As curvas de linearidade baseadas no Teste de Huber (VALENTE, 2006) (Figuras 11,12,13 e 14) mostraram que todos os pontos do intervalo avaliado encontram-se dentro da linearidade estipulada.

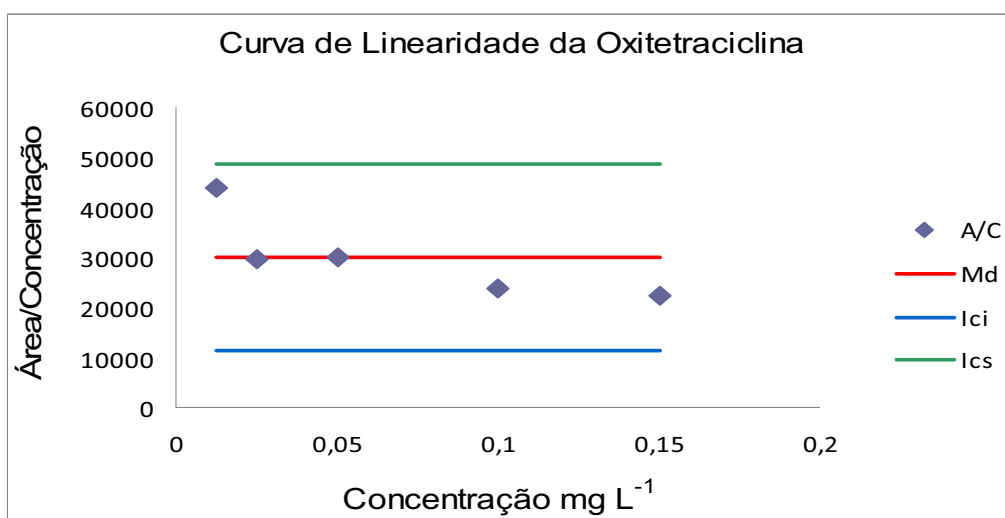


FIGURA 11 – Exemplo de curva de Linearidade para a Oxitetraciclina: A/C – área/concentração, Md – mediana das razões A/C, Ici – intervalo de confiança inferior, Ics – intervalo de confiança superior.

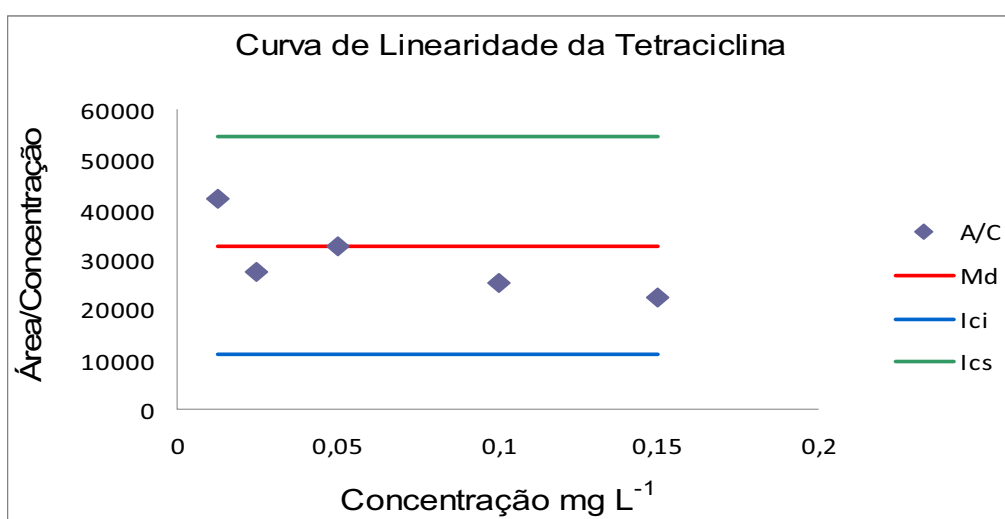


FIGURA 12 – Exemplo de curva de Linearidade para a Tetraciclina: A/C – área/concentração, Md – mediana das razões A/C, Ici – intervalo de confiança inferior, Ics – intervalo de confiança superior.

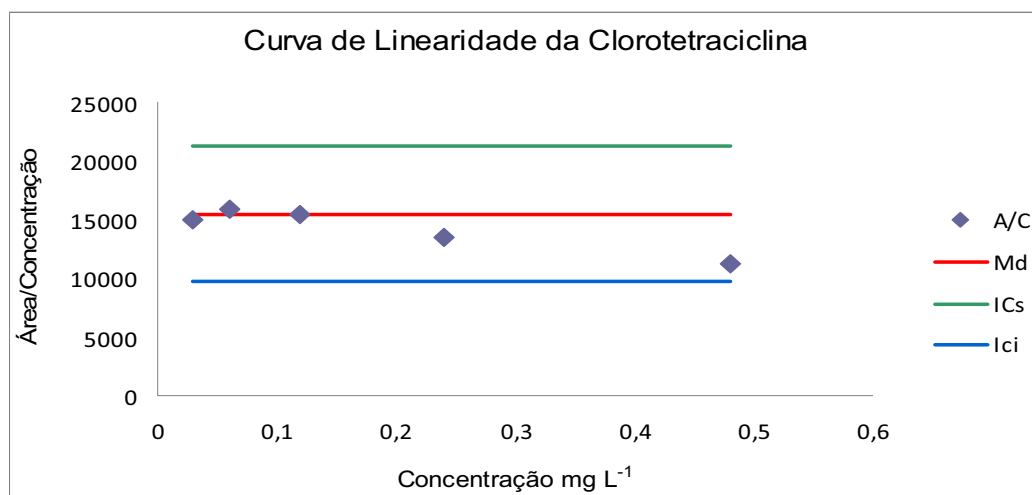


FIGURA 13 – Exemplo de curva de Linearidade para a Clorotetraciclina: A/C – área/concentração, Md – mediana das razões A/C, Ici – intervalo de confiança inferior, Ics – intervalo de confiança superior.

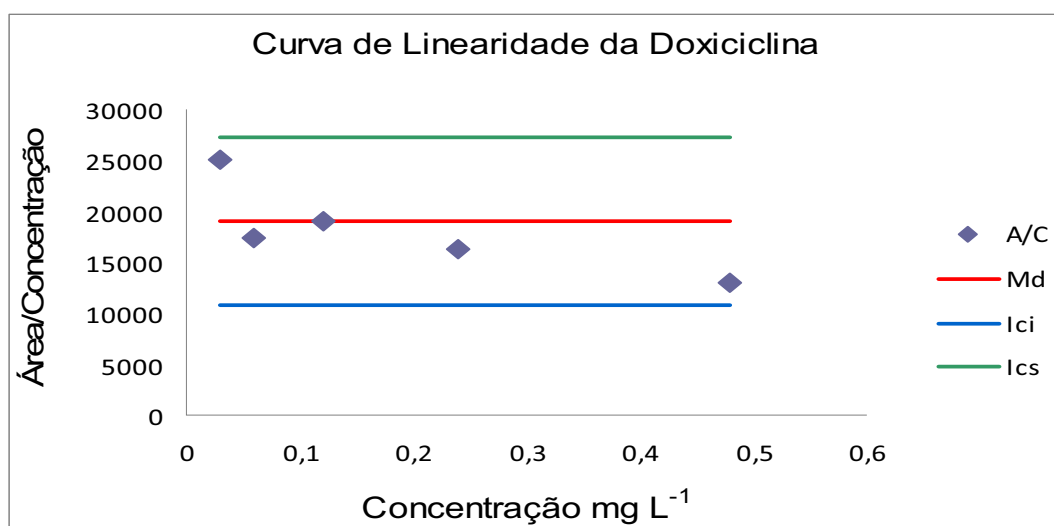


FIGURA 14 – Exemplo de curva de Linearidade para a Doxíciclina: A/C – área/concentração, Md – mediana das razões A/C, Ici – intervalo de confiança inferior, Ics – intervalo de confiança superior.

Como todos os pontos estavam dentro do intervalo de linearidade, construíram-se curvas analíticas sem exclusão de nenhum dos valores. As equações das curvas analíticas e os coeficientes de correlação obtidos são apresentados na Tabela 11, as curvas analíticas encontram-se no Anexo 1.

TABELA 11 – Exemplo de equações da curva analítica obtidas, intervalo de trabalho e coeficientes de correlação para as TCs no sistema HPLC/UV nas condições do método de eluição A, descrito no texto.

Hormônios	Intervalo de trabalho estudado (mg L ⁻¹)	Equação Y = A+B*X	Coefficiente de correlação
OTC	0,0125 – 0,15	Y = 292,9 + 20257,8X	0,997
TC	0,0125 – 0,15	Y = 93,9 + 25817,1X	0,995
CTC	0,030 – 0,48	Y = 327,9 + 10918,7X	0,994
DC	0,030 – 0,48	Y = 468,3 + 12284,0X	0,993

Volume de injeção = 20 µL

Quanto ao coeficiente angular, os valores obtidos foram altos, o que implica em alta sensibilidade, sendo que uma pequena variação na concentração dos analitos provoca uma grande variação no valor medido da área. Logo, é possível distinguir concentrações muito próximas entre si. A precisão mostrou-se bastante satisfatória, pois os coeficientes de variação obtidos para as repetições (n=3) de cada ponto da curva analítica variaram entre 1 e 10 % (Tabela 12). Estes valores estão bem abaixo do valor preconizado por Ribani et al. (2004) que é de até 20%

TABELA 12 – Concentrações e coeficientes de variação (CV) das TCs, obtido da triplicata, para os 5 pontos da curva analítica (exemplo), utilizando o método A de eluição (Tabela 7)

	Ponto 1		Ponto 2		Ponto 3		Ponto 4		Ponto 5	
	Conc. (m L ⁻¹)	CV (%)	Conc. (m L ⁻¹)	CV (%)	Conc. (m L ⁻¹)	CV (%)	Conc. (m L ⁻¹)	CV (%)	Conc. (m L ⁻¹)	CV (%)
OTC	0,0125	5	0,025	4	0,05	4	0,10	2	0,15	3
TC	0,0125	8	0,025	5	0,05	6	0,10	2	0,15	4
CTC	0,030	7	0,060	5	0,12	10	0,24	1	0,48	1
DC	0,030	7	0,060	4	0,12	8	0,24	7	0,48	2

Os limites de detecção e quantificação do sistema HPLC/UV foram determinados de duas formas: através da relação sinal:ruído e através do método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI, et al., 2004). Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 13.

TABELA 13 - Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) do sistema cromatográfico (HPLC/UV) para as TCs utilizando o método A, descrito no texto

Antibióticos	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)		LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	Parâmetros da curva	Sinal:Ruído	Parâmetros da curva	Sinal:Ruído
OTC	15	3	44	12,5
TC	16	3	53	12,5
CTC	68	9	207	30
DC	74	9	223	30

Considerando-se que a resposta cromatográfica é função de todas etapas por que passa o analito no sistema analítico (injetor, coluna e detector) e que o método IUPAC é mais adequado para métodos em que a resposta analítica é obtida diretamente, como métodos espectro e eletroanalíticos; considerando, ainda que os valores de LD e LQ calculados desta maneira foram incongruentes com o comportamento de linearidade da resposta, neste trabalho foram adotados os limites de detecção e quantificação calculados pelo método sinal:ruído. A aceitação desses valores pôde ser reforçada pelas curvas de linearidade (Figuras 11, 12, 13 e 14), estas concentrações estão dentro do intervalo da mediana (± 3) estabelecida, indicando desta forma uma repetibilidade para esses valores de concentração. Se fossem aceitos os valores do método IUPAC, o LQ seria obtido em concentrações maiores, o que seria uma irrealidade do sistema. A Figura 15 mostra o cromatograma obtido nas concentrações do LD do sistema HPLC/UV obtido pela relação sinal:ruído.

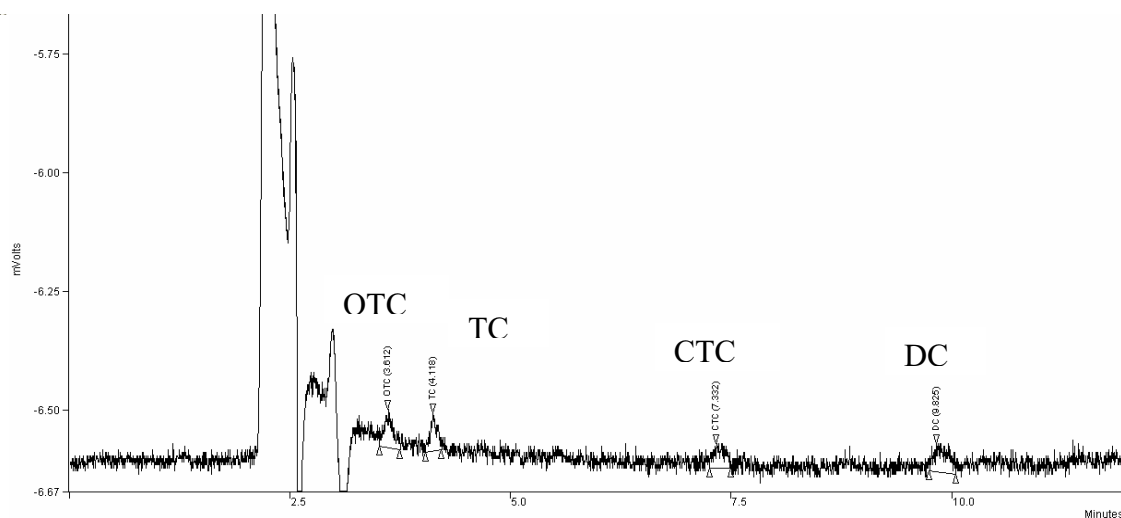


FIGURA 15 - Cromatograma (HPLC/UV) obtido na separação das TCs de uma solução padrão com o método de análise A (isocrático) – ACN/MeOH/Ác. oxálico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Nas concentrações de, $3 \mu\text{g L}^{-1}$ para OTC e TC, $9 \mu\text{g L}^{-1}$ para CTC e DC. Correspondentes aos LDs do sistema HPLC/UV.

Desta forma utilizou-se esses valores estudados como sendo os do sistema analítico, o que está de acordo com o recomendado para sistemas cromatográficos (RIBANI et al., 2004; ANDERSON et al., 2005).

3.5.3 Otimização da metodologia de extração das TCs usando SPE

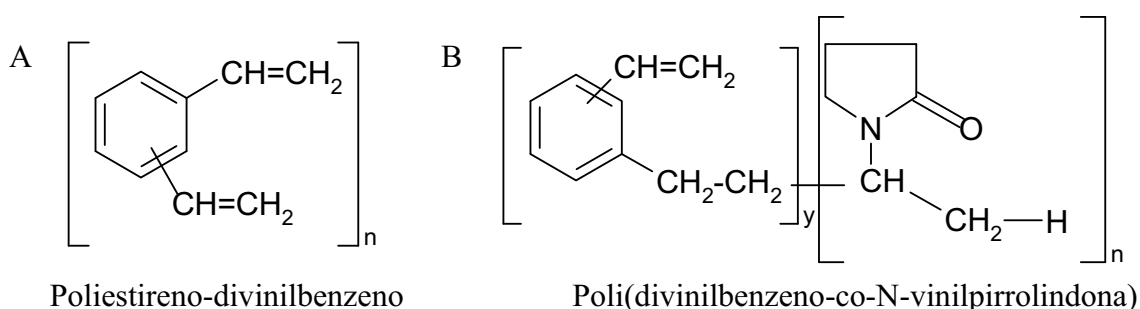
A validação do método foi efetuada pelo estudo de preparo da amostra por meio de extração em fase polimérica Strata-X e Oasis-HLB. Para otimizar a extração foram testadas condições disponíveis na literatura após fortificação de água subterrânea em pH 3,5.

Na Tabela 14 estão apresentados os valores de recuperação e precisão obtidos para as duas fases poliméricas. Nota-se que as recuperações para o Oasis-HLB são superiores às do Strata-X e que a precisão também é melhor, para todos os analitos. Isso pode ser explicado pela melhor retenção das TCs pelo Oasis-HLB, uma vez que a estrutura mais insaturada da fase estacionária, Figura 16, é mais semelhante aos analitos, possibilitando melhor recuperação.

TABELA 14 - Recuperação e precisão obtidas (n= 3) em água subterrânea

Tetraciclinas	Recuperação (%) \pm sd	
	Oasis HLB	Strata-X
OTC	84 \pm 2	65 \pm 5
TC	77 \pm 4	76 \pm 10
CTC	74 \pm 2	69 \pm 9
DC	82 \pm 2	59 \pm 13

[OTC]=[TC]= 75 ng L⁻¹ [CTC]=[DC]= 240 ng L⁻¹ sd = desvio padrão

**FIGURA 16** - Estrutura dos sorbentes dos cartuchos Strata-X (A) e Oasis-HLB (B).

Por este motivo o cartucho Oásis-HLB foi utilizado para realização das recuperações em água superficial e esgoto tratado.

A adição de EDTA ao meio foi testada para as 3 matrizes de estudo: água subterrânea, água superficial e esgoto tratado. Não se observou variações nos valores de recuperação em amostra de água subterrânea. Entretanto, em amostras de água superficial os valores de recuperação aumentaram significativamente (Tabela 15), isto mostrou que a adição de EDTA diminuiu a complexação das TCs com metais que poderiam estar presentes no meio (GRANADOS et al., 2005).

TABELA 15 - Efeito do EDTA na recuperação de TCs em água superficial, SPE com Oásis-HLB (n=3)

Tetraciclinas	Recuperação (%) \pm sd	
	Sem EDTA	Com EDTA 0,02 mol L ⁻¹
OTC	76 \pm 8	96 \pm 5
TC	80 \pm 7	90 \pm 10
CTC	75 \pm 10	82 \pm 7
DC	76 \pm 10	86 \pm 6

[OTC]=[TC]= 75 ng L⁻¹ [CTC]=[DC]= 240 ng L⁻¹ sd = desvio padrão

Para esgoto tratado não foi possível a obtenção de recuperações aceitáveis, dentro dos critérios já explicitados. Este comportamento foi observado com ou sem a adição de EDTA.

Outras alterações foram introduzidas, como a alteração do condicionamento do cartucho, substituindo metanol por acetonitrila; o aumento no volume do solvente de eluição de 3 para 5 mL; a troca do solvente de eluição de metanol por acetonitrila e a adição de NaCl à amostra. Mesmo com todas essas modificações o método mostrou-se não seletivo e não foi detectada a presença das TCs nas recuperações realizada (Figura 17). Os dados obtidos com a redução de volume da amostra de 1000 mL para 500, 250 e 100 mL, também não evidenciaram melhora nos valores de recuperação das TCs. Segundo Kamper (2008) a matéria orgânica é um fator que contribui para a diminuição da concentração das TCs, pois elas tendem a sofrer uma forte adsorção em material particulado suspensos na água, este pode ter sido um dos motivos para não ter obtido recuperações no esgoto tratado. A ETE da UFMS não possui represa de sedimentação, após o processo de aeração o esgoto recebe a adição de cloro e o efluente é despejado no rio próximo a estação, desta forma a matéria orgânica na forma de partícula não é eliminada, assim as TCs pode ter sido adsorvidas pela matéria orgânica não sendo recuperadas no processo de extração.

O esgoto foi submetido a um processo de filtração com filtro de fibra de vidro de 0,45 μm de poro para retenção de partículas em suspensão, é provável que as TCs tenham sido eliminadas neste processo adsorvidas às partículas.

Como observado na Figura 17 (A), nos tempos de retenção próximo da CTC e da DC aparecem dois picos que poderiam ser considerados como sendo das TCs, essa possibilidade foi descartada uma vez que na adição do padrão à amostra (cromatograma B) não houve alteração nas áreas desses picos, o que indica que esses não são de CTC e DC.

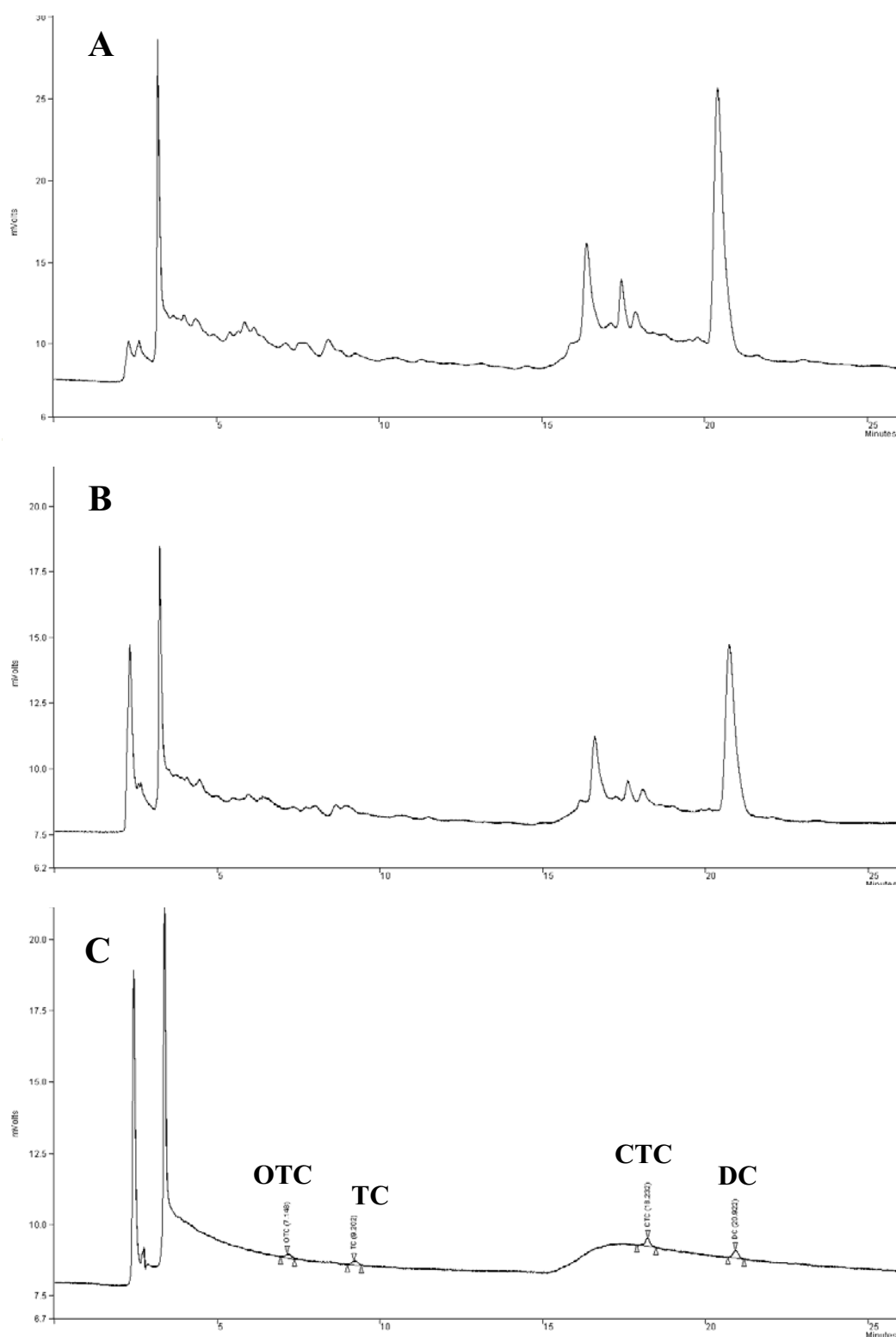


FIGURA 17 - (A) cromatograma HPLC/UV da amostra de esgoto tratado (500 mL) com adição de EDTA $0,02 \text{ mol L}^{-1}$; (B) cromatograma HPLC/UV de amostra de esgoto tratado com adição de padrões das TCs; (C) cromatograma HPLC/UV dos padrões em concentração de $150 \mu\text{g L}^{-1}$ para OTC e TC, $480 \mu\text{g L}^{-1}$ para CTC e DC.

3.3.4 Validação do método SPE-HPLC/UV para quantificação

3.3.4.1 Seletividade

A seletividade do método usando SPE-HPLC/UV foi avaliada através da comparação de uma solução padrão mista contendo as quatro TCs nas concentrações de 0,05 mg L⁻¹ para OTC e TC e 0,12 mg L⁻¹ para CTC e DC, branco de laboratório e amostra testemunha das matrizes água de torneira e água superficial.

De acordo com a Figura 18 pode-se afirmar que o método é seletivo para a análise de águas subterrâneas e superficiais, pois não existe nenhum pico cromatográfico com tempos de retenção iguais ou próximos aos das TCs. No entanto não apresentou seletividade para análise de esgoto tratado (Figura 17).

Observa-se também que não foi detectada a presença dos analitos na amostra testemunha, Figura 18 (C), demonstrando que a amostra está isenta dos compostos de interesse ou estes estão em concentrações inferiores aos limites de detecção, portanto a água coletada pode ser usada como matriz isenta de contaminação por TCs. Sendo assim, estas amostras de água puderam ser usadas para efetuar os ensaios de recuperação no decorrer do processo de validação.

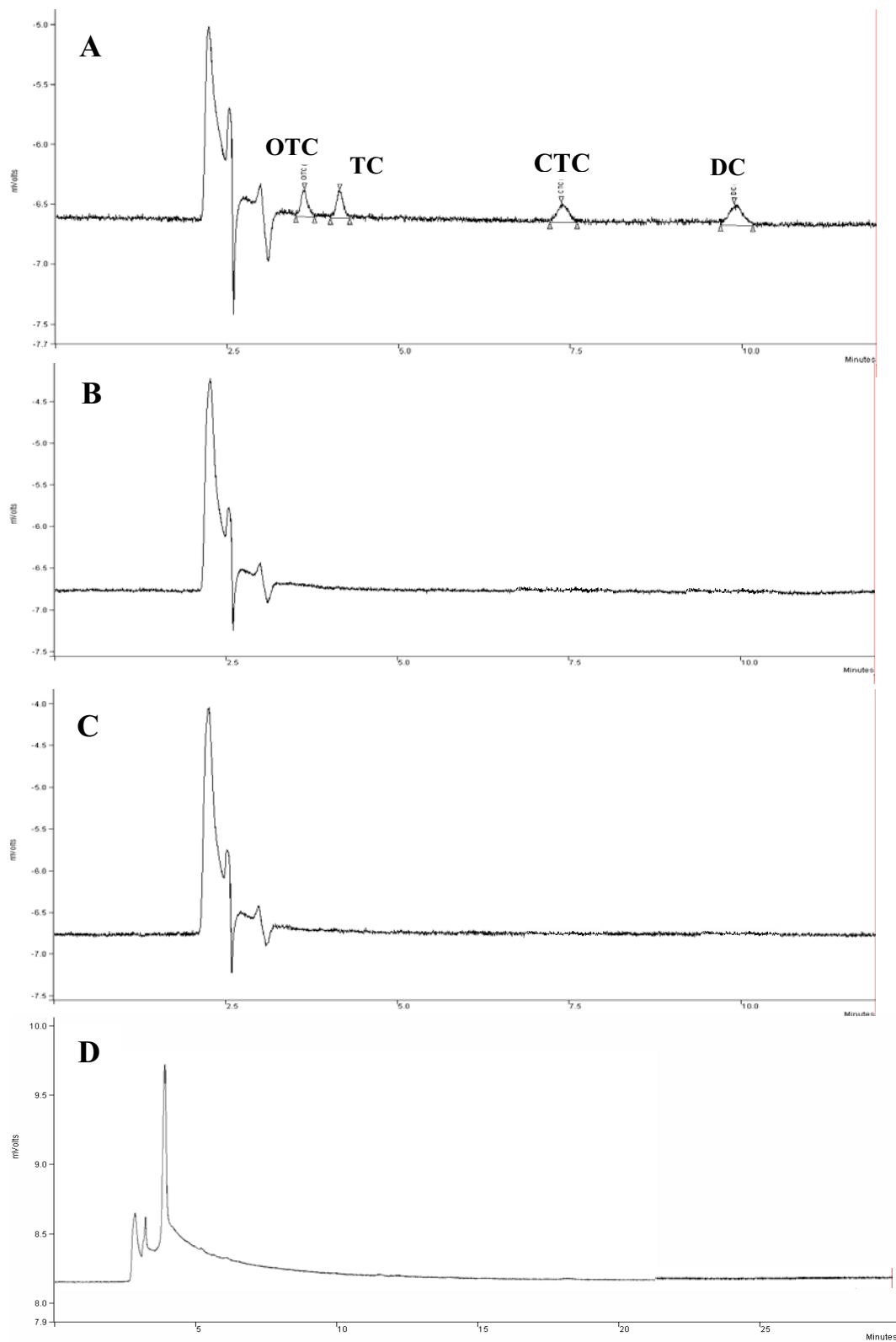


FIGURA 18 - Comparação entre o cromatograma da solução padrão misto contendo as TCs nas concentrações de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ para OTC e TC e $120 \mu\text{g L}^{-1}$ para CTC e DC (A), branco de laboratório (B), testemunha de água de torneira (C) e testemunha de água superficial (D).

3.3.4.2 Exatidão e precisão do método

O método otimizado foi submetido à avaliação da recuperação, em três níveis de concentração para água subterrânea e água superficial. Para cada nível foram efetuadas três repetições e os resultados são mostrados na Tabela 16.

Os valores do intervalo de recuperação aceitos para esse trabalho foram os preconizados por Their & Zeumer (1987) de 70-120%, as recuperações obtidas estiveram dentro desse intervalo. Os resultados são suficientes para considerar o método com exatidão adequado a finalidade que se propõe tanto para água superficial quanto subterrânea.

Para a avaliação da precisão, considera-se como critério, a obtenção de coeficientes de variação (CV) nos ensaios de recuperação adequados se inferiores ou iguais a 20 % (RIBANI et al., 2004). Neste caso, nenhum dos valores esteve acima do percentual estabelecido. Para os ensaios efetuados, com os valores de CV obtidos o método foi considerado como tendo uma excelente precisão.

Os valores de recuperação nas concentrações utilizadas para as amostras enriquecidas além de estarem dentro dos parâmetros estabelecidos para uma análise de resíduo, também são compatíveis com os valores encontrados na literatura (Tabela 17).

Granados et al. (2005) e Chico et al. (2008) realizaram testes de recuperação utilizando água de diferentes rios. Em ambos trabalhos, os pesquisadores observaram variações nos valores de recuperação para as amostras, que podem ser atribuídas às diferenças de matrizes, ou seja, o efeito da matriz interfere na recuperação. Os métodos desenvolvidos por esses autores utilizavam condições de extração semelhantes com o método aqui proposto, com o mesmo tipo de cartucho, pH da amostra e adição de EDTA em água superficial.

Em relação ao trabalho de Granados et al. (2005), a principal diferença com o método otimizado nesta tese consiste na troca de ácido fórmico por ácido oxálico no condicionamento do cartucho, eluição apenas com MeOH sem a adição de ácido trifluoacético (TFA), e a redissolução do resíduo, após secagem do extrato (Figura 5, pg 45), com solução de ácido oxálico e não com água. BATT & AGA (2005), obtiveram recuperações acima de 100% para TC e CTC, em água subterrânea.

TABELA 16 - Recuperações percentuais e coeficientes de variação (CV) das TCs pelo método proposto em amostra de água enriquecida com os analitos (n=3)

	Recuperações (%)							
	Nível Baixo		Nível Médio		Nível Alto		Média (%)	CV (%)
	Média (%)	CV	Média (%)	CV	Média (%)	CV		
	OTC = TC =6,5 ng L ⁻¹	OTC = TC =25 ng L ⁻¹	OTC = TC =75 ng L ⁻¹					
	CTC = DC =15 ng L ⁻¹	CTC = DC =60 ng L ⁻¹	CTC = DC =0,24 µg L ⁻¹					
	Média (%)	CV	Média (%)	CV	Média (%)	CV	Média (%)	CV (%)
Água subterrânea								
OTC	93	9	78	2	76	2	76	2
TC	90	3	86	2	86	4	86	4
CTC	92	4	97	8	76	4	76	4
DC	85	8	80	8	77	4	77	4
Água superficial								
OTC	93	4	95	5	96	2	96	2
TC	87	10	88	6	90	4	90	4
CTC	77	8	86	6	82	2	82	2
DC	80	7	87	7	86	2	86	2

TABELA 17 – Comparação dos resultados obtidos para a exatidão do método proposto em relação a alguns trabalhos da literatura

Referência	Matriz	Analito/concentração	Recuperação (%)	Local da amostra
GRANADOS et al., 2005	Água superficial Volume 250 mL	OTC (4 µg L ⁻¹)	87 ± 5	Rio Cinca (Bacia do mar Mediterrâneo)
		TC(4 µg L ⁻¹)	85 ± 2	
		CTC (8 µg L ⁻¹)	84 ± 9	
		DC(8µg L ⁻¹)	84 ± 7	
GRANADOS et al., 2005	Água superficial Volume 100 mL	OTC (4 µg L ⁻¹)	98 ± 2	Rio Nogueira (Bacia do mar Mediterrâneo)
		TC(4 µg L ⁻¹)	95 ± 2	
		CTC (8 µg L ⁻¹)	96 ± 3	
		DC(8µg L ⁻¹)	95 ± 3	
GRANADOS et al., 2005	Água superficial Volume 250 mL	OTC (4 µg L ⁻¹)	90 ± 7	Rio Ter (Bacia do mar Mediterrâneo)
		TC(4 µg L ⁻¹)	91 ± 11	
		CTC (8 µg L ⁻¹)	92 ± 4	
		DC(8µg L ⁻¹)	86 ± 7	
BATT & AGA, 2005	Água superficial	OTC (2,5 µg L ⁻¹)	99 ± 1	(Nova Iorque)
		TC (2,5 µg L ⁻¹)	103 ± 5	
		CTC (2,5 µg L ⁻¹)	124 ± 8	
BATT & AGA, 2005	Água subterrânea	OTC (2,5 µg L ⁻¹)	109 ± 2	(Nova Iorque)
		TC (2,5 µg L ⁻¹)	102 ± 1	
		CTC (2,5 µg L ⁻¹)	114 ± 3	
CHICO et al., 2008	Água superficial Volume 250 mL	OTC (40 µg L ⁻¹)	83 ± 3	Rio Ter (Bacia do mar mediterrâneo)
		TC(40 µg L ⁻¹)	92 ± 2	
		CTC (80 µg L ⁻¹)	98 ± 4	
		DC(80 µg L ⁻¹)	85 ± 2	
CHICO et al., 2008	Água superficial Volume 250 mL	OTC (125 µg L ⁻¹)	96 ± 2	Rio Nogueira (Bacia do mar mediterrâneo)
		TC(125 µg L ⁻¹)	96 ± 4	
		CTC (250 µg L ⁻¹)	94 ± 7	
		DC(250 µg L ⁻¹)	94 ± 3	
CHICO et al., 2008	Água superficial Volume 250 mL	OTC (80 µg L ⁻¹)	94 ± 4	Rio Cinca (Bacia do mar mediterrâneo)
		TC(80 µg L ⁻¹)	101 ± 2	
		CTC (160 µg L ⁻¹)	98 ± 5	
		DC(160 µg L ⁻¹)	90 ± 8	
Neste trabalho	Água Subterrânea Volume 1000 mL	OTC (6,5 ng L⁻¹)	93 ± 9	Água subterrânea (Campo Grande-MS)
		TC(6,5 ng L⁻¹)	90 ± 3	
		CTC (15 ng L⁻¹)	92 ± 4	
		DC(15 ng L⁻¹)	85 ± 8	
Neste trabalho	Água superficial Volume 1000 mL	OTC (6,5 ng L⁻¹)	93 ± 4	Rio Lageado (Campo Grande-MS)
		TC(6,5 ng L⁻¹)	87 ± 10	
		CTC (15 ng L⁻¹)	77 ± 8	
		DC(15 ng L⁻¹)	80 ± 7	

Os limites de quantificação do método foram estabelecidos como sendo o nível de concentração mais baixo da amostra enriquecida que tenha apresentado recuperação entre 70-120% e CV < 20%. Os limites obtidos para este método encontram-se na Tabela 18 onde são também apresentados os limites de quantificação reportados em alguns trabalhos.

TABELA 18 – Comparação dos limites de quantificação do método proposto com os de alguns artigos da literatura. Salvo indicação em contrário, os limites de quantificação do método aqui apresentados foram as menores concentrações das amostras enriquecidas, para as quais a recuperação esteve entre 70-120% com CV < 20%, de acordo com os dados reportados pelos autores.

Referência	Analito	LD		LQ		Técnica de análise/matriz / Volume
		Técnica	Método	Técnica	Método	
$\mu\text{g L}^{-1}$						
SANDERSON et al., 2005	OTC		1,4			HPLC-UV Água superficial (rio) 300 mL (LQ) 100 mL (LD)
	TC		2,4		5	
	CTC		3,2			
	DC		2,9			
BATT e AGA, 2005 ^(a)	OTC		0,060		0,20	LC/MS-MS Água superficial (rio) 500 mL
	TC		0,043		0,15	
	CTC		0,059		0,20	
GRANADOS et al., 2005	OTC	0,6	0,040		0,2	HPLC-Flu Água superficial (rio e mar) 250 mL
	TC	0,3	0,030		0,2	
	CTC	1,1	0,125		0,4	
	DC	1,2	0,150		0,4	
CHICO et al., 2008 ^(b)	OTC			3	15 ng L ⁻¹	HPLC-Flu Água superficial (rio) 250 mL
	TC			3	15 ng L ⁻¹	
	CTC			15	30 ng L ⁻¹	
	DC			10	30 ng L ⁻¹	
Este trabalho	OTC	3	1,5 ng L ⁻¹	12,5	6,5 ng L ⁻¹	HPLC-UV/VIS Água subterrânea e Água superficial (rio) 1000 mL
	TC	3	1,5 ng L ⁻¹	12,5	6,5 ng L ⁻¹	
	CTC	9	4,5 ng L ⁻¹	30	15 ng L ⁻¹	
	DC	9	4,5 ng L ⁻¹	30	15 ng L ⁻¹	

(a) LD e LQ do método, reportados pelos autores, foram obtidos pelo enriquecimento de água “NANOpure”. Considerando-se os critérios utilizados nesta tese o limite de quantificação do método seria 0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$

(b) LQ reportados pelos autores referem-se a 3 vezes a relação sinal ruído do branco. Considerando-se os critérios utilizados nesta tese os limites de quantificação do método seriam 40 e 80 $\mu\text{g L}^{-1}$, para OTC /TC e CTC/DC, respectivamente.

O método desenvolvido apresentou valores inferiores de LQ para as quatro TCs, quando em comparação com os demais métodos reunidos na Tabela 18. Destes métodos. O sistema de detecção é a principal diferença entre os métodos desenvolvidos, sendo que os

pesquisadores BATT & AGA (2005) utilizaram o sistema LC/MS-MS, que é uma técnica mais cara, o outro método foi desenvolvido utilizando HPLC/Flu (GRANADOS et al., 2005) e neste trabalho utilizando HPLC/UV. O sistema HPLC/UV também foi utilizado por SANDERSON et al., (2005) sendo que os valores obtidos foram muito superiores aos determinados neste trabalho. Cabe salientar, ainda, que neste trabalho empregou-se 1 litro de amostra para análise e volume final do extrato de 500 μL , resultando em uma pré-concentração de 2000 vezes, sendo o volume injetado de 20 μL . Os demais trabalhos da Tabela 18 utilizam de 100 a 250 mL de amostra (Tabela 17), volume final do extrato de 1 mL em MeOH e injeção de 20 μL (SANDERSON et al., 2005). Desta maneira, no presente trabalho, a desvantagem da técnica HPLC/UV em relação a LC/MS-MS e HPLC/Flu (usando derivação com Mg^{2+}) quanto a detectabilidade foi compensada pelo maior fator de pré-concentração. Outro diferencial importante do método apresentado nesta tese é a seletividade. A Figura 19 (A) mostra os cromatogramas da extração em água superficial no LQ so método, um cromatograma da extração sem fortificação (B) e um cromatograma do padrão (C) na mesma concentração da fortificação.

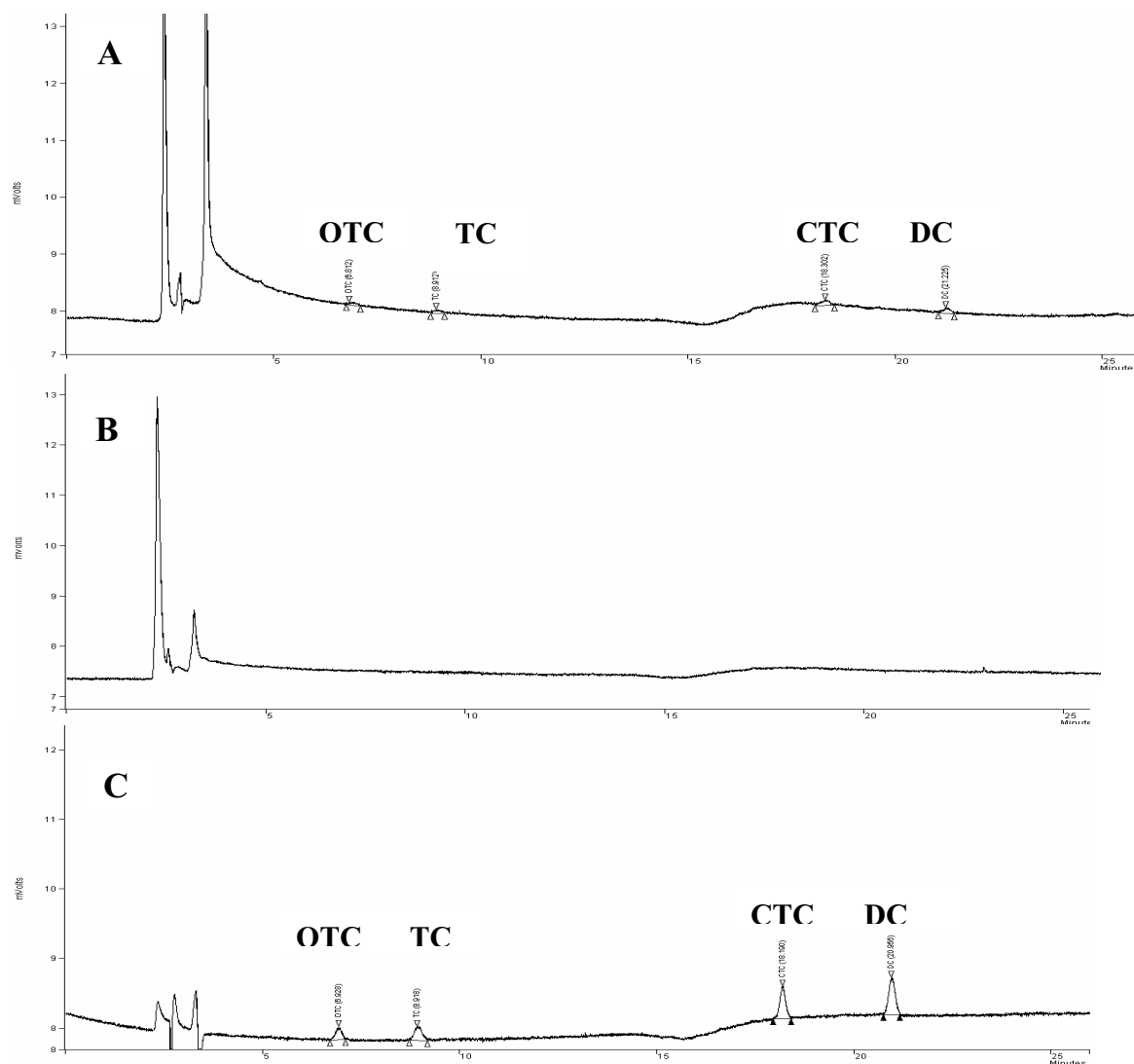


FIGURA 19 – Cromatogramas HPLC/UV, obtidos nas condições descritas no texto. (A) Amostra de água superficial(rio) fortificada com os padrões das TC nos LD do método (Tabela 18); (B) Amostra de água superficial (rio) sem fortificação; (C) Solução padrão das TC no limite de quantificação do sistema analítico (Tabela 18)

Na literatura são encontrados valores tanto para LD quanto para LQ muitas vezes sem fazer explicitar se referem-se ao método ou ao sistema analítico apenas. Também, muitas vezes não são explicitados os critérios para estabelecimento destes limites. Desta maneira, a comparação de limites de detecção e/ou quantificação é bastante dificultada. Para exemplificar, Sanderson et al. (2005) calcularam o LD a partir da variação de $t(t(n - 1, 1 - \alpha))$ de até 99% com 7 graus de liberdade do método *Student* a partir da recuperação em água superficial; Chico et al. (2008) e Granados et al. (2005) utilizaram 3 vezes a relação sinal:ruído do branco; Batt & Aga, (2005) calcularam tanto o LD quanto o LQ que foram obtidos pela extrapolação do eixo “y” da curva analítica, sendo 3 vezes esse valor para o LD e 10 vezes para o LQ.

Na determinação do limite de detecção, utilizando-se do método da relação sinal ruído (RIBANI et al., 2004), pôde-se observar que é possível a análise qualitativa da TCs desde que a concentração no extrato final esteja acima de $3 \mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 13) para o OTC e TC (correspondendo a $1,5 \text{ ng L}^{-1}$ na amostra) e de $9 \mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 13) para CTC e DC (correspondendo a $4,5 \text{ ng L}^{-1}$ na amostra). Sendo assim, consideraram-se $1,5 \text{ ng L}^{-1}$ como sendo o limite de detecção para o OTC e TC e de $4,5 \text{ ng L}^{-1}$ para a CTC e DC.

Não existe uma estimativa das concentrações limites a partir das quais as TCs podem ter algum tipo de efeito sobre a biota aquática, sabe-se que na presença crônica de baixas concentrações de antibióticos diversas bactérias tornam-se resistentes a eles, além do poder alergênicos em seres humanos que também podem resultar, por isso o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de detectar baixas concentrações das TCs em matrizes ambientais é de extrema importância (HOLTEN-LÜTZØFT et al., 1999; WOLLENBERGER et al., 2000).

3.6 CONCLUSÕES

O método validado apresentou exatidão (recuperação > 77%) e precisão (CV < 10%) comparáveis aos descritos na literatura para os analitos estudados em água superficial e subterrânea. Para esgoto tratado não foi possível a validação do método. Os limites de

quantificação do método desenvolvido foram menores do que os apresentados pelos métodos encontrados na literatura. Os valores de LD e LQ do método foram 10 a 20 vezes mais baixos quando comparado com métodos que utilizam a análise por LC/MS/MS, um sistema analítico muito mais caro do que o HPLC/UV.

CAPITULO 4 – ESTRÓGENOS

Na consecução do objetivo geral desta trabalho, outro objetivo específico precisou ser cumprido, ou seja, a otimização e validação de método para análise dos estrógenos de interesse (17β estradiol, estrona e 17α etinilestradiol) em água superficial (rio), subterrânea e esgoto doméstico. As atividades desenvolvidas, os dados obtidos e sua discussão estão apresentados neste capítulo.

4.1 REVISÃO DA LITERATURA

4.1.1. Alteradores Endócrinos

Nos últimos anos tem aumentado o interesse científico por um grupo de substâncias químicas presentes no ambiente, e que podem interferir no sistema endócrino de humanos e outros animais, afetando sua a saúde, o crescimento e a reprodução. Essas substâncias são conhecidas como Alteradores Endócrinos (AE) (BILA E DEZOTTI, 2007).

Os AE (também conhecidos como perturbadores endócrinos, interferentes endócrinos, desreguladores endócrinos, disruptores endócrinos e interferentes hormonais) não são toxicantes* clássicos. Interferem no sistema hormonal, comprometendo a comunicação e alterando os mensageiros químicos presentes nos organismos. Como resultado, estamos sujeitos aos seus efeitos danosos sobre a saúde o que inclui anormalidades sexuais em crianças e adultos, homens e mulheres (SANTAMARTA, 2001; ALVES et al., 2007; BILA E DEZOTTI, 2007). Os AE têm sido associados com efeitos degenerativos como: a redução da fecundidade, mudança em razão do sexo (hermafroditismo), ocorrência da degeneração em animais e embriões humanos, bem como aumento de câncer em humanos.

Alves et al. (2007) definiu os AE como: “*sustâncias químicas exógenas, naturais ou sintéticas, com o potencial de causar efeitos adversos na saúde de um organismo ou sua descendência, como resultado de distúrbios na função hormonal*”.

* termo toxicológico utilizado para toda substância, endógena ou exógena, que possa causar danos a um organismo vivo

A maioria dessas substâncias são liberadas diretamente nas águas superficiais ou indiretamente como constituintes de efluentes de estações de tratamento de esgoto municipal ou industrial (PAWLOWSKI et al., 2004).

São muitas as substâncias que podem ser classificadas como AE (ALVES et al., 2007; BJÖRKBLOM et al., 2007). Dentre elas, estão incluídas substâncias naturais e sintéticas, usadas ou produzidas para um grande número de aplicações e que podem ser agrupadas em duas classes

- Substâncias sintéticas – como as utilizadas na agricultura e seus subprodutos, como pesticidas, herbicidas, fungicidas e moluscicidas; utilizadas nas indústrias e seus subprodutos, como dioxinas, bifenilas policloradas (PCB), alquilfenóis e seus subprodutos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), ftalatos, bisfenol A, metais pesados, entre outros; compostos farmacêuticos, como os estrógenos sintéticos dietilestilbestrol (DES) e 17 α -etinilestradiol;

- Substâncias naturais - fitoestrogênios, tais como, genisteína e metaresinol e estrógenos naturais 17 β -estradiol, estrona e estriol (BJÖRKBLOM et al., 2007; MARKMAN et al., 2007).

Um desses AE sintéticos, o bisfenol-A é extensamente usado na produção de resinas e de plásticos, podendo inclusive, atingir os seres humanos por serem utilizados em muitas embalagens de alimentos. Da mesma forma, os ftalatos, utilizados como plastificantes, também são encontrados em muitos produtos comerciais (MARKMAN et al., 2007).

Resíduos de vários pesticidas vêm sendo encontrados em alimentos, água potável e corpos hídricos (GABET et al., 2007). Os pesticidas organoclorados foram largamente utilizados no mundo por vários anos, sendo o maior grupo de substâncias classificadas como AE.

Pesquisas demonstram que os estrógenos 17 β -estradiol, estrona e estriol são os maiores responsáveis pela atividade estrogênica em ETE, sendo que o 17 β -estradiol possui um efeito biológico maior que a estrona e o estriol. Estrógenos naturais também são encontrados em águas naturais, solo e lodo de estações de tratamento de esgoto municipal em várias partes do mundo (BELFROID et al., 1999; TERNES et al., 1999; ROUTLEDGE et al., 2002; RODRIGUEZ-MOZAZ, 2004; SERVOS et al., 2005; GABET et al., 2007;

CHESHENKO, 2008). Outras substâncias que possuem características de AE estão listadas na Tabela 19.

TABELA 19 - Algumas substâncias químicas classificadas como AE (BILA & DEZOTTI, 2007)

Ftalatos		Pesticida	
dimetil ftalato (DMP)		<i>Inseticidas:</i>	<i>Fungicidas:</i>
dietil ftalato (DEP)		DDT (2,2 bis-p-clorofenil-1,1,1-tricloroetano)	Vinclozolina
di-iso-butil ftalato (DIBP)		DDE (2,2 bis-p-clorofenil-1,1 dicloroetileno)	Carbendazime
di-n-butil ftalato (DBP)		Deltametrin	Penconazol
butilbenzil ftalato (BBP)		Carbofurano	Procloraz
Dicicloexilo ftalato (DCHP)		<i>Herbicidas:</i>	Propiconazol
di-(2-etil-exil) ftalato (DEHP)		atrazina linuron	Epoxiconazol
di-n-octil ftalato (DOP)			Procimidona
di-iso-octil ftalato (DIOP)			Tridemorfo
di-iso-nonil ftalato (DINP)		<i>Pesticidas organoclorados:</i>	
di-iso-decil ftalato (DIDP)		lindane (1,2,3,4,5,6-hexacloroexano)	
Alquilfenóis		Compostos orgânicos de estanho	
Nonilfenol		tributilestanho (TBT) e trifenilestanho (TPT)	
nonilfenol etoxilado		Policlorados de bifenilas	
Octilfenol		2,4,4'-triclorobifenil	
Octilfenoletoxilado		2,2',5,5'-tetraclorobifenil	
Organoclorados		2,2',4,5,5'-pentaclorobifenil	
dibenzo-p-dioxina		2,3',4,4',5-pentaclorobifenil	
TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina)		2,2',3,4,4',5'-hexaclorobifenil	
TCDF (2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano)		2,2',4,4',5,5'-hexaclorobifenil	
Bisfenol		2,2',3,4,4',5,5'-heptaclorobifenil	
bisfenol A		Retardantes de chama bromado	
Parabenos		Polibromobifenila (PBB)	
Benzilparabeno		2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter (BDE 47)	
Isobutilparabeno		2,2',4,4',5-pentabromodifenil éter (BDE 99)	
Butilparabeno		2,2',4,4',6-pentabromodifenil éter (BDE 100)	
n-propilparabeno		2,2',4,4',5,5'-hexabromodifenil éter (BDE 153)	
Etilparabeno		2,2',4,4',5,6'-hexabromodifenil éter (BDE 154)	
Metilparabeno		2,2',3,4,4',5',6-heptabromodifenil éter	
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos		octabromodifenil éter (BDE octa)	
naftalina benzo[a]antraceno	decabromodifenil éter (BDE 209)	decabromodifenil éter (BDE 209)	
acenafteno benzo[b]fluoranteno	hexabromociclododecano (HBCD)	Hexabromociclododecano (HBCD)	
fenantreno benzo[a]pireno	tetrabromobisfenol A (TBBA)	tetrabromobisfenol A (TBBA)	
fluoranteno dibenzo[ah]antraceno	pireno benzo[ghi]perileno	Agentes terapêuticos e farmacêuticos	
naftalina benzo[a]antraceno	acenaftileno criseno	dietilestilbestrol (DES)	
acenafteno benzo[b]fluoranteno	fluoreno benzo[k]fluoranteno	17 α -etinilestradiol (EE2)	
fenantreno benzo[a]pireno	antraceno indeno[123-cd]pireno	Estrógenios naturais	
fluoranteno dibenzo[ah]antraceno	pireno benzo[ghi]perileno	estrona (E1)	
Metais Pesados		17 β estradiol (E2)	
Cádmio		Fitoestrogênios	
Chumbo		<i>Isoflavona:</i> daidzeína e genisteína.	
Mercúrio		<i>Lignanas:</i> metaresinol e enterodiol	

4.1.2 Estrógenos

Estrógenos são substâncias químicas produzidas e secretadas pelas glândulas endócrinas e que, lançadas na corrente sanguínea, coordenam o funcionamento do organismo como um todo. Algumas funções que controlam são: atividades de órgãos completos, níveis de sais, açúcares e líquidos no sangue, o uso e armazenamento de energia, o crescimento e o desenvolvimento de um determinado organismo, sua reprodução, suas características sexuais (GHISELLI e JARDIM, 2007).

Essas substâncias podem ser classificadas em três grupos principais: hormônios sexuais femininos, ou estrógenos; hormônios sexuais masculinos, ou andrógenos e, hormônios da gravidez, ou progestógenos. Eles têm recebido maior atenção por possuir uma atividade biológica muito grande sendo relacionados como possível causa de uma série de câncer (REIS FILHO et al., 2006).

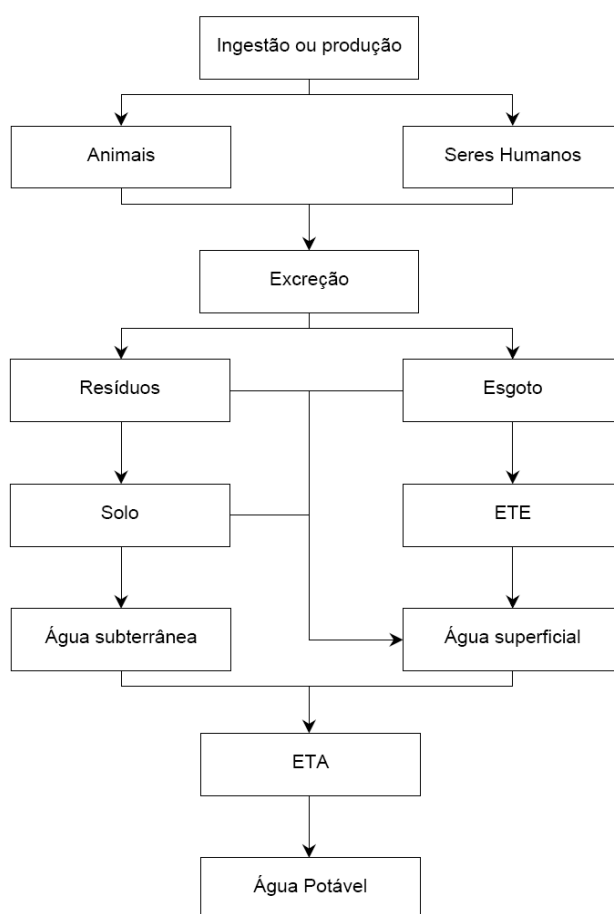
Podem-se citar como exemplo desses, os estrógenos naturais 17 β -estradiol e a estrona. Nos organismos superiores, a estrona é produzida como um metabólito do 17 β -estradiol. Quanto aos estrogênios sintéticos, são exemplos o valerato de estradiol, o estriol, o sulfato de estrona, o etinilestradiol, o mestranol e o dienestrol (RANG et al., 2001). Essas substâncias são responsáveis pelo desenvolvimento de características femininas no início da puberdade e pelo aumento das glândulas mamárias durante a gravidez. Além dessas funções, também assumem importante papel na diferenciação sexual e no desenvolvimento de características femininas pré e pós-nascimento (REIS FILHO et al., 2006).

Todos os seres humanos, bem como os animais, excretam estrógenos, através da urina ou fezes, os quais são lançados no ambiente, sendo encontrado nos esgotos domésticos chegando aos mananciais superficiais e/ou subterrâneos (BILA e DEZOTTI, 2003, REIS FILHO et al., 2006, GHISELLI e JARDIM, 2007). Na Tabela 20 estão alguns valores de excreções diárias para alguns hormônios.

Uma vez que a produção dessas substâncias ocorre de forma natural ou através do consumo na forma de medicamentos, elas são introduzidas de forma contínua no ambiente (REIS FILHO et al., 2006). A Figura 20 exemplifica o modo de entrada destes contaminantes nos sistemas aquáticos.

TABELA 20 - Excreção diária (μg) per capita de estrógenos por humanos (BILA & DEZOTTI, 2007)

Categoria	Estrona	17 β-estradiol	estriol	17 α-etinilestradiol
Homens	3,9	1,6	1,5	-
Mulheres menstruando	8	3,5	4,8	-
Mulheres na menopausa	4	2,3	1	-
Mulheres grávidas	600	259	6,0	-
<i>Mulheres</i>	-	-	-	3,5

**FIGURA 20** - Representação esquemática das principais vias de entrada de alteradores endócrinos hormonais em sistemas aquáticos (REIS FILHO et al., 2006; LOPES, 2007). ETE = estação de tratamento de esgoto; ETA = estação de tratamento de água.

4.1.3 Características físicas e químicas

O destino e o comportamento dos interferentes endócrinos, tanto no organismo como no meio ambiente, estão diretamente relacionados com suas propriedades físico-químicas (GHISELLI e JARDIM, 2007). Os estrógenos têm em comum um anel de ciclo-pentano-orto-hidrofenantreno (YING et al., 2002). A diferença entre as estruturas está apenas nos radicais ligados ao anel pentano (Figura 21).

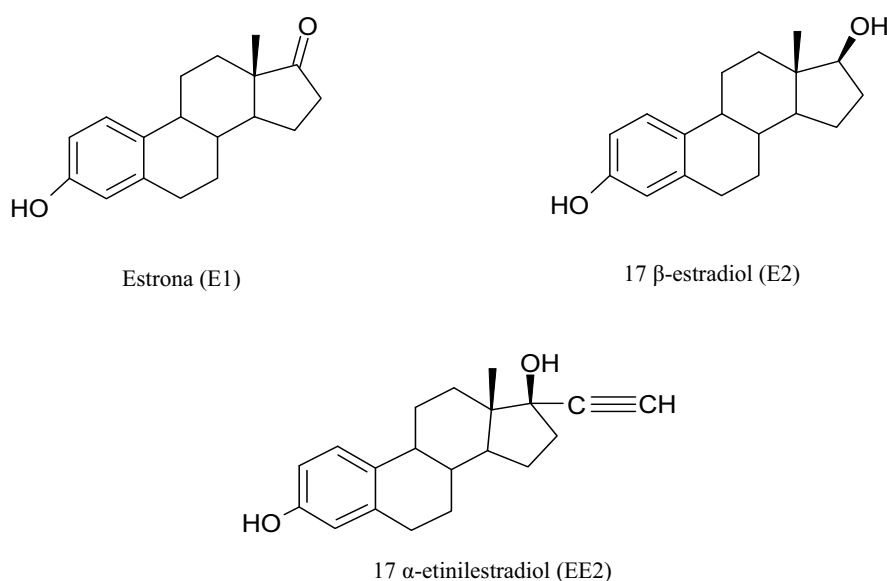


FIGURA 21 - Estrutura dos estrogênios estudados neste trabalho.

O grande número de variáveis que agem em conjunto no ambiente aquático, como temperatura, turbidez, pH, alcalinidade, oxigênio dissolvido, radiação, matéria orgânica e concentração de diversas outras substâncias, tornam difícil prever o comportamento destes compostos no ambiente (REIS FILHO et al., 2006; GHISELLI e JARDIM, 2007).

Os estrógenos naturais, 17 β-estradiol e estrona tem solubilidade de aproximadamente 13 mg L⁻¹ em água. Esteróides sintéticos, 17 α-etinilestradiol, são menos solúveis, 4,8 mg L⁻¹. Os altos valores de log K_{ow} (Tabela 21) apresentados pelos estrógenos indicam, que a interação com a matéria orgânica do solo é favorecida, tornando a percolação limitada. Mesmo tendo interagido com a matéria orgânica, os hormônios podem chegar aos corpos d'água por

escoamento superficial (lixiviação), quando ocorre aplicação de biossólido ou excretas de animais no solo (LEE et al., 2003).

TABELA 21 - Propriedades físico-químicas dos estrógenos estudados

Nome	Massa Molar	Solubilidade Água (mg L ⁻¹ – 20°C)	Pressão Vapor (mm Hg)	log K _{ow} ^a
Estrona	270,4	13	2,3 x 10 ⁻¹⁰	3,43
17 β-estradiol	272,4	13	2,3 x 10 ⁻¹⁰	3,94
17α-etinilestradiol	296,4	4,8	4,5 x 10 ⁻¹¹	4,15

a – Coeficiente de partição Octanol-água Fonte: Ying et al. (2002)

Estrógenos são substâncias lipofílicas e apresentam baixa volatilidade, devido a essas características, o processo de sorção em sedimentos suspensos pode ser um fator significativo na redução da sua concentração na fase aquosa (REIS FILHO et al., 2006). Alguns mecanismos contribuem para a redução da concentração dos mesmos à jusante ou nos pontos onde são lançados. Esses mecanismos consistem, principalmente, na biodegradação, na sorção às partículas em suspensão e aos sedimentos do corpo d'água, na adsorção ao solo e na fotólise (BAREL-COHEN et al., 2006).

4.1.4 degradação ambiental

Grande parte dos estrógenos é metabolizado e excretado na forma inativa, conjugadas com ácido glicurônicos e sulfatos (Figura 22). A ação de enzimas produzidas por bactérias comumente encontradas em áreas de despejo de efluentes biotransformam em compostos biologicamente ativos no ambiente aquático (YING et al., 2002; REIS FILHO et al., 2006).

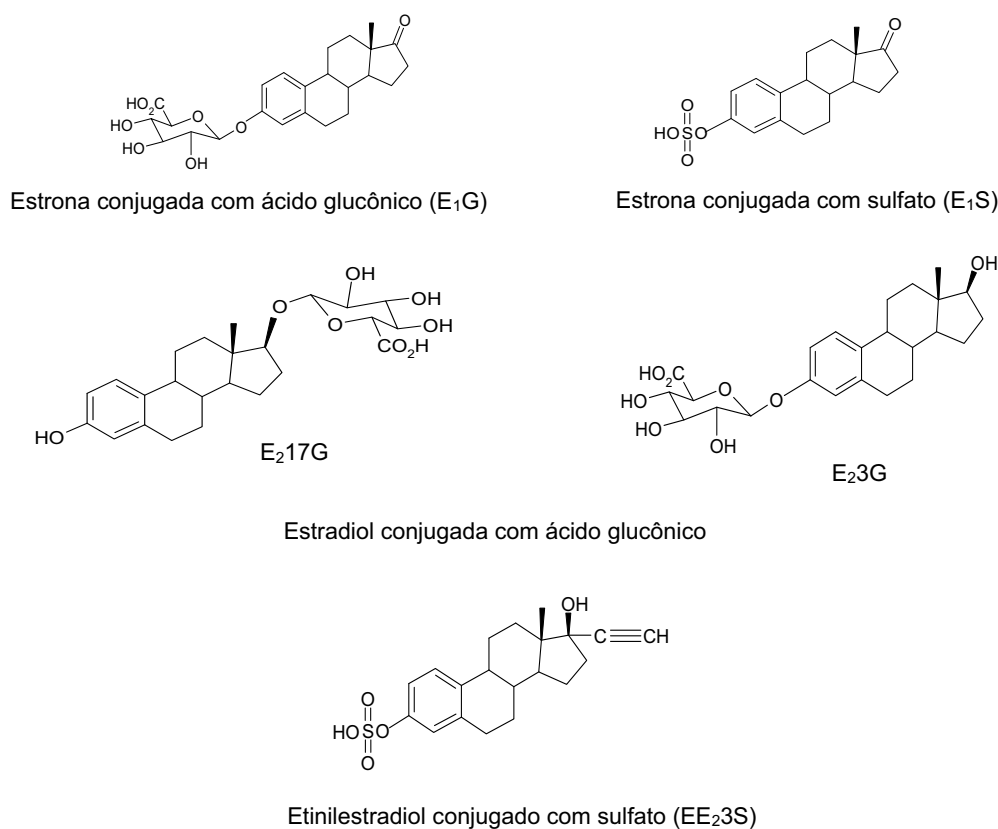


FIGURA 22 - Estruturas dos estrogênios conjugados.

O processo de quebra da conjugação ocorre no percurso do esgoto entre as residências até as ETE ou dentro dos tanques dessas estações. Isso ocorre pelo contato com a elevada população de *Escherichia coli* produtora da enzima glocuronidase arilsulfatase (D'ASCENZO et al., 2003). Desta forma, a rede coletora e as ETE podem ser consideradas reatores que convertem estrógenos da forma inativa (conjugada) em ativa (livre).

A biodegradação provocada por bactérias consiste no mecanismo mais eficiente que a adsorção para a remoção dos estrogênios do ambiente. No entanto, a biodegradação do 17 β -estradiol é acompanhada pelo aumento da concentração de estrona e, posteriormente, de outros produtos que também apresentam potencial estrogênico conforme mostra a Figura 23 (LEE e LIU, 2002).

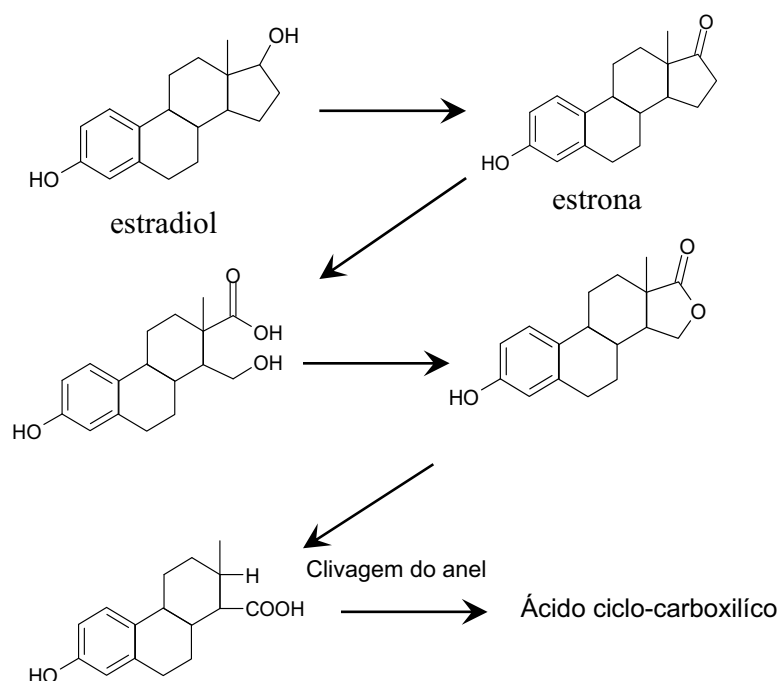


FIGURA 23 - Rota proposta de degradação do 17 β -estradiol (E2) por bactérias do esgoto (LEE e LIU, 2001).

4.1.5 Efeitos da contaminação ambiental por estrógenos

Os estrógenos possuem sua função diretamente ligada ao controle da diferenciação sexual, maturação e reprodução. Eles também regulam o crescimento uterino e têm sido associados com o controle do crescimento e diferenciação neural (CHESHENKO, 2008). Essas substâncias são encontradas no meio ambiente em concentrações da ordem de ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$ e são suspeitas de causarem efeitos adversos à saúde humana e animal.

Alguns efeitos citados na literatura, tais como diminuição na eclosão de ovos de pássaros, peixes e tartarugas; feminilização de peixes machos; problemas no sistema reprodutivo em peixes, répteis, pássaros e mamíferos e, alterações no sistema imunológico de mamíferos marinhos, têm sido associadas à exposição aos AE. Em alguns casos esses efeitos podem conduzir ao declínio da população. Em seres humanos esses efeitos incluem a redução da quantidade de esperma, o aumento da incidência de câncer de mama, de testículo e de

próstata e, a endometriose (SANTAMARTA, 2001; PAWLOWSKI et al., 2004; BILA e DEZOTTI, 2007; BJÖRKBLOM et al., 2007; REIS FILHO et al., 2006).

Estudo da contaminação mostram que o 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol estimulam alterações no aparelho reprodutivo de cobaias (DASTON et al., 1997). Além disso, o 17 β -estradiol pode ser transformado em metabólitos, resultando na formação de catecolestrogênios (JOOSTEN et al., 2004).

4.1.6 Análise de estrógenos em água

Estrógenos são um grupo de hormônios esteróides definidos pela estrutura química. Na análise desses hormônios utilizando cromatografia líquida, basicamente se faz uso de colunas de fase reversa (GABET et al., 2007). As formas estruturais são responsáveis pela diferença de polaridade entre os três estrógenos que proporciona uma separação em um processo cromatográfico, sendo possível analisar os três em uma mesma análise cromatográfica (POJANA et al., 2004). A Figura 24 mostra a posição no anel pentano onde estão localizados os diferentes substituintes.

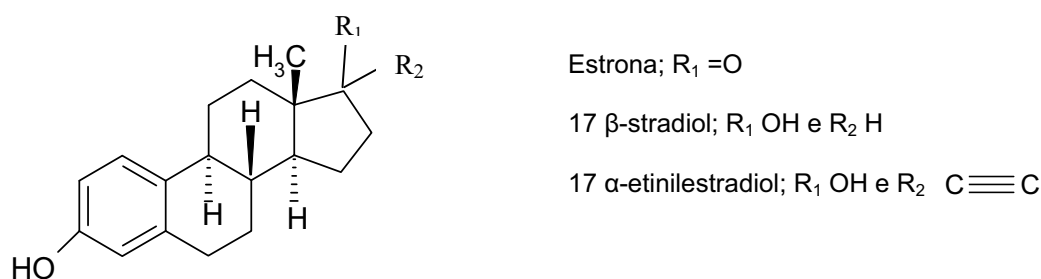


FIGURA 24 - Diferença estrutural dos estrógenos.

O estradiol e o etinilestradiol possuem dois isômeros, α (alfa) e β (beta), sendo que o 17 β -estradiol e 17 α -estradiol foram analisados simultaneamente tendo uma boa separação, utilizando coluna de C18, tendo como fase móvel acetonitrila/água (30:70) inicialmente durante 12 min, a partir de 12,3 min houve um acréscimo até 100% de acetonitrila (MAO et al., 2004). Em estudos de análises ambientais citados na literatura o 17 β -estradiol é o mais estudado, em alguns estudos é citado apenas como estradiol, isto também ocorre com o

etinilestradiol, na literatura pesquisada só foram encontrados relatos do 17 α -etinilestradiol, sendo que os trabalhos o denominam em muitos casos apenas de etinilestradiol.

Com base nas semelhanças entre as propriedades físicas e químicas dos estrogênios, os mesmos podem ser analisados simultaneamente (TERNES et al., 2001). Os métodos publicados na literatura para a determinação de estrogênios em água são principalmente baseados em extração em fase sólida, derivação (silação) e detecção por CG/MS ou CG/MS/MS (TERNES et al., 2001; XIAO et al., 2001; BOYD et al., 2003; CARGOÛET et al., 2004; LEUSCH et al., 2006; TAN et al., 2008). Esses estrógenos possuem pressão de vapor muito baixa variando de $2,3 \times 10^{-10}$ a $4,5 \times 10^{-11}$ mm Hg (Tabela 3). Neste caso, as baixas pressões de vapor apontam para a dificuldade de uma análise direta por cromatografia a gás, uma vez que as substâncias são pouco voláteis, a qual tem sido superada pela utilização de cromatografia líquida ou derivação para análise por cromatografia a gás (LOPES, 2007).

Outras alternativas consistem na cromatografia líquida com detecção por fluorescência, radioimunoensaio (SNYDER et al., 1999) ou espectrometria de massas (BARONTI et al., 2000). Para isolamento e purificação os métodos analíticos descritos na literatura baseiam-se na extração em fase sólida onde são empregados uma variedade de sorventes (LA FARRÉ et al., 2001; LINDSEY et al., 2001; BOYD et al., 2003; SOLIMAM et al., 2004; LEUSCH et al., 2006; ZHANG et al., 2006; LOPES, 2007; TAN et al., 2007; KOYUNCU et al., 2008).

Nos métodos de extração em fase sólida para análises desses hormônios podem ser usados cartuchos de fase polimérica como o HLB (copolímero hidrofílico - lipofílico), nestes casos é usado como solvente de eluição acetato de etila, MeOH ou misturas de MeOH com MTBE (metil tert-butil-éter) (10/90 v/v), MeOH/Acetona (20/80 v/v) e MeOH/DCM (50/50 v/v), obtendo recuperações entre 75-100% (GABET et al., 2008). O uso de fase de poliestireno-divinil-benzeno (Strata-X, Phenomenex) foi descrito para uma série de hormônios (E1, E2, E3, e EE2) analisados simultaneamente em efluente de ETE. A eluição foi realizada com MeOH e a recuperação realizada com a adição de padrão em água destilada foi acima de 81% (VULLIET e JEAN-BAPTISTE, 2007).

Discos e cartuchos de C18 também são utilizados, geralmente a eluição ocorre com acetona ou MeOH. Diferentes tipos de sorventes de SPME (micro extração em fase sólida) podem ser empregados para extração dos hormônios como PDMS (polidimetilsiloxano),

poliacrilato, PDMS-divinilbenzeno, carboxin-PDMS e carbowax-divinilbenzeno (CARPINTEIRO et al., 2004).

No processo de condicionamento dos cartuchos varias combinações de solventes são utilizadas com o intuito de desembaraçar as cadeias deixando-as totalmente abertas para a penetração dos hormônios, aumentando a adsorção. Alguns métodos utilizam solução ácida (pH=3) para evitar que ocorra a ionização dos grupos OH fenólicos dos estrogênios, uma vez que possuem pKa relativamente elevados (estrone - 10,25; 17 β -estradiol - 10,27 e 17 α -etinilestradiol - 10,24) eles tendem a se ionizar aumentando a polaridade e prejudicando a adsorção dos analitos.

A mistura de solventes mais utilizadas para análise por cromatografia líquida desses compostos, citado na literatura, é acetonitrila com água (BARONTI et al. 2000; OKHO et al., 2002; D'ASCENZO et al., 2003).

O fracionamento por cromatografia líquida (análise preparativa) é pouco utilizado. Cargouet et al. (2004) utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência para obter frações de amostras de água para bioensaios *in vitro* de mutagenicidade dos estrógenos. Furuichia et al. (2004) utilizaram cromatografia por permeação em gel para obter frações de água de rios para bioensaios em células MVLN (células de câncer).

Na Tabela 22, são apresentados alguns aspectos dos métodos mais utilizados para a determinação de estrógenos em águas.

TABELA 22 - Alguns métodos analíticos utilizados para determinação de estrógenos em águas naturais ou tratadas (Adaptada, LOPES, 2007)

Volume	Análito	Técnica analítica	SPE-solvente	Condicionamento – SPE	Eluente	Clean up	Lavagem	Derivação	Referência
1 L	E1, E2, EE2 e outros	GC/MS/MS	C-18	Hexano Acetona MeOH H ₂ O pH 3	Acetona	Cartucho de Silica	-	MSTFA ¹ TMSI ² DTE ³	Ternes et al. (1999)
5 L	E2 e EE2	HPLC/FLU	SDB-XC Disco	-	Acetona MeOH Hexano	-	Acetona DCM MeOH	-	Snyder et al. (1999)
2,5 L	E1, E2, EE2 e E3	GC/MS/MS	C-18 disco	MeOH MeOH:ACN (1:1) MeOH:H ₂ O (4:1) MeOH:H ₂ O (1:1) H ₂ O	MeOH:H ₂ O (4:1) MeOH:ACN (1:1)	-	MeOH:DCM (2:3)	PFBO ⁴	Xia et al. (2001)
1 L	E1, E2, EE2 e E3	HPLC/FLU	C-18	ACN H ₂ O AcetoET H ₂ O	AcetoET	Cartucho de Amino	-	CDPP ⁵	Matsumoto et al. (2002)
1 L	E1, E2, EE2 e E3	GC/MS	SDB-XC disco	MeOH DCM MeOH H ₂ O	MeOH DCM MeOH	Cartucho de Silica	-	BSTFA ⁶	Boyd et al. (2003)
0,5 L	E1, E2, EE2 e outros	LC/MS/MS	Lichrolut RP-18	MeOH H ₂ O	MeOH	-	-	-	Rodriguez-Mozaz et al. (2004)
Grande volume	E1, E2, EE2 e E3	LC/MS/MS	Oasis-HLB	Acetona:MeOH (80:20) H ₂ O	Acetona	Filtros de carvão	-	-	Iris-Constanze et al. (2005)
0,5 L	EE2	GC/MS	C-18	5 mL MeOH 5 mL Acetona	5 mL MeOH 5 MI Acetona	-	-	BSTFA+TMSC (99:1)	Zhang et al. (2006)
1 L	E1, E2 e outros	CG/MS	Oasis-HLB	MeOH H ₂ O	MeOH	-	-	BSTFA ⁶	Leusch et al. (2006)
1 L	E1, E2 e outros	GC/MS	Oasis-HLB	Hexano:acetona (50:50) MeOH H ₂ O	MeOH	-	-	BSTFA ⁶	Tan et al. (2007)
1L	E1, E2 α e β, EE2 e E3	C-18 Disco	C-18 Disco	10 mL (MeOH 50%:DCM 50%) 10 mL MeOH 10 mL H ₂ O	5 mL (MeOH 50%:DCM 50%)	-	20 mL H ₂ O	-	Chen et al (2007)
	E1, E2, EE2 e E3	LC/MS/MS	C-18	10 mL (MeOH 50%:DCM 50%) 5 mL MeOH 10 mL H ₂ O	7 mL (MeOH 50%:DCM 50%)	-	10 mL	-	Koyuncu et al (2008)

E2, 17- estradiol; E1, Estrona; EE2, Etmilestradiol; E3, estriol. ¹ N metil N (trimetilsilil) trifluoroacetamida. ² Trimetilsilil imidazol. ³ Ditiocetrol. ⁴ Cloreto de pentafluorobenzoila. ⁵ 5-(4"-clorosulfônico-1",1"-difetil-4"-y)-1,1,2,2-pentafluoro-3,5-pentanodiona. ⁶ Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida.- Informação não fornecida no artigo.

Os detectores mais utilizados para quantificação desses estrogênios são: espectrômetro de massas (la FARRÉ et al., 2001; LINDSEY et al., 2001; D'ASCENZO et al., 2003; MIZUGUCHI et al., 2005) e de fluorescência (SNYDER, et al., 1999; OKHO et al., 2002; MAO et al., 2004), acoplados a cromatografia líquida.

O espectrômetro de massas (MS) é usado com frequência empregando ESI (Ionização por “Eletrospray”) no modo negativo, alguns estudos usam ESI e APCI (Ionização Química a Pressão Atmosférica). Ambos os modos de ionização são associados normalmente à ionização múltipla (MS-MS também representada como MS²). Os LD do método neste caso são da ordem de unidades de ng L⁻¹ dependendo da matriz (GABET et al., 2007).

Também é utilizada cromatografia a gás com espectrometria de massas (TERNES et al., 2001; ZHU et al., 2001; JEANNOT et al., 2002; MIAO et al., 2002; SOLIMAM et al., 2004), neste caso devido ao fato de que os estrógenos serem pouco voláteis e termosensíveis, faz-se necessária uma etapa de derivação como mostrado na Tabela 22. Um dos agentes de derivação mais usado é o *N,O*-bis(timetil-silil)trifluoroacetamida (BSTFA) (JEANNOT et al., 2002; BOYD et al., 2003). Para matrizes aquosas, os LD obtidos por GC/MS e GC/MS/MS geralmente estão abaixo de 1 ng L⁻¹ (GABET et al., 2007).

Se para a cromatografia gasosa a baixa volatilidade dos estrogênios demanda uma etapa de derivação, a maior limitação para a cromatografia líquida encontra-se na solubilidade dos analitos na fase móvel.

Os estrógenos possuem grupos fenólicos, ou seja, anel aromático com duplas conjugadas, estes anéis são cromóforos e fluoróforos. Assim sendo, em princípio, podem ser analisados por UV ou fluorescência, no entanto pela maior sensibilidade e seletividade, a detecção por fluorescência é melhor aplicada a análise destes compostos em matrizes ambientais.

O detector de espectrometria de massas para HPLC tem sido cada vez mais utilizado para análise de contaminantes orgânicos em matrizes ambientais. Embora, os limites de detecção e quantificação sejam superiores aos obtidos para o detector de fluorescência, tem sido o mais utilizado porque tem a vantagem de permitir a análise de substância de diferentes classes em uma só análise (RODRIGUEZ-MOZAZ et al., 2004; IRIS-CONSTANZE et al., 2005; CHEN et al., 2007; KOYUNCU et al., 2008).

Na Tabela 23 são apresentados alguns métodos para determinação de estrógenos em água, com ênfase à técnica cromatográfica e parâmetros de validação. Observa-se que o maior limite de detecção (600 ng L^{-1}) foi apresentado pelo método de Matsumoto et al (2002) que baseou-se na análise por HPLC/FLU, utilizando a derivação pré-coluna com 5-(4''-clorossulfônico-1',1''difetil-4'-yl)-1,1,1,2,2-pentafluoro-3,5-pentanodiona. Nesse caso, os limites de detecção estiveram acima dos demais métodos descritos na literatura, indicando que essa derivação não consiste em boa alternativa para análise por cromatografia líquida.

O método desenvolvido por Boyd et al. (2003) e Ternes et al. (1999) utilizando como base a cromatografia gasosa com espectrometria de massas apresentou os menores limites de detecção dentre os métodos consultados de $0,1$ a $0,3 \text{ ng L}^{-1}$, e $0,1$ a $0,06 \text{ ng L}^{-1}$ respectivamente. Iris-Constanze et al. (2005) utilizando um sistema LC/MS/MS obteve um limite de detecção de $0,02 \text{ ng L}^{-1}$ para estrona sendo este o menor valor obtido entre todos os estrogênios nos métodos consultados.

A decisão em usar GC ou LC está baseada nas características físicas e químicas dos estrógenos ou mesmo no tipo de matriz. Eles possuem grupos com função polar e/ou são termicamente sensíveis não podendo ser analisado diretamente por GC. A polaridade relativamente alta proporciona à formação de picos cromatográficos pouco intensos sendo necessária a derivação para minimizar esse efeito. Assim a maioria dos métodos para análise em GC que apresentam excelentes valores de LD incorpora uma etapa de derivação para aumentar a estabilidade térmica e reduzir a polaridade (BOYD et al., 2003; TAN et al., 2007, GABET et al., 2007). Os métodos utilizando LC/MS/MS são tão sensíveis quanto o GC/MS ou MS/MS e não requerem o processo de derivação como pré-tratamento da amostra (CHEN et al., 2007). Iris-Constanze et al. (2005) utilizaram um sistema de extração automático (amostrador de alto volume) que dependendo do processo de extração poderia concentrar de 19 a 104 litros de água.

A cromatografia líquida apresenta vantagem para análise de compostos orgânicos em água, uma vez que os compostos voláteis representam uma pequena fração de compostos orgânicos contidos em água e esgotos. A maior parte do carbono está presente como compostos não voláteis, que podem ser diretamente analisados pela cromatografia líquida e não pela gasosa. Principalmente para esgoto sanitário que contém muito material húmico e compostos orgânicos polares (REIS FILHO et al., 2006).

TABELA 23 – Parâmetros da validação analítica para alguns dos métodos disponíveis na literatura para análise de hormônios estrogênicos em águas naturais (Adaptada, LOPES, 2007)

Volume	Analito	Técnica	LD ng L ⁻¹	Recuperação	CV	Referência
1 L	E1, E2, EE2 e outros	GC/MS/MS	0,1 – 0,06	88 – 908	-	Ternes et al. (1999)
5 L	E2 e EE2	HPLC/FLU	1,6	63 – 72	3 - 7	Snyder et al. (1999)
2,5 L	E1, E2, EE2 e E3	GC/NCI/MS	0,2	84 – 116	11 - 22	Xiao et al. (2001)
1 L	E1, E2, EE2 e E3	HPLC/FLU	600 – 650	86 – 105	4 – 5,8	Matsumoto et al. (2002)
1 L	E1, E2, EE2 e E3	GC/MS	0,1 – 0,3	118 – 130	15 – 22	Boyd et al. (2003)
0,5 L	E1, E2, EE2 e outros	LC/MS/MS	0,53 – 14,79	70 – 119	4 - 23	Rodriguez-Mozaz et al. (2004)
19 - 104	E1, E2, EE2 e E3	LC/MS/MS	0,02 – 0,45	75 – 80	-	Iris-Constanze et al. (2005)
1 L	E1, E2 e outros	GC/MS	5	60 – 120	-	Leusch et al. (2006)
1 L	E1, E2 e outros	GC/MS	1 – 5	97 – 120	-	Tan et al. (2007)
1 L	E1, E2, EE2, E3	LC/MS/MS	8 – 10	95 – 116	1,7 - 11	Chen et al. (2007)
1L	*E1 e **E2	HPLC/FLU	**0,3 µg L ⁻¹ *3,8	83 -93		Lopes (2007)
1 L	E1, E2, EE2, E3 e outros	LC/MS/MS	0,8 – 1,1	96 – 106	1 - 8	Koyuncu et al. (2008)

E2, 17- estradiol; E1, Estrona; EE2, Etinilestradiol; E3, estriol.

4.2 PARTE EXPERIMENTAL

Todo o processo experimental de otimização e validação das condições de análise dos estrógenos estrona e 17 β-estradiol, em água superficial e potável, foi desenvolvido em conjunto com a Dra. Laudicéia G. Lopes (LOPES, 2007) e o Doutorando José Antônio de Moura. A partir desse método em conjunto com o Doutorando José Antônio de Moura,

estendemos as condições otimizadas para o 17 α -etinilestradiol avaliando todas as condições publicada por LOPES (2007) e introduzindo uma nova matriz, esgoto sanitário antes e após o tratamento. Nesta tese detalha-se a validação para esgoto sanitário após o tratamento (Gradeamento).

4.2.1 Materiais, equipamentos, reagentes

4.2.1.1 Materiais

- vidraria de uso comum em laboratório (béquer, erlenmeyer, pipeta, balão volumétrico);
- seringa de vidro de 5 mL, fabricada pela YALE;
- microseringa de vidro de 100 e 250 μ L, fabricada pela HAMILTON;
- unidade filtrante PVDF (fluoreto de polivilideno), Durapore, MILIPORE, 0,45 mm de diâmetro de poro e 13 mm diâmetro do filtro;
- filtro de fibra de vidro GF-C, 47 mm de diâmetro, 1,2 μ m de diâmetro de poro, marca Schleicher & Schuell;
- pré-coluna com 30 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro, fabricada pela PHENOMENEX;
- coluna C18 com 250 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro e tamanho de partículas de 5 μ m, fabricada pela SUPELCO;
- conjunto de filtração para extração em fase sólida, com 19 posições, WATERS;
- conjunto de filtração, marca MILLIPORE;
- compressor-aspirador modelo DIA PUMP CAL, marca FANEM;
- cartucho para extração em fase sólida ACCUBOND C-18 de 500 mg e 6 mL, AGILENT;
- outros materiais: suporte, garra, papel indicador de pH colorpHast.

4.2.1.2 Equipamentos

- banho de ultra-som, 40 Hz, 20 L, Thornton;

- balança analítica METTLER TOLEDO AG 245 (0,0001 g);
- cromatógrafo líquido Pro Star, com detector de fluorescência, modelo 360, e injetor automático modelo 400, acoplado a uma workstation VARIAN;
- espectrofotômetro de fluorescência VARIAN, modelo Cary Eclipse;

4.2.1.3 Reagentes, solventes e padrões

- detergente alcalino Extran, MERCK (Brasil);
- metanol (grau HPLC) e acetonitrila (grau HPLC) da J.T.BAKER (USA), hexano e acetona (grau HPLC) da MALLINCKRODT (USA);
- água deionizada obtida do sistema Milli-Q plus MILLIPORE;
- padrões de hormônios, com grau de pureza 100 e 99,4%, 98,8% para estrona, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol, respectivamente, da marca FLUKA (Alemanha).

4.2.2 Limpeza da vidraria

A vidraria foi lavada utilizando o detergente alcalino Extran (2%). Em seguida foram enxaguadas com água de torneira, água destilada, água deionizada e secas ao ar.

4.2.3 Preparação das soluções-estoque

Todas as soluções foram preparadas em acetonitrila. Primeiramente foram preparadas soluções de 100 mg L⁻¹ dos hormônios separadamente, a partir destas prepararam-se as soluções padrão mistas de trabalho, para testes de sensibilidade, separação, obtenção da curva de linearidade e da curva analítica.

Para determinar a separação entre os hormônios foi preparada uma solução contendo os três hormônios em concentrações de 10 mg L⁻¹ para estrona, 0,1 mg L⁻¹ para 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol. As concentrações diferiram de acordo com a intensidade de fluorescência de cada composto.

4.2.4 Avaliação do desempenho do sistema HPLC/FLU

As condições cromatográficas (HPLC/Flu) utilizadas por Lopes (2007), incluíam: volume de injeção (automático) de 30 μL , vazão de 1,0 mL min^{-1} no modo isocrático com eluente consistindo de 50:50 (v/v) $\text{H}_2\text{O/ACN}$, em coluna C-18, sendo que a detecção era feita a 230 nm para λ_{exc} e 306 nm para λ_{em} .

Neste trabalho obteve-se o espectro de fluorescência 3D para o 17 α etinilestradiol, para orientar a escolha das condições de detecção.

Para avaliar a resolução cromatográfica, utilizou-se uma solução padrão contendo os três estrógenos e partiu-se das condições utilizadas por Lopes (2007), que foram otimizadas.

Uma vez estabelecidos os melhores comprimentos de onda para detecção e a melhor forma de eluição, efetuou-se o estudo da resposta do sistema cromatográfico. Para isso, foram utilizadas soluções-padrão mistas, em acetonitrila, contendo os 3 hormônios nas concentrações entre 0,1 e 10 mg L^{-1} para a estrona e 12,5 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o 17 β -estradiol e o 17 α -etinilestradiol.

A avaliação do desempenho do sistema cromatográfico foi feita com base na construção de gráficos de linearidade Área/Concentração x Concentração, coeficientes de correlação da curva analítica, coeficiente angular da equação da reta da curva analítica (Área x Concentração) e cálculo dos coeficientes de variação para cada ponto da curva. (BRITO et al., 2004)

A partir das curvas de linearidade também foi possível obter o LD e o LQ, determinados a partir da rejeição de anômalos com base na curva de linearidade utilizando um procedimento chamado de "Teste de Huber" (VALENTE, 2006) descrito na parte introdutória desta tese. O LD foi determinado a partir da menor concentração na qual houve uma variação de área que ficou fora da mediana, $\pm 3\%$, estabelecido na curva de linearidade. Já o LQ foi determinado a partir da menor concentração na qual houve uma variação de área que ficou dentro da mediana, $\pm 3\%$, estabelecido na curva de linearidade.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) também foram calculados pelo método baseado em parâmetros da curva analítica. A curva analítica foi construída com 5

pontos e 3 repetições para cada ponto (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA, 2003).

4.2.5 Otimização e validação do método de tratamento das amostras

Utilizando-se amostras de água subterrânea fortificadas com os analitos ($8 \mu\text{g L}^{-1}$ para estrona e 74 ng L^{-1} para 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol) aplicou-se o método descrito por Lopes (Tabela 24).

TABELA 24 - Procedimentos de extração validado por Lopes (2007)

Método	Volume de amostra	Massa de sorvente	Condicionamento do cartucho	Volume do eluente	Referência
	1.000 mL	500 mg	6 mL de Hexano 2 mL de Ace 6 mL de MeOH 10 mL de H ₂ O pH 3	4 mL de Ace	Ternes et al (1999)

A partir deste método foram introduzidas modificações que culminaram no método utilizado neste trabalho e que está resumido na Figura 25.

Foram realizados testes de recuperação em três níveis de recuperação, alto, médio e baixo, esses níveis foram estabelecidos após a obtenção do limite de quantificação, das curvas de linearidade e calibração para o sistema cromatográfico (HPLC/FLU). Para validação do método utilizou-se o estudo de recuperação para determinação da precisão e exatidão conforme descrito por BRITO et al. (2004).

Para cada nível foram realizadas três extrações, uma testemunha que consiste na extração sem adição do padrão na amostra e um branco, que é a passagem pelo cartucho de C18 apenas dos solventes utilizados no condicionamento. A Tabela 25 apresenta os três níveis de fortificação utilizados no estudo de recuperação do método. Todos os ensaios foram efetuados em triplicata.

O método selecionado foi aplicado nas recuperações dos hormônios em efluente de ETE, água superficial e subterrânea.

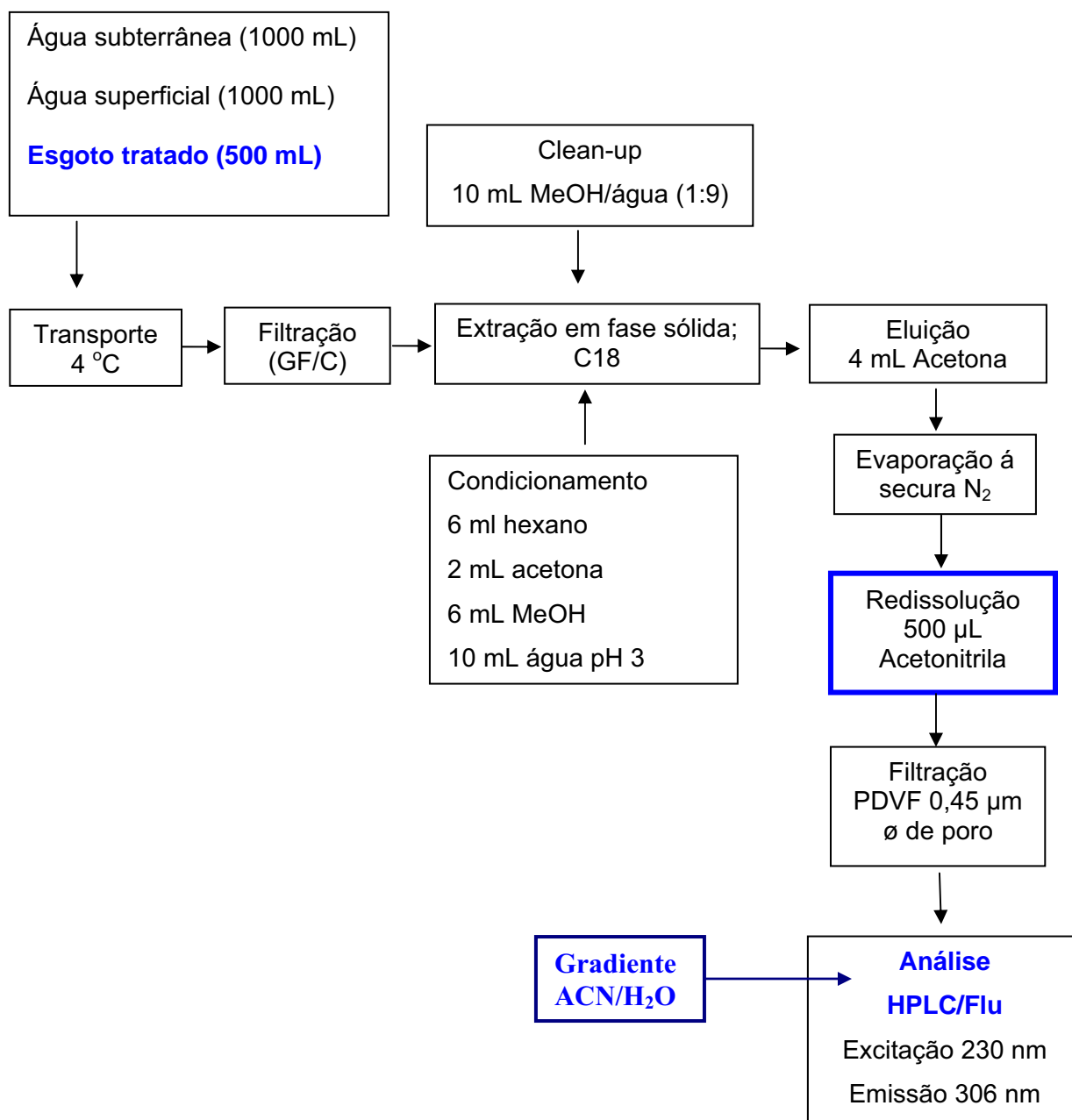


FIGURA 25 - Método otimizado e validado por Lopes (2007). Em destaque as condições modificadas neste trabalho, para a determinação de 17 α etinilestradiol.

TABELA 25 - Estudo de recuperação do método - níveis de fortificação de água subterrânea

Estrógenos	Inferior	Médio	Superior
Estrona	2,5 µg L ⁻¹	5 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹
17 β-estradiol	6,25 ng L ⁻¹	25 ng L ⁻¹	0,1 µg L ⁻¹
17 α-etinilestradiol	6,25 ng L ⁻¹	25 ng L ⁻¹	0,1 µg L ⁻¹

Para remoção de material em suspensão em água superficial e esgoto tratado realizou-se filtração com filtros de fibra de vidro GF/C (47 mm de diâmetro, 1,2 µm diâmetro de poro) antes da extração em fase sólida. O *clean up* do cartucho de C18 antes da eluição foi efetuado pela passagem de 10 mL de solução H₂O/MeOH (9:1, v/v). Para esgoto tratado utilizou-se de 500 mL, e não 1.000 mL conforme utilizado anteriormente no ensaio realizado para a validação do método.

A fim de promover a interação do padrão adicionado com os componentes das amostras, água superficial e esgoto tratado após fortificação foram submetidas ao *aging* (envelhecimento) durante 4 horas, a 4 °C, sob proteção de luz (LOPES, 2007).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Desempenho do sistema analítico HPLC/FLU

Para a seleção dos comprimentos de onda na utilização de cromatografia líquida com detecção por fluorescência, foram elaborados espectros de fluorescência em 3D (Figuras 26, 27 e 28), para estrona, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol.

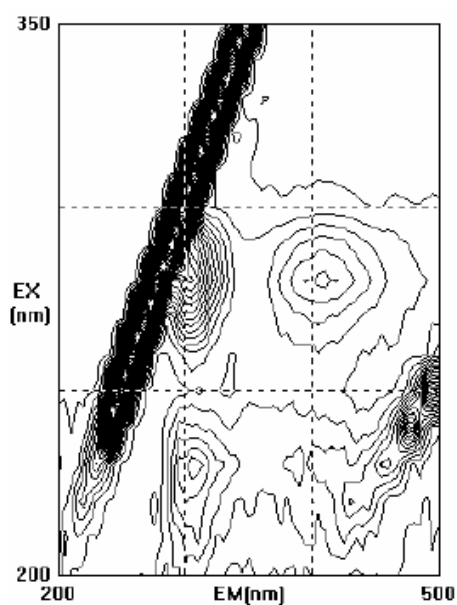


FIGURA 26 - Espectro de fluorescência 3 D de emissão e excitação da estrona (solvente: acetonitrila) (LOPES, 2007).

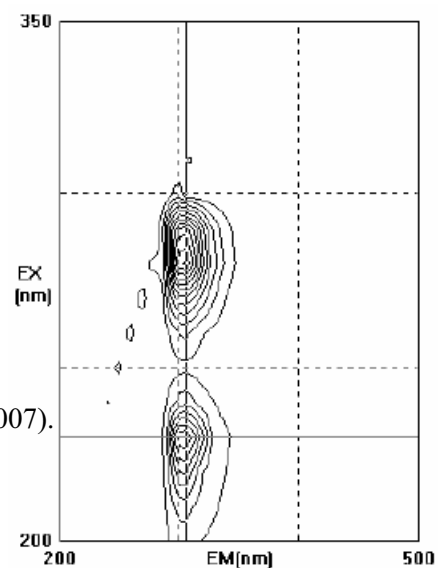


FIGURA 27 - Espectro de fluorescência 3 D de emissão e excitação do 17 β -estradiol (solvente: Acetonitrila) (LOPES, 2007)

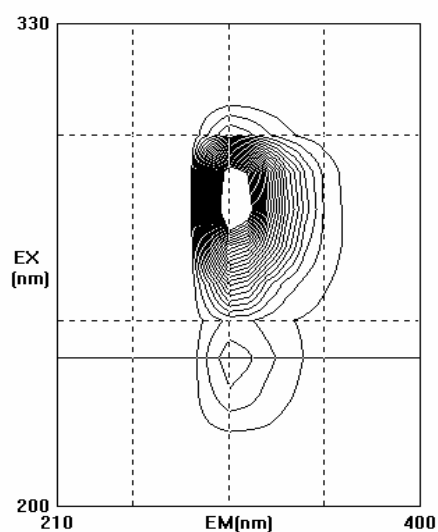


FIGURA 28- Espectro de fluorescência 3 D de emissão e excitação do 17 α -etinilestradiol (solvente: Acetonitrila).

De acordo com o descrito por Lopes (2007) os estrógenos estrona e 17 β -estradiol apresentam duas regiões de máximos de excitação e emissão, o mesmo comportamento pode ser observado para o 17 α -etinilestradiol (Figura 28). Foram escolhidos os comprimentos de onda 230 nm para excitação e 306 nm para emissão por serem coincidentes para as 3 moléculas de interesse.

Tendo selecionado as condições para a detecção, as misturas de hormônios foram injetadas no sistema HPLC/FLU onde aplicou-se o gradiente ACN/H₂O (Figura 29).

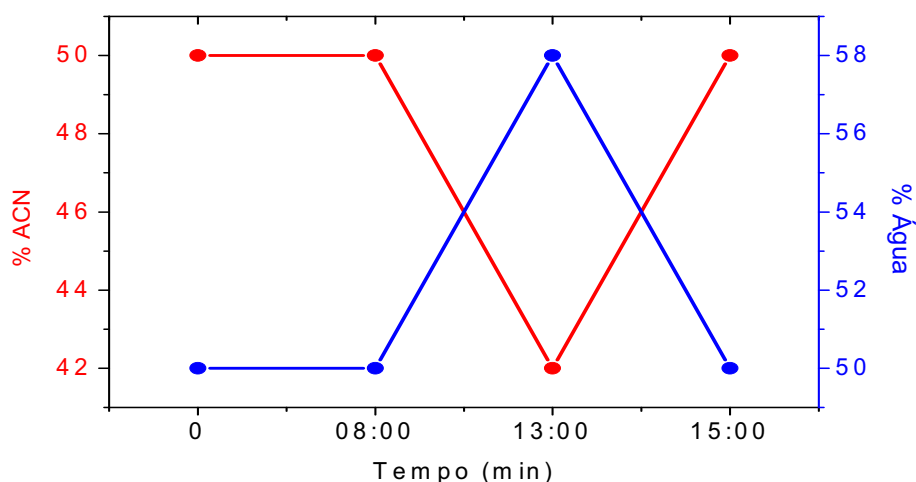


FIGURA 29 - Gradiente de eluição utilizado para os estrógenos em análise por cromatografia.

Lopes (2007) utilizou ACN:H₂O 50:50 (v/v), no modo isocrático como fase móvel para separação de estrona e 17 β -estradiol, o gradiente ACN:H₂O foi utilizado para melhorar a resolução entre estrona e o 17 α -etinilestradiol. A resolução obtida entre o 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol foi de 3,73 e do 17 α -etinilestradiol e estrona de 1,53, esta resolução mostrou-se excelente e a separação/detecção dos analitos ocorreu em tempo inferior a 13 minutos, conforme pode-se observar no cromatograma mostrado na Figura 30.

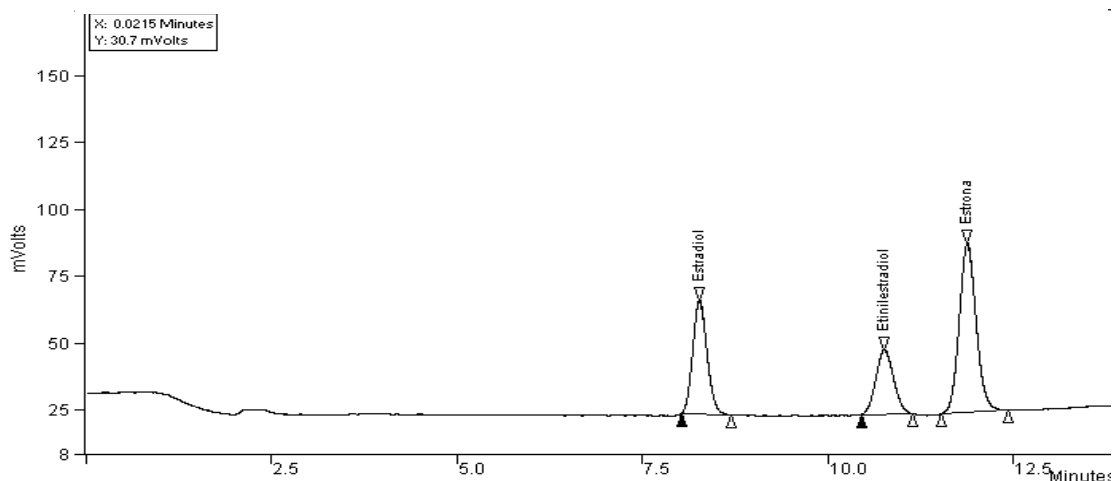


FIGURA 30 - Cromatograma obtido da separação dos hormônios Estrona (10 mg L^{-1}), 17β -estradiol ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) e 17α -etinilestradiol ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) em Ác. Oxálico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

A linearidade da resposta do sistema cromatográfico já havia sido estudada por Lopes (2007), para estrona e estradiol, porém durante o desenvolvimento deste trabalho foi necessária a troca da lâmpada de xenônio do detector. Além disso, a mudança da eluição do modo isocrático para o modo gradiente também poderia afetar a resposta do detector. Por isso fez-se novamente o estudo da linearidade para estrona e estradiol, juntamente com etinilestradiol. Neste estudo foram utilizadas seis soluções-padrão mistas com diferentes concentrações. Cada uma foi injetada em triplicata nas condições otimizadas anteriormente. A linearidade do intervalo de trabalho foi estabelecida pelas curvas de linearidade baseadas no Teste de Huber (Valente, 2006), para estrona, 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol (Figuras 31, 32 e 33).

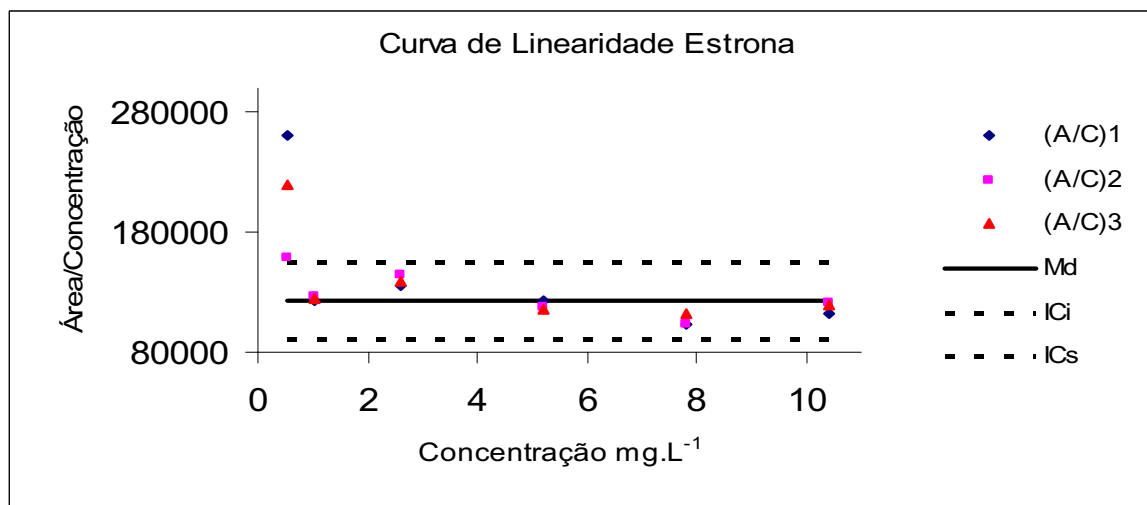


FIGURA 31 - Curva de Linearidade para a estrona: A/C – área/concentração, Md – mediana das razões A/C, Ici – intervalo de confiança inferior, Ics – intervalo de confiança superior.

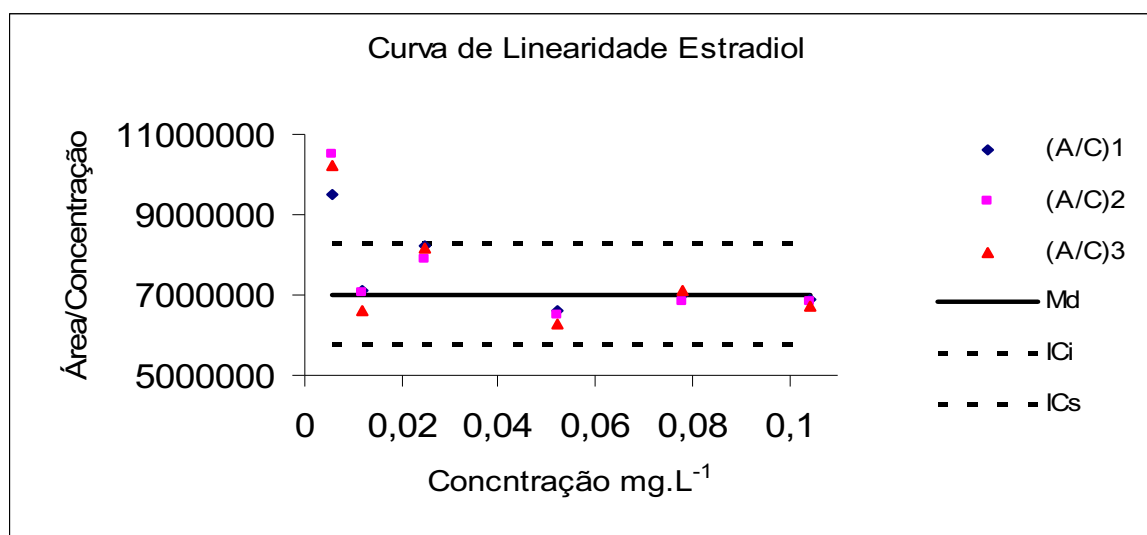


FIGURA 32 - Curva de Linearidade para a 17 β-estradiol: A/C – área/concentração, Md – mediana das razões A/C, Ici – intervalo de confiança inferior, Ics – intervalo de confiança superior.

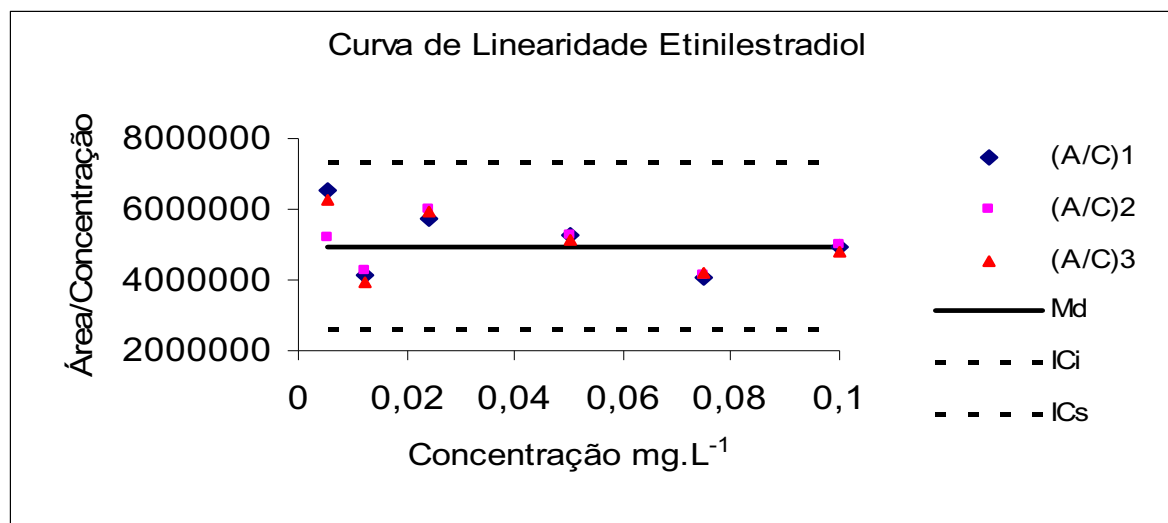


FIGURA 33 - Curva de Linearidade para a 17 α -etinilestradiol: A/C – área/concentração, Md – mediana das razões A/C, Ici – intervalo de confiança inferior, Ics – intervalo de confiança superior.

Pelas curvas de linearidade pode-se observar para estrona e 17 β -estradiol que apenas a triplicada do primeiro ponto está fora do limite aceitável pela curva, enquanto que para 17 α -etinilestradiol este valor está dentro do limite da curva, mas apresenta uma maior dispersão em relação aos outros pontos, desta forma este valor de concentração foi excluído na obtenção da curva de calibração. Com base nessa eliminação determinou-se que esse ponto seria o limite de detecção (LD), pois foi a menor concentração na qual se pode observar estrona, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol sem que houvesse uma reprodução de área que fosse linear. Todos os demais pontos estão dentro dos limites estabelecidos pela curva com uma mediana $\pm 3\%$. O segundo ponto foi aceito como sendo o limite de quantificação (LQ), pois foi a menor concentração que ficou dentro dos limites da curva de linearidade, sendo que também possui um bom coeficiente de variação (CV) (LOPES, 2007).

Com a faixa de trabalho sendo linear se obteve as curvas analíticas para os três hormônios, os principais dados da curva analítica estão mostrados na Tabela 26. Um exemplo das curvas analíticas obtidas está no Anexo 2. Salienta-se que a cada conjunto de amostras foi construída uma curva analítica para maior confiabilidade analítica.

TABELA 26 - Equações da curva analítica, intervalo de trabalho, coeficientes de correlação e de variação do fator de resposta do sistema cromatográfico HPLC/FLU

Hormônios	Intervalo de trabalho (mg L ⁻¹)	Equação Y = A+B*X	Coefficiente de correlação (R)
Estrona	1 – 10	Y = -14336,9+357066,9X	0,999
17 β-Estradiol	0,0125 – 0,1	Y = 812,9+2,26.10 ⁷ X	0,999
17 α-Etinilestradiol	0,0125 – 0,1	Y = -8118+1,54.10 ⁷ X	0,999

Por meio da construção das curvas analíticas pode-se observar a sensibilidade analítica do sistema através do coeficiente angular obtido da equação da reta podendo assim distinguir concentrações muito próximas entre si, pois quanto maior a inclinação da curva (b maior), mais sensível é o sistema analítico. Por meio do coeficiente de correlação próximo de 1, nota-se que a linearidade esteve bastante satisfatória confirmando o resultado da curva de linearidade e também esteve acima do valor recomendado pela ANVISA, $r \geq 0,99$ (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003) e pelo INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2003), $r \geq 0,90$. A precisão mostrou-se bastante satisfatória, pois os coeficientes de variação obtidos para as repetições (n=3) de cada ponto da curva analítica variaram entre 1 e 5 %.

Na Tabela 27, são apresentados os LD e LQ obtidos pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica e os obtidos através da curva de linearidade para os hormônios.

TABELA 27 - Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ), em mg L⁻¹, do sistema cromatográficos obtidos pelas curvas analítica e de linearidade

Hormônios	LD		LQ	
	Curva analítica	Curva de linearidade	Curva analítica	Curva de linearidade
Estrona	0,1	0,5	0,3	1,0
17 β-Estradiol	0,0044	0,006	0,0133	0,0125
17 α-Etinilestradiol	0,0044	0,006	0,0149	0,0125

Volume de injeção = 30 µL

Destaca-se que as divergências existentes entre os limites de detecção e de quantificação da estrona em relação ao 17 β -estradiol e do 17 α -etinilestradiol são referentes às diferentes intensidades de fluorescência desses hormônios.

4.3.2 Validação do método

Os resultados obtidos para as recuperações do método avaliado em relação ao utilizado por Lopes (2007) são apresentados na Tabela 28.

TABELA 28 – Comparação das recuperações percentuais para métodos de extração de hormônios em água subterrânea (V = 1000 mL)

Hormônio	Recuperação (%) \pm sd	
	Lopes, (2007)	Este Trabalho
Estrona	74 \pm 2	93 \pm 3
17 β -estradiol	100 \pm 4	90 \pm 4
17 α -etinilestradiol	-	110 \pm 2

[Estrona] = 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, [17 β -estradiol] = [17 α -etinilestradiol] = 100 ng L^{-1} sd = desvio padrão

Considerando como critério de aceitação, a recuperação compreendida entre 70 e 120 % (THIER & ZEUMER, 1987) da concentração fortificada, nota-se que o método atende aos requisitos para os três analitos.

Nas condições experimentais do método, a extração não apresenta interferentes na região de eluição dos hormônios. Na Figura 34 são mostrados cromatogramas da amostra fortificada (água subterrânea + analitos) dos extratos da amostra testemunha (água subterrânea), e do branco de laboratório (simulação da extração utilizando água ultrapura).

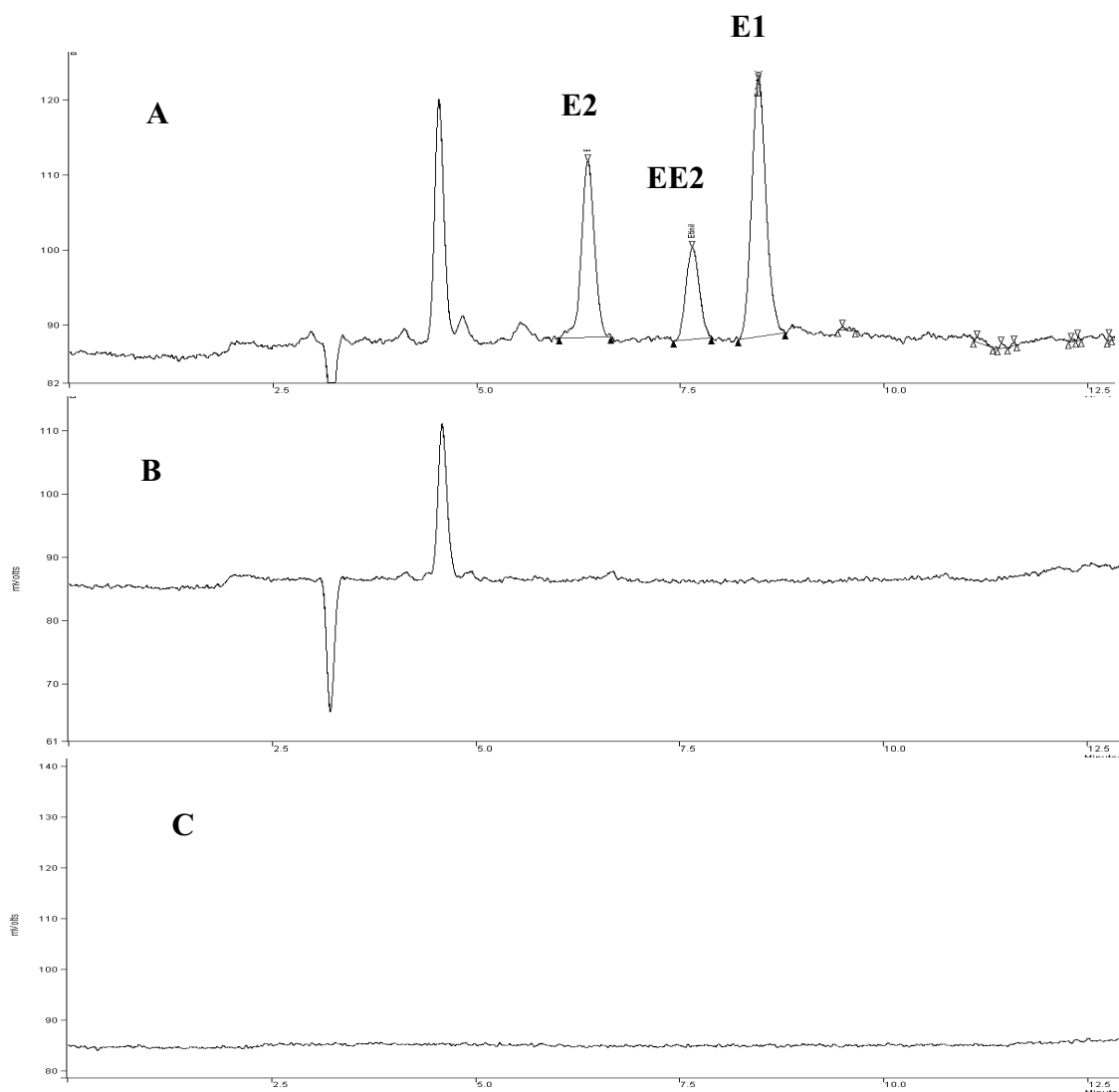


FIGURA 34 - Cromatogramas HPLC/FLU. (A) Extrato de água subterrânea fortificada 17 β -estradiol (E2), 17 α -etinilestradiol (EE2) e estrona (E1); (B) Extrato de amostra testemunha (água subterrânea sem fortificação); (C) branco (simulação da extração utilizando água ultrapura). Condições de extração por SPE e de análise como descritas no texto. Concentração: Estrona, 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol, 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Como o efeito matriz não foi importante, com o pode ser constatado pela Figura 24, as curvas analíticas foram construídas apenas com os padrões no solvente (acetonitrila), pois considerou-se desnecessária a sua construção sobre a matriz.

O método foi então submetido à avaliação da precisão e exatidão também com experimento de recuperação, em três níveis para água subterrânea, água superficial e esgoto tratado. Para cada nível foram efetuadas três repetições e os resultados são

mostrados a seguir (Tabela 29). Os cromatogramas para cada extração estão expostos no anexo 3.

As recuperações obtidas estiveram entre 70 e 120 %, com exceção de 17 α -etinilestradiol em esgoto tratado, que no nível inferior obteve um valor de 134 % com um coeficiente de variação de 13%. Para essa matriz este foi o único ponto que não apresentou concordância com o preconizado por Thier & Zeumer (1987), desta forma o segundo ponto que estava dentro do limite de recuperação aceito tornou-se o limite de quantificação para esta substância. Esta variação pode estar relacionada com o efeito da matriz sobre a substância uma vez que na curva de linearidade este valor estava compreendido dentro do limite estabelecido pela mediana ($med \pm 3$) e na amostra testemunha não foi detectada a presença do hormônio (Figura 35).

TABELA 29 - Recuperações percentuais e coeficiente de variação (CV) dos compostos analisados pelo método proposto (n=3)

	Nível Inferior		Nível Médio		Nível Superior	
	[E1] = 0,5 µg L ⁻¹	[E2] = [EE2] = 6,25 ng L ⁻¹	[E1] = 5,0 µg L ⁻¹	[E2] = [EE2] = 25,00 ng L ⁻¹	[E1] = 10 µg L ⁻¹	[E2] = [EE2] = 0,10 µg L ⁻¹
	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
Água subterrânea						
E1	80	2	83	2	92	5
E2	87	7	81	2	90	4
EE2	93	3	85	3	102	1
Água superficial						
E1	95	11	83	2	90	1
E2	117	1	84	1	93	1
EE2	118	11	87	1	98	1
Esgoto tratado						
E1	95	1,0	76	10	81	7
E2	106	10	71	8	70	6
EE2	134	13	75	1	74	5

E1 – estrona; E2 – 17 β-estradiol; EE2 – 17 α-etinilestradiol

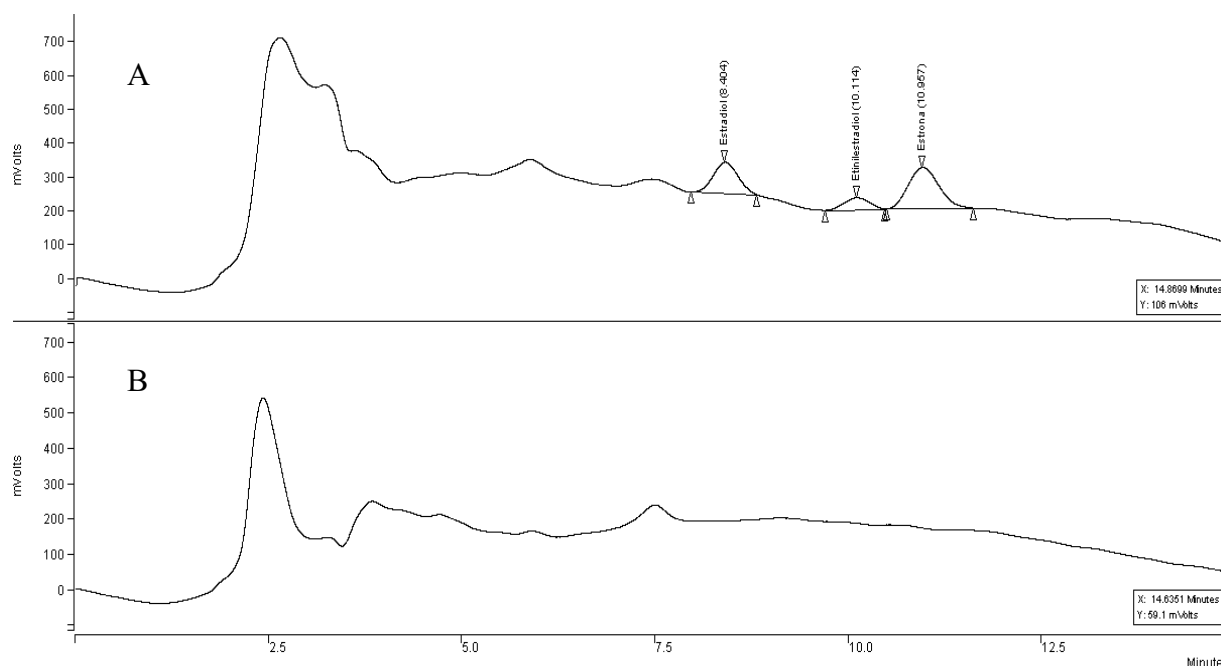


FIGURA 35 - Cromatogramas HPLC/FLU. (A) amostra de esgoto tratado fortificada com 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e estrona (B) amostra testemunha esgoto tratado sem fortificação; Condições de extração por SPE e de análise como descritas no texto. Estradiol, 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol, 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$.

As recuperações obtidas estão condizentes com as encontradas na literatura, como pode ser visto na Tabela 30.

Ternes et al. (1999), utilizaram dois tipos de SPE na extração uma fase denominada Lichrolut-EN (0,10 g) e uma fase reversa RP-C18 (0,25 g) condicionando-as com hexano (3 x 2 mL), acetona (1 x 2 mL) e metanol (3 x 2 mL), além de uma etapa de limpeza utilizando sílica gel. A eluição foi feita com 1 mL de acetona.

Baronti et al. (2000), utilizou como SPE cartuchos contendo Carboglyph (0,5), essa fase foi condicionada com 5 mL de metanol, 20 mL de água acidificada com HCl (pH 2) e 5 mL de água destilada. A eluição foi feita com 12 mL de uma mistura diclorometano/metanol (80:20, v/v).

Lopes (2007) utilizou a menor concentração na recuperação do 17 β -estradiol e a maior concentração para a estrona, esta diferença está relacionada com a capacidade de detecção do fluorescência para essas duas substâncias, o 17 β -estradiol possui uma capacidade de ser detectado até 10 vezes mais que a estrona.

TABELA 30 – Recuperação (%) dos estrógenos estudados, segundo trabalhos da literatura. Dados obtidos para amostras enriquecidas com os analitos.

Estrógenos	Água subterrânea	Água superficial	Esgoto tratado	Concentração na amostra fortificada	Referência
E1	90 ± 2	-	86		
E2	77 ± 14	-	76	50 ng L ⁻¹	Ternes et al (1999)
EE2	85 ± 0	-	76		
E1	-	89 ± 3	88 ± 3		
E2	-	88 ± 5	86 ± 5	10 ng L ⁻¹	Baronti et al (2000)
EE2	-	87 ± 5	84 ± 6		
E1	-	99 ± 4	89 ± 5		
E2	-	96 ± 6	95 ± 4	100 ng L ⁻¹	Laganá et al (2004)
EE2	-	100 ± 3	96 ± 8		
E1	-	-	79,7 ± 5,1		
E2	-	-	90,8 ± 10,8	10 ng L ⁻¹	Salvador et al (2005)
EE2	-	-	95,3 ± 4,6		
E1	90 ± 7			10 ng L ⁻¹	Trenholm et al (2006)
E2	92 ± 14				
EE2	92 ± 11				
E1	-	98 ± 2			
E2	-	97 ± 4		50 ng L ⁻¹	Labadie & Nebudzinski (2007)
EE2	-	74 ± 4			
E1	-	85 ± 18		600 ng. L ⁻¹	
E2	-	128 ± 8		7 ng L ⁻¹	Lopes, (2007)
E1	80 ± 2	95 ± 11	95 ± 10	0,5, / 5,0 / 10 µg L⁻¹	
E2	87 ± 7	117 ± 10	106 ± 10	6,25 / 25 / 100 ng L⁻¹	Este trabalho*
EE2	93 ± 3	118 ± 11	134 ± 13	6,25 / 25 / 100 ng L⁻¹	

E1 – estrona; E2 – 17 β-estradiol; EE2 – 17 α-etimilestradiol

* recuperação reportada para o menor nível de fortificação

Laganá et al. (2004), foram os únicos que realizaram um procedimento de extração utilizando um cartucho de SPE Oasis-HLB, condicionando com 10 mL de diclorometano:metanol (50:50, v/v), 5 mL de metanol e 10 mL de água a eluição foi realizada com diclorometano/metanol (50:50, v/v).

Diferentes formas de extração obtiveram resultados semelhantes ao obtidos neste trabalho. Os resultados são suficientes para se considerar o método com exatidão adequado à finalidade a que se propõe. Uma única ressalva é feita para o 17 α -etinilestradiol em esgoto tratado, onde se considera que a menor concentração avaliada não está adequada para a quantificação.

Para a avaliação da precisão, considera-se como critério, a obtenção de coeficientes de variação (CVs) nos ensaios de recuperação adequados quando menores ou iguais a 20 % (RIBANI et al. 2004). A precisão para todas as amostras enriquecidas atenderam este parâmetro. Para os ensaios efetuados, de acordo com os CV obtidos o método foi considerado como tendo uma precisão satisfatória, pois atingiram as recomendações exigidas pelo INMETRO (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2003) e pela ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

Em seguida foram calculados os Limites de Quantificação do método, os quais são apresentados na Tabela 31.

TABELA 31 - Limite de quantificação (LQ) determinado experimentalmente para os hormônios no método proposto para água subterrânea, superficial e esgoto tratado

Hormônios	Limites de Quantificação		
	Água de subterrânea	Água de superficial	Esgoto Tratado
Estrona	0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$
17 β -estradiol	6,25 ng L^{-1}	6,25 ng L^{-1}	6,25 ng L^{-1}
17 α -etinilestradiol	6,25 ng L^{-1}	6,25 ng L^{-1}	25 ng L^{-1}

Para a 17 α -etinilestradiol, não foi possível relacionar diretamente os limites do método em esgoto tratado com os limites experimentais obtidos para o equipamento expressos na Tabela 26, devido a recuperação acima de 130% obtida no nível de fortificação inferior, 6,25 ng L^{-1} . Para este caso, foi considerado como limite de

quantificação do método, a menor concentração onde a recuperação esteve acima de 70 % e abaixo de 120%, ou seja, 25 ng L⁻¹.

Alguns hormônios sintéticos podem provocar efeitos biológicos na ordem de 1 ng L⁻¹ (BAREL-COHEN et al., 2006). Segner et al (2003) em um estudo de multi-geração definiu que o 17 α -etinilestradiol possui efeito biológico em uma concentração de 1,54 ng L⁻¹, mesmo o limite de detecção obtido estar acima desse valor, este método consegue detectar o 17 α -etinilestradiol em concentrações menores do que os métodos que utilizam fluorescência encontrado na literatura (Tabela 23).

Os limites de quantificação se encontram próximo da menor concentração que apresentam efeito biológico (peixes e plantas) para estrona e 17 β -estradiol, a qual consiste em 10 ng L⁻¹ (BAREL-COHEN et al., 2006). O LQ de 0,5 μ g L⁻¹ da estrona apresentou se acima do valor obtido para o 17 β -estradiol devido à limitação da sensibilidade do detector à estrona, que apresenta menor fluorescência.

4.4 CONCLUSÕES

O sistema HPLC/Flu apresentou um excelente intervalo de trabalho. A utilização de eluição no modo gradiente com vazão de 1 mL min⁻¹ de acetonitrila/água, injeção de 30 μ L e detecção com 230 x 306 nm mostrou-se como uma condição ótima. A coluna de C18 (25 cm; 4,6 mm; 5 mm de diâmetro de partícula) apresentou boa seletividade.

O método validado para as diferentes matrizes (água subterrânea, superficial e esgoto tratado) apresentaram exatidão (recuperação > 70%) e precisão (CV < 13%) comparáveis aos descritos na literatura para os analitos e matrizes estudados. Os limites de quantificação obtidos para estradiol e etinilestradiol (6,25 ng L⁻¹) e estrona (0,5 μ g L⁻¹) são compatíveis com os apresentados por outros autores. Salienta-se que na literatura os métodos descritos que utilizam HPLC/Fluorescência obtiveram limites de quantificação menores do os deste trabalho. Técnicas como GC/MS/MS utilizada para análise de estrógenos demandam da necessidade de derivação da amostra, ou o uso de equipamento de custo muito mais elevado como o LC/MS/MS. Desta maneira, o método proposto e validado neste trabalho representa um avanço analítico por permitir a análise em baixas concentrações com seletividade e sensibilidade compatíveis com os estudos ambientais e representar análises mais econômicas e rápidas.

CAPITULO 5 - ESTUDO AMBIENTAL

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

A microrregião de Campo Grande fica situada sobre um planalto, é a de maior densidade populacional do Estado de Mato Grosso do Sul com 94,5 hab./km², possui uma área de 28.351,95 km². A cidade de Campo Grande segundo dados do IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2008), possui uma população de aproximadamente 724.524 habitantes, o que representa aproximadamente 92% da população da microrregião. A Figura 36 mostra a localização geográfica da cidade de Campo Grande.



FIGURA 36 - Localização Geográfica do Município de Campo Grande (POPPI & SANTIAGO-SILVA, 2005).

A região de Campo Grande está situada sobre o Aquífero Guarani sendo que nesta região encontra-se uma das áreas de recarga do aquífero, os rios que abastecem a cidade têm suas nascentes sobre essa região. O sistema Aquífero Guarani têm posição de destaque. Ele constitui uma das maiores reservas subterrâneas de água doce do planeta, ocupando uma área total de 1,2 milhões de km² nas Bacias Sedimentares do Paraná e Chaco-Paraná. Estende-se pelos territórios do Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina. Aproximadamente 2/3 de sua área de ocorrência situam-se na porção brasileira, abrangendo partes dos Estados de Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Figura 37). As faixas de afloramento e áreas

adjacentes, por não serem protegidas por lavas de basalto praticamente impermeáveis, apresentam elevada vulnerabilidade à poluição.



FIGURA 37 - Mapa hidrogeológico do Aquífero Guarani (CETESB, 2005).

O município de Campo Grande possui duas modalidades de produção animal que merecem destaque pela quantidade de poluentes que podem gerar e pelo risco de contaminação que podem representar: a de bovinos com mais de 660 mil cabeças e a de aves com mais de 640 mil cabeças (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2008).

Inúmeros fármacos veterinários são utilizados na pecuária do estado, entre os principais destacam-se as TCs, não se tem estudos recentes sobre a quantidade e quais são as mais utilizadas, um estudo da EMBRAPA (Empresa brasileira de pesquisa agropecuária) de 1984, utilizando questionários, determinou que 82,75% dos criadores de gado utilizam tetraciclina tradicional e 1,72% utilizam oxitetraciclina que possui longa ação no combate a Anaplasmosse bovina (anaplasmosse: doença parasitária infecciosa que acomete bovinos) (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2008). No entanto, existem poucos estudos relativos a biotransformação destes medicamentos e ao gerenciamento dos resíduos gerados por essas criações. O manejo mais utilizado na criação destes animais é o confinamento, o que acarreta em um grande número de animais concentrado em um espaço restrito e gerando uma grande quantidade de dejetos, que por não serem submetidos a tratamento e destinação adequados podem atuar como potenciais contaminantes ambientais. Por outro lado, o tratamento de esgoto da cidade, que é do tipo secundário, atinge apenas 18% dos domicílios.

5.2 ABASTECIMENTO DE ÁGUA EM CAMPO GRANDE (MS)

A captação, tratamento e distribuição de água para a população é de responsabilidade da empresa Águas Guariroba S/A.

5.2.1 Captação

O sistema de abastecimento de água de Campo Grande é constituído por unidades de captação, adução, tratamento, reservação e distribuição. A captação de água para abastecimento público é efetuada em mananciais superficiais e subterrâneos.

Os pontos de captação superficiais encontram-se nos rios: Guariroba, Lajeado e Desbarrancado, que representam 60% do abastecimento da cidade de Campo Grande, sendo a do córrego Guariroba a principal delas. A bacia do Guariroba ocupa uma área de 389 km². O lago da represa do Guariroba possui um volume de 3,7 milhões m³ e tem uma área de aproximadamente 850.000 m² (ÁGUAS GUARIROBA, 2008).

As captações subterrâneas (poços) são responsáveis por 40% do total da água que abastece o município. Atualmente existem cerca de 88 poços em operação, sendo que deste, 78 poços estão perfurados entre 80 á 150 metros e 10 poços captam água do aquífero Guarani ou Botucatu estes estão a uma profundidade maior do que 500 metros (ÁGUAS GUARIROBA, 2008). As águas dos poços não são misturadas com as dos rios, como tratamento essas águas recebem a adição de cloro através de bombas mecânicas e são canalizadas direta para consumo.

5.3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de hormônios (estrona, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol) e de antibióticos (oxitetraciclina, tetraciclina, clorotetraciclina e doxiciclina) em amostras de esgoto tratado, água superficial e subterrânea da região de Campo Grande (MS).

5.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS AMBIENTAIS DESTE ESTUDO

As amostras de água superficial foram coletadas nos rios (Lageado e Guariroba) que abastecem a cidade, em locais que estão antes dos pontos da captação da ETA e situados dentro de propriedades privadas do município de Campo Grande(MS).

As terras em torno do rio Lageado são basicamente utilizadas para pequenos cultivos e por pequenas criações de gado na forma extensiva, enquanto que na região do rio Guariroba, as terras são basicamente utilizadas para agricultura.

As amostras de água subterrânea foram obtidas de um poço artesiano, 85 metros de profundidade, dentro da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). O esgoto tratado também foi coletado na estação de tratamento da UFMS, o processo de tratamento seria semelhante ao do município, mas a estação trabalha em condições precárias e é feita apenas a retirada de materiais sólidos (gradeamento). Esta ETE trata o esgoto de todo o campus da universidade incluindo o do Hospital Universitário. O campus possui aproximadamente 7000 estudantes. A Figura 38 ilustra o local onde se localiza o poço artesiano e a ETE.



FIGURA 38 - Localização do poço artesiano e da ETE em Campo Grande-MS.

O plano amostral incluiu a coleta de amostras nestes pontos por seis meses (julho a dezembro de 2007), que compreendem os períodos de seca e chuva na região, as coletas eram realizadas no início do mês entre os dias dois e seis de cada mês, o horário de coleta foi fixado entre 9-10h.

No ponto de coleta o rio Guariroba media cerca de 6 m. de largura por 2,5 m de profundidade. Já o rio Lageado apresenta-se como um pequeno riacho medindo 1,5 m de largura com 60 cm de profundidade, no ponto de coleta. Para cada ponto foram tomados 4 L de amostra em frasco de vidro âmbar, previamente lavado para prevenir contaminação.

As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo não reciclável até o laboratório da UFMS. Uma vez no laboratório as amostras foram armazenadas sob refrigeração (10 °C) até o momento da análise. Todas as amostras foram processadas em intervalo menor que 12 horas da coleta. Os pontos de coleta estão ilustrados na Figura 39.



FIGURA 39 - Localização das represas dos rios Lageado e Guariroba que abastecem a cidade de Campo Grande(MS). Fonte: Google Earth (2008)a.

A Figura 40 mostra a represa formada pelo rio Guariroba e a Figura 41 mostra o leito do rio onde foi realizada a coleta, esta represa está localizada a 37 km da área urbana da cidade de Campo Grande (MS) em sua volta as terras são utilizadas para agricultura, neste ponto é feita apenas a captação da água, a canalização conduz á água para a ETA que está localizada dentro do perímetro urbano do município.



FIGURA 40 - Ponto de coleta: represa do rio Guararioba. Fonte: Google Earth (2008)b.

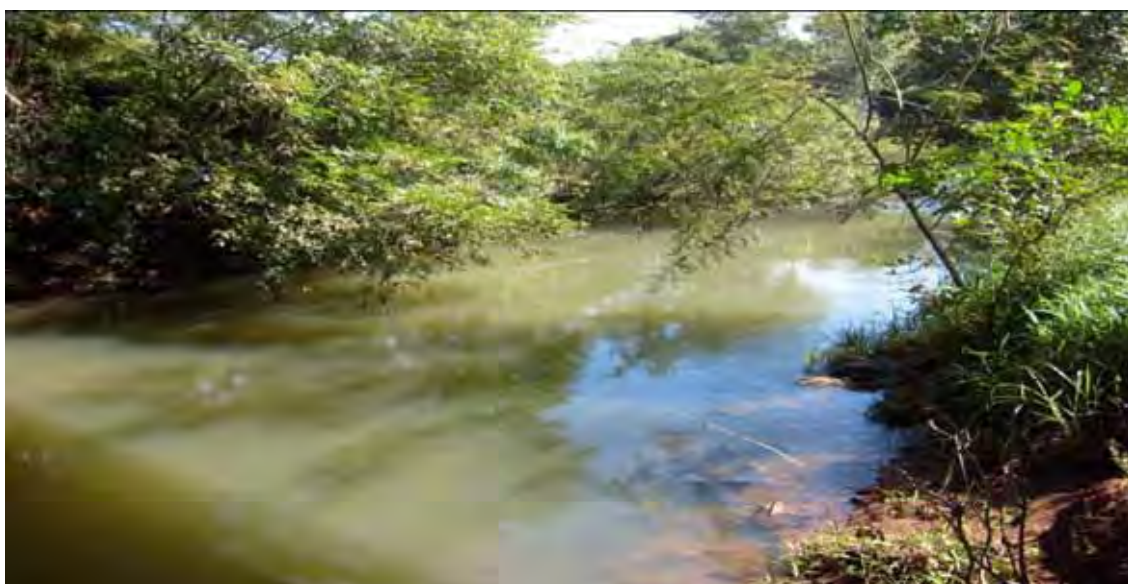


FIGURA 41 - Ponto de coleta no rio Guararioba.

A Figura 42 mostra a represa formada pelo rio Lageado, esta represa está localizada ao lado do perímetro urbano da cidade neste ponto também é feita apenas a captação da água, a canalização conduz á água para a mesma ETA que trata a água do rio Guararioba, em torno da represa as terras são utilizadas para pequenos cultivos, milho e feijão, e para uma pequena criação de gado na forma extensiva. A Figura 43 mostra o leito do rio onde foi realizada a coleta.



FIGURA 42 - Ponto de coleta: represa do rio Lageado. Fonte: Google Earth (2008)c.



FIGURA 43 - Ponto de coleta no rio Lageado.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos durante o período deste estudo estão sumarizados na Tabela 32.

Os estrógenos foram detectados nas amostras de esgoto tratado e água superficial dos rios Lageado e Guariroba, porém abaixo do limite de quantificação do método, denotando uma pequena contaminação.

TABELA 32 – Resultados das análises das análises de Estrógenos e Tetraciclinas obtidas neste estudo para os rios Lageado e Guariroba que abastecem o município de Campo Grande-MS, esgoto tratado e água subterrânea

Meses de 2007	Estrógenos									Tetraciclinas													
	E1			E2			EE2			OTC			TC			CTC			DC				
	Lag	Gua	Esg	Lag	Gua	Esg	Lag	Gua	Esg	Lag	Gua	Sub	Lag	Gua	Sub	Lag	Gua	Sub	Lag	Gua	Sub		
Julho	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	
Agosto	n.d	n.d	<LQ	n.d	<LQ	<LQ	n.d	n.d	<LQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Setembro	n.d	<LQ	<LQ	n.d	n.d	<LQ	n.d	n.d	<LQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Outubro	<LQ	n.d	<LQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Novembro	n.d	n.d	<LQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Dezembro	n.d	n.d	<LQ	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

Lag – Lageado; Gua – Guariroba; Esg – Esgoto; Sub – Água Subterrânea;

n.d – não detectado (LD : E1 - 0,25 µg L⁻¹; E2 e EE2 – 3 ng L⁻¹; OTC e TC – 1,5 ng L⁻¹; CTC e DC – 4,5 ng L⁻¹);

<LQ – menor que o Limite de Quantificação do método (LQ: E1 - 0,5 µg L⁻¹; E2 e EE2 – 6,25 ng L⁻¹; OTC – 12,5 ng L⁻¹; TC – 6,5 ng L⁻¹; CTC e DC – 15 ng L⁻¹).

De agosto a dezembro a estrona foi detectada em todas as amostras de esgoto tratado, sempre abaixo do limite de quantificação. As amostras de esgoto foram filtradas em membrana de 0,45 μm de poro para eliminar o material particulado antes da análise. Como esses estrógenos tende a ficar adsorvidos às partículas sólidas devido aos altos valores de K_{ow} , este pode ser um fator importante para diminuir a concentração deste hormônio no meio. Este fato pôde ser comprovado por um estudo de sorção e mobilidade desses hormônios em sedimento orgânico, foi observado que quando há um aumento da matéria orgânica ocorre um aumento da sorção e uma diminuição da mobilidade dos hormônios, constituindo um mecanismo hidrofóbico (LEE et al., 2003), isto implica dizer que quanto maior a quantidade de matéria orgânica existente no meio menor a concentração dos hormônios em água.

No rio Guariroba foi detectada a presença de estrona, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol nos meses de agosto e setembro que corresponde ao período de seca da região, enquanto que no rio Lageado apenas a estrona foi detectada no mês de outubro. O rio Lageado está localizado mais próximo do perímetro urbano do que o rio Guariroba, esperava-se encontra hormônios como o 17 α -etinilestradiol que é tipicamente usado como contraceptivo. O município de Campo Grande não disponibiliza mapas hidrográficos da região para uma análise do comportamento da bacia.

A Tabela 33 mostra a quantidade de chuva no período de coleta no município de Campo Grande, pode se observa que de julho a setembro a quantidade de chuva foi pequena aumentando progressivamente até dezembro.

TABELA 33 – Temperaturas e pluviosidade no Município de Campo Grande, durante o período de coleta (Agritempo, 2008).

Meses (2007)	Temperatura Máxima (°C)	Temperatura Mínima (°C)	Pluviosidade (mm)
Julho	28,77	16,22	0,55
Agosto	28,43	15,42	0,55
Setembro	31,36	17,67	0,03
Outubro	32,39	20,34	0,73
Novembro	30,98	20,15	1,98
Dezembro	30,26	19,88	5,03

Por estes índices pode se dizer que a lixiviação não foi um fator significativo na contaminação dos rios, uma vez que foi detectada a presença de 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol nos meses de agosto e setembro, sendo os meses onde a quantidade de chuva foi menor.

Uma possível explicação para a presença dos hormônios no rio Guariroba seria a proximidade deste do distrito de Anhaduí que fica situado a 50 km da capital, a população é de cerca de 4000 habitantes e está localizada mais próximo do leito do rio, entre 7 e 10 km, o distrito não possui sistema de tratamento esgoto e o sistema de coleta de lixo é precário. Outra fonte de contaminação pode ser a sede de fazendas que estão localizadas próximas ao rio Guariroba se essas fazendas possuem sistemas de fossas sépticas ou se os esgotos gerados por elas são despejados no rio não se tem nenhuma informação.

As TCs não foram detectadas em nenhuma das amostras analisadas, como são muito solúveis em água provavelmente encontram-se presentes no meio, mas em concentrações inferiores aos limites de detecção. Verificou-se a presença de um número pequeno de animais a margem dos rios próxima aos pontos de coleta, mesmo sendo uma região de grandes criações, a área específica é utilizada mais para a agricultura. As pequenas criações existentes em torno do rio Lageado são de subsistência o que de certa forma justifica o resultado encontrado. Como não havia grande quantidade de produção animal em torno das represas de captação a contaminação por lixiviação não foi constatada.

Quando em baixa concentração as TCs poderiam estar complexadas a espécies inorgânicas e adsorvidas ao material particulado (KEMPER, 2008). Outro ponto importante é que as TCs ficam fortemente ligadas ao solo orgânico, devido a presença de cálcio que ocorrem em altas concentrações no solo, diminuindo sua solubilidade em água (SAMUELSEN et al., 1992). Um fator para diminuir a concentração de TCs no meio ambiente é a degradação, que pode ocorrer por atividade microbiana, reações enzimáticas ou pela transformação em outros compostos por hidrolização, descarboxilação e oxidação. A fotodegradação é uma das principais formas de degradação quando elas não estão protegidas da luz associadas ao barro ou lodo (SENGELØV et al., 2003).

Alguns trabalhos da literatura demonstram a presença dessas substâncias em amostras de água superficial, efluente de esgoto, água subterrânea e água potável, pesquisando regiões onde o risco de contaminação é evidente, ou seja, próximo a locais

de criação de animais em confinamento e de pontos de lançamento de esgoto tratado ou *in natura*.

A Agência de Pesquisa Geológica norteamericana realizou um estudo entre 1999 e 2001 em 139 rios em 30 Estados Americanos, em pontos onde havia potencial de contaminação por esgoto, resíduos de produção agrícola, agropecuária e residencial. Em rios que recebem efluentes de esgoto detectou-se a presença de estrona e 17 β -estradiol entre 7-10% das amostras de água, em concentrações de 93 a 112 ng L⁻¹ (KOLPIN et al., 2002). 17 β -estradiol, na concentração de 6 a 66 ng L⁻¹, foi encontrado em água subterrânea e 2,6 μ g L⁻¹ na saída do sistema de tratamento de água de Nevada (KEMPER et al., 2008). Nesta pesquisa mais de 70 fármacos com atividade biológica foram encontradas em concentrações na ordem de μ g L⁻¹ em efluente de estação de tratamento de esgoto, água superficial, água subterrânea e água potável (HEBERER, 2002).

O estudo mostrou a presença de uma alta concentração de tetraciclina e oxitetraciclina, 4 e 1,2 μ g L⁻¹ respectivamente, em esgoto não tratado (HEBERER, 2002). Neste mesmo estudo, em 144 de amostras de água, tetraciclina e sulfonamidas foram encontradas em 9 locais em concentração que variam de 0,07 a 15 μ g L⁻¹ sendo a maioria em água superficial. Em água subterrânea obtida em Washington foram encontradas tetraciclina e sulfonamidas. Neste estudo a clorotetraciclina foi detectada em água superficial em uma concentração de 0,15 μ g L⁻¹ e da família das tetraciclina a oxitetraciclina foi a que esteve presente em um maior número de amostras. (KOLPIN et al., 2002). Granados et al. (2005) e Chico et al. (2008), analisaram águas dos rios Ter, Cinca e Noguera Ribagorçana na Bacia do mar Mediterrâneo, Granados et al. (2005) também analisou água do mar Mediterrâneo coletada próximo a Barcelona, em nenhuma dessas amostras foram encontradas Tetraciclina.

Em estudos realizados no Brasil, Ghiselli (2006) encontrou 4,8 μ g L⁻¹ de estrona e 6,7 μ g L⁻¹ de estradiol no rio Atibaia, responsável por 95% do abastecimento do município de Campinas-SP. Raimundo (2007) analisou 34 amostras de 10 pontos diferentes do rio Atibaia e de seus afluentes em 94% delas foram encontradas substâncias consideradas AE, o 17 β -estradiol foi encontrado em 35% das amostras analisadas em concentrações entre 106 e 6.806 ng L⁻¹ enquanto que o 17 α -etinilestradiol foi encontrado em apenas 5 amostras em concentrações de 106 a 4.390 ng L⁻¹. Estrona não foi detectada acima do seu limite de detecção que foi de 16 ng L⁻¹.

Lopes (2007) realizou um estudo em vários pontos do córrego Rico que abastece o município de Jaboticabal-SP, na nascente do rio foi detectada a presença de estrona na concentração de $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ e 17β -estradiol na concentração de 16 a $30,6 \text{ ng L}^{-1}$. Esta região já tinha sido utilizada para criação de gado, no entanto, no período em questão (2006), quando foi realizada essa amostragem, houve a implantação de horticultura em área próxima à nascente que foi acompanhada da utilização de resíduos animais como fertilizante. Essa coleta foi realizada durante o período chuvoso da região, por esse motivo essa contaminação é atribuída ao escoamento superficial da área de produção. Lopes (2007) também encontrou $6,8 \text{ ng L}^{-1}$ de 17β -estradiol na água potável distribuída no município, o que evidencia que o sistema de tratamento de água não foi eficiente para remoção desta substância.

5.6 CONCLUSÃO

Os estrógenos estiveram presentes em várias amostras coletadas, porém abaixo do limite de quantificação do método, denotando uma pequena contaminação. De agosto a dezembro a estrona foi detectada em todas as amostras de esgoto tratado. No rio Guariroba foi detectada a presença de estrona, 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol em suas águas nos meses de agosto e setembro, enquanto que no rio Lageado apenas a estrona foi detectada no mês de outubro. Em todos os casos para o 17β -estradiol as concentrações detectadas estiveram abaixo do nível passível de exercer efeito biológico que é de 10 ng L^{-1} , para o 17α -etinilestradiol este nível é de $1,54 \text{ ng L}^{-1}$, este valor é menor que o LD do método, desta forma a presença dessa substância no meio pode estar afetando o meio onde foi detectada (BAREL-COHEN et al., 2006). As TCs não foram detectadas em nenhuma das amostras analisadas neste período o que pode ser um indicativo que a contaminação por excreta animal nos pontos de amostragem estudados é muito pequena ou que as TCs estejam associadas ao material particulado em suspensão ou ao sedimento.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1 DIFICULDADES ENCONTRADAS

A principal dificuldade encontrada durante o desenvolvimento deste trabalho consistiu-se na obtenção das amostras para validação do método e aplicação da metodologia, devido a não autorização para as coletas de amostras nas ETA e ETE do município de Campo Grande (MS). Por este motivo o plano amostral foi alterado, e as amostras coletadas em um ponto de cada rio, uma vez que as extensões dos rios ficavam dentro de propriedades privadas.

6.2 ESTUDOS FUTUROS

Apesar dos resultados obtidos apontarem para uma baixa contaminação nos pontos amostrados, seria imprescindível executar o plano amostral inicialmente elaborado, que incluía a amostragem na entrada e saída das ETE e ETA de Campo Grande (MS) e na rede de poços artesianos da cidade. Durante todo um ano para avaliar a contaminação, sua sazonalidade e inferir as possíveis fontes. Isso somente será possível se o governo do município entender os benefícios que tal estudo poderá trazer no sentido de diagnosticar a contaminação, se existente, e subsidiar medidas de minimização, ou erradicação da mesma.

Nos estudos futuros também deverá ser avaliada a ocorrência dos contaminantes enfocados neste trabalho nas matrizes sólidas associadas aos recursos hídricos (sedimento e material particulado em suspensão na coluna d'água) bem como em solo da região.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RE nº 899**, de 23 de maio de 2003. Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 03 nov. 2007.

AGRITEMPO, Sistema de monitoramento agrometeorológico, Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. **Mapas de monitoramento**. Disponível em: <http://www.agritempo.gov.br/modules.php?name=Mapas&estado=MS>: acesso em: 17 nov. 2008.

ÁGUAS GUARIROBA. **Saúde e qualidade de vida para Campo Grande**.

Disponível: em <<http://www.aguasguariroba.com.br/principal.php>>. Acesso em: 10 mar. 2008.

ALVES, C. et al. Exposição ambiental a interferentes endócrinos com atividade estrogênica e sua associação com distúrbios puberais em crianças. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, n. 5, p. 1005-1014, maio, 2007.

ANDERSON, C. R. et al. Complexities in tetracycline analysis chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. **Journal Chromatography A**, v.1075, p. 23-32, Apr. 2005.

ASSOCIAÇÃO GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS. **Manual de resíduos de pesticidas em alimentos**. São Paulo, 1998. p. 80-114.

ARIKAN, O. A. et al. Occurrence of antibiotics and hormones in a major agricultural watershed. **Desalination**, v. 226, p. 121-133, Jan. 2008.

BAREL-COHEN, K. et al. Monitoring of natural and synthetic hormones in a polluted river. **Journal of Environmental Management**, v. 78, n. 1, p. 16-23, Jan. 2006.

BARONTI, C. et al. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. **Environmental Science and Technology**, v. 34, n. 24, p. 5049-5066, Apr. 2000.

BATT, A. L. et al. Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges. **Environmental Pollution**, v. 142, n. 2, p. 295-302, July 2006.

BATT, A. L.; AGA, D. S. Simultaneous analysis of multiple classes of antibiotics by ion trap lc/ms/ms for assessing surface water and groundwater contamination. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 9, p. 2940-2945, Mar. 2005.

BECK, I-C. et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea. **Journal of Chromatography A**, v. 1090, n. 1-2, p. 98-106, Oct. 2005.

BELFROID, A. C. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. **The Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1-2, p. 101-108, Jan. 1999.

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

BJERSELIUS, R. et al. Male gold fish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17 β -Estradiol. **Aquatic Toxicology**, v. 53, n. 2, p. 139-152, Mar. 2001.

BJÖRKBLÖM, C. et al. Estrogen- and androgen-sensitive bioassays based on primary cell and tissue slice cultures from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 146, n. 3, p. 431-442, June 2007.

BOYD, G. R. et al. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. **The Science of the Total Environment**, v. 311, n. 1/3, p.135-149, Mar. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Aprova as normas e padrões sobre a fluoretação da água dos sistemas públicos de abastecimento, destinada ao consumo humano. Portaria n. 635/BSB, de 26 de dezembro de 1975. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 1455, 30 jan. 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Portaria n. 518**, de 25 março de 2004. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>>. Acesso em: 06 nov. 2006.

BRILLANTES, S. et al. Oxytetracycline residues in giant fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4995-4999, Sept. 2001.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-46, jan./dez. 2003.

BRUTON, L. L. et al. **Goodman e Gilman** – bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2007. p. 1056-1058.

CARGOUET, M. et al. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). **Science of the Total Environment**, v. 324, n 1-3, p. 55-66, May 2004.

CARPINTEIRO, J. et al. Applicability of solid-phase microextraction followed by on-fiber silylation for the determination of estrogens in water samples by gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1056, p. 179-185, July 2004.

CHEN, C-Y. et al. Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Science of the Total Environment**, v. 378, n. 3, p. 352-365, June 2007.

CHERLET, M. et al. Quantitative multi-residue analysis of tetracyclines and their 4-epimers in pig tissues by high-performance liquid chromatography combined with positive-ion electrospray ionization mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 492, n. 1-2, p. 199-213, Sept. 2003.

CHESHENKO, K. et al. Eggen Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 155, p. 31-62, Mar. 2008.

CHICO, J. et al. Restricted access materials for sample clean-up in the analysis of trace levels of tetracyclines by liquid chromatography. Application to food and environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1181, p. 1-8, Feb. 2008.

CHOI, K-J. et al., Determination of antibiotic compounds in water by on-line SPE-LC/MSD. **Chemosphere**, v. 66, p. 977-984, 2007.

CINQUINA, A. L. et al. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 227-233, n. 1-2, Feb. 2003.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Gestão Ambiental do Aquífero Guarani**. Disponível em: <http://www.ambiente.sp.gov.br/aquifero/aquifero_guarani.htm>. Acesso em: 20 set. 2005.

COUTO, C. M. C. M. et al. Complexação da tetraciclina, da oxitetraciclina e da clortetraciclina com o catião cobre (II). Estudo potenciométrico. **Química Nova**, v. 23, n. 4, jul./ago. 2000.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC recommendations 1995). **Analytica Chimica Acta**, v. 391, n. 2, p. 105-126, May 1999.

D'ASCENZO, G. et al. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. **The Science of the Total Environment**, v. 302, p. 199-209, Aug. 2003.

DESBROW, C. et al. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent.1. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening. **Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 11, p. 1549-1565, June 1998.

EURACHEM WORKING GROUP. **The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics**, 1998. Disponível em: <<http://www.eurachem.org/guides/valid.pdf>> . Acesso em: 10 de jan. 2008.

FURUICHTA, T. et al. Contribution of known endocrine disrupting substances to the estrogenic activity in Tama River water samples from Japan using instrumental analysis and *in vitro* reporter gene assay. **Water Research**, v. 38, p. 4491-4501, Jan. 2004.

GABET, V. et al. Analysis of estrogens in environmental matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1113-1131, Dec. 2007.

GENTILI, A. et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 7, p. 704-733, July/Aug. 2005.

GHISELLI, G. **Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP)**. 2006. 190 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

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

GIMENO, S. et al. Feminization of male carp. **Nature**, v. 384, n. 6606, p. 221-222, 1996.

GOOGLE EARTH. **Pointer 20°29'06.86" S 54°33'06.08' W elev 621 ft.** Disponível em: <<http://earth.google.com>>. Acesso em: 10 set. 2008a.

GOOGLE EARTH. **Pointer 20°31'05.85" S 54°15'04.32' W elev 499 ft.** Disponível em: <<http://earth.google.com>>. Acesso em: 10 set. 2008b.

GOOGLE EARTH. **Pointer 20°31'40.33" S 54°33'53.22' W elev 552 ft.** Disponível em: <<http://earth.google.com>>. Acesso em: 10 set. 2008c.

GRACE DAVISON DISCOVERY SCIENCES. **Properties of HPLC Columns.** Disponível em: <<http://www.discoverysciences.com/product.aspx?id=2604>>. Acesso em: 06 abr. 2008.

GRANADOS, M. et al. Determination of tetracyclines in water samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. **Chromatographia**, v. 61, n. 9/10, p. 471-477, May 2005.

HAMSCHER, G. et al. Antibiotics in dust originating from a pig-fattening farm: a new source of health hazard for farmers? **Environment Health Perspect**, v. 111, p. 1590-1594, June 2003.

HARRIS, D. C. A. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. p. 595-603.

HEBERER T. Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. **Toxicology Letters**, v. 131, p. 5-17, Jan. 2002.

HOLTHAUS, K. I. E. et al. The potencial for estradiol and ethinylestradiol to sorb to suspended and bed sediments in some English rivers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 2526-2535, May 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **IBGE Cidades**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>> . Acesso em: 10 mar. 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008**, 2003. Disponível em: <http://www.farmacia.ufmg.br/lato/downloads/validacao_inmetro.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2008.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Validation of analytical procedures: definitions and terminology, Q2A (CPMP/ICH/381/95)**. 1995. Disponível em: <<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ich/038195en.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2008.

IWAKI, K. et al. Determination of tetracycline antibiotics by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 623, n. 1, p. 153-158, Oct. 1992.

JACOBSEN, A. M. et al. Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1038, p. 157-170, Apr. 2004.

JEANNOT, R. et al. Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry. **Journal Chromatography A**, v.974, n. 1-2, p. 143-159, Oct. 2002.

JIN, L. et al. Ca^{2+} and Mg^{2+} bind tetracycline with distinct stoichiometries and linked deprotonation. **Biophysical Chemistry**, v. 128, p. 185-196, Apr. 2007.

JJEMBA, P. K. The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: a review. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 93, p. 267-278, Dec. 2002.

JOBLING, S. et al. Widespread sexual disruption in wild fish. **Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 17, p. 2498-2506, July 1998.

JOOSTEN, H. F. P. et al. Genotoxicity of hormonal steroids. **Toxicity Letters**, v. 151, n. 1, p. 113-134, Apr. 2004.

JØRGENSEN, S. E.; HALLING-SØRENSEN, B. Drugs in the environment. **Chemosphere**, v. 40, n. 7, p. 691-699, Apr. 2000.

JÜRGENS, M. D. et al. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 480-488, Aug. 2001.

KAALE, E. et al. Analysis of residual oxytetracycline in fresh milk using polymer reversed-phase column. **Food Chemistry**, v. 107 p. 1289-1293, Aug. 2008.

KARTHIKEYAN, F. G.; BLEAM, W. F. **DNR Project 163 Final Project Report**. Wisconsin Department of Natural Resources, Wisconsin Department of Agriculture, Trade and Consumer Protection. Wisconsin, Oct. 2003. Disponível em: <<http://www.dnr.state.wi.us/org/water/dwg/gw/research/reports/169.pdf>>. Acesso em: 28 fev. 2008.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial. **Environment Ecological Indicator**, v. 8, p.1-13, Jan. 2008.

KIM, S. et al. Removal of antibiotics in wastewater: effect of hydraulic and solid retention times on the fate of tetracycline in the activated sludge process. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 5816-5823, Aug. 2005.

KOLPIN, D. et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: a national reconnaissance. **Environmental Science & Technology**, v. 36, p. 1202-1211, Mar. 2002.

KOYUNCU, I. et al. Removal of hormones and antibiotics by nanofiltration membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 309, n. 1-2, p. 94-101, Feb. 2008.

KÜMMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 5-7, June 2003.

LA FARRÉ, M. et al. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography–mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. **Journal Chromatography A**, v. 938, p. 187-197, Dec. 2001.

LABADIE, P.; NEBUDZINSKI, H. Determination of steroidal hormone profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France). **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 14, June 2005.

LAGANÀ, A. et al. 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. 79-889, Jan. 2004.

LAI, K. M. et al. Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. **Environmental Science and Technology**, v. 34, n. 18, p. 3890-3894, Aug. 2000.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida**. São Carlos: Rima, 2004. p. 4-7.

LE CURIEUX-BELFOND, O. et al. Short-term bioaccumulation, circulation and metabolism of 17 β -estradiol in the oyster *Crassostrea gigas*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 325, n. 2, p. 125-133, Apr. 2005.

LEE, H. B.; LIU, D. Degradation of 17 β -estradiol and its metabolites by sewage bacteria. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 134, p. 351-366, Feb. 2002.

LEE, L. S. et al. Sorption and dissipations of testosterone, estrogens and their primary transformation products in soil and sediment. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 18, p. 4098-4105, Aug. 2003.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 4. ed. Campinas: Átomo, 2002. p. 21-31.

LENZ, G. **Métodos fotométricos, biofísica**. 1997. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/biofis/Bio10003/Metfoto.pdf>>. Acesso em: 14 mar. 2008.

LEUSCH, F. D. L. et al. Bioassay-derived androgenic and estrogenic activity in municipal sewage in Australia and New Zealand. **Science of The Total Environment**, v. 324, n. 1-3, p. 55-6625, May 2004.

LINDSEY, M. E. et al. Analysis of trace levels of sulfanamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 4640-4646, Aug. 2001.

LOPES, L. L. **Estudo sobre a ocorrência de estrógenos em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal - SP** . 2007. 122 f. Tese (Doutorado em Química)- Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

MAO, L. et al. Determination of environmental estrogens in human urine by high performance liquid chromatography after fluorescent derivatization with *p*-nitrobenzoyl chloride. **Analytica Chimica Acta**, v. 522, p. 241-246, Aug. 2004.

MARK, B. A. M. D.; PLUMER, A. **Bacterial resistance: the Ubiquitous Menace**. Disponível em: <http://www.revophth.com/index.asp?page=1_623.htm> Acesso em: 04 fev. 2008.

MARKMAN, S. et al. Endocrine disrupting chemicals accumulate in earthworms exposed to sewage effluent. **Chemosphere**, v. 70, p. 119-125, Aug. 2007.

MATSUMOTO, K. et al. Highly sensitive time-resolved fluorometric determination of estrogens by high-performance liquid chromatography using a β -diketonate europium chelate. **Journal of Chromatography, B**, v. 773, n. 2, p. 135-142, Mar. 2002.

MENDHAM, J. et al. **Vogel: análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 462 p.

METCALFE, C. D. et al. Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, p. 2881-2889, May 2003.

MIAO, X. S. et al. Analysis of acidic drugs in the effluents of sewage treatment plants using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal Chromatography A**, v. 952, p. 139-147, Jan. 2002.

MIZUGUCHI, T. et al. Contribution of glucuronic acid and sulfonic acid moieties during photocatalytic degradation of estrogen conjugates. **Journal of Health Science**, v. 51, n. 4, p. 447-452, May 2005.

MÜRMAN, L. SANTOS, M. C. CARDOSO, M. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of Salmonella isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. **Food Control**, v. 20, p. 191-195, April 2009.

MYLLYNIEMI, A. L. et al. Microbiological and chemical detection of incurred penicillin G, oxytetracycline, enrofloxacin and ciprofloxacin residues in bovine and porcine tissues. **Food Additives & Contaminants**, v. 17, p. 991-1000, Dec. 2000.

OKHO, Y. et al. 17 β -estradiol degradation by TiO₂ photocatalysis as a means of reducing estrogenic activity. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 19, p. 4175-4181. Aug. 2002

OLSEN, S. J. et al. A nosocomial outbreak of fluoroquinolone-resistant salmonella infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 21, p. 1572-1579, May 2001.

ORGANIZAÇÃO PARA A AGRICULTURA E A ALIMENTAÇÃO. **Industrial livestock production near cities often damages the environment**. Disponível em: <<http://www.fao.org/newsroom/en/news/2006/1000219/index.html>>. Acesso em: 4 fev. 2008.

PARSEKIAN, M. P. S. **Análise e proposta de formas de gerenciamento de estações de tratamento de águas de abastecimento completo em cidades de porte médio do Estado de São Paulo**. 1998. 183 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.

PENA, A. L. et al. Determination of tetracycline antibiotics in salmon muscle by liquid chromatography using post-column derivatization with fluorescence detection. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 5, p. 925-929, Sept. 2003.

PESEK, J. J.; MATYSKA, M. T. SPE adsorbents and formats. In: SIMPSON, N. J.

K. (Ed.). **Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications**. New York: Marcel Dekker, 2000. p. 19-37.

PETERSON, E. W. et al. 17 β -Estradiol as an indicator of animal waste contamination in mantled karst aquifers. **Journal of Environmental Quality**, v. 29, n. 3, p. 826-834, Apr. 2000.

PHENOMENEX, STRATA™ SPE (SOLID PHASE EXTRACTION). **Strata™ SPE method development**. Disponível em: <<http://www.phenomenex.it/prodotti/spe/zestra.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2008.

PAWLOWSKI, S. et al. 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, p.129-138, Aug. 2004.

POJANA, G. et al. Determination of natural and synthetic estrogenic compounds in coastal lagoon waters by hplc-electrospray mass spectrometry. **Journal Environmental Analytical Chemistry**, v. 84, n. 10, p. 717-727, Aug. 2004.

POPPI, N. R.; SANTIAGO-SILVA, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons and other selected organic compounds in ambient air of Campo Grande City, Brazil. **Atmospheric Environment**, v. 39, p. 2839-2850, Oct. 2005.

RAIMUNDO, C. C. M. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais a bacia do rio Atibaia**. 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

RAMOS, R. O. **Alterações ambientais do Rio Mogi Guaçu e reflexo nas variáveis reprodutivas e indução hormonal no curimatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836)**. 2002. 75 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2002.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2001. 703 p.

REINTHALER, F. F. et al. Antibiotic resistance of E. coli in sewage and sludge. **Water Research**, v. 37, n. 5, p. 1685-1690, June 2003.

REIS FILHO, R. W. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 817-822, abril, 2006.

RIBANI, M. et al. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, set./out. 2004.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S. et al. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1045, p. 85-92, June 2004.

ROUTLEDGE, E. W. et al. Identification of estrogenic chemicals in stw effluent. 2. *in vivo* responses in trout and roach. **Environmental Science and Technology**, v. 32, p.1559-1565, May 1998.

- RUELA, I. C. A. et al. Otimização e validação de método para determinação de resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p 139-146, jan./mar. 2005.
- SALVADOR, A. et al. On-line solid-phase extraction with on-support derivatization for high-sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry of estrogens in influent/effluent of wastewater treatment plants. **Journal of Chromatography A**, v. 1145, p. 102-109, Jan. 2007.
- SAMUELSEN, O. B. et al. Long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance towards oxytetracycline in a fish farm sediment after medication. **Science Total Environment**, v. 114, p. 25-36, Apr. 1992.
- SANDERSON, H. et al. Dissipation of oxytetracycline, chlortetracycline, tetracycline and doxycycline using HPLC–UV and LC/MS/MS under aquatic semi-field microcosm conditions. **Chemosphere**, v. 60, p. 619-629, Feb. 2005.
- SANTAMARTA, J. A ameaça dos disruptores endócrinos. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, v. 2, n. 3, p. 18-29, jul./set. 2001.
- SARMAH, A. K. et al. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, v. 65, p. 725-759, May 2006.
- SCHÄFER, A. I. et al. Removal of natural hormone estrone from aqueous solutions using nanofiltration and reverse osmosis. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 182-188, Nov. 2003.
- SCHWARTZ, T. et al. Detection of antibioticresistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 43, n. 3, p. 325-335, Apr. 2003.
- SEGNER, H. et al. Potencies of estrogenic compounds in *in vitro* screening assays and in life cycle tests with zebrafish *in vivo*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 54, n. 3. p. 315-322, Mar. 2003.
- SENGELØV, G. et al. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. **Environment International**, v. 28, p. 587-595, Jan. 2003.

SERVOS, M. R. et al. Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 336, p. 155-170, May 2005.

SEWELL, P. A.; CLARKE, B. **Chromatographic separations**. London: Thames Polytechnic, 1987. 562 p.

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.

SHELLY, D. C.; WARNER, I. M. Fluorescence detectors in high-performance liquid chromatography. In: VICKREY, T. (Ed.). **Liquid chromatography detectors**. New York: Marcel Dekker, 1983. p. 87-123.

SHORE, L. S. et al. Effects of estrone and 17 β -Estradiol on vegetative growth of *Medicago Sativa*. **Physiologia Plantarum**, v. 84, n. 2, p. 217-222, Feb. 1992.

SILVA, R. P. M. **Bioquímica do tecido animal**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em: <<http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/contaminantes.pdf>>. Acesso em: 16 set. 2007.

SIMPSON, N. J. K.; WELLS, M. J. M. Introduction to solid phase extraction. In: SIMPSON, N. J. K. (Ed.). **Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications**. New York: Marcel Dekker, 2000. p. 1-16.

SNYDER, S. A. et al. Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. **Environmental Science and Technology**, v. 33, p. 2814-2820, June 1999.

SODRÉ, F. F. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de campinas (SP, Brasil). **Journal of Brazilian Society Ecotoxicology**, v. 2, n. 2, p. 187-196, Apr.-Jun. 2007.

SOKOL, J.; MATISOVA, E. Determination of tetracycline antibiotics in animal tissues of food-producing animals by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 669, n. 1-2, May 1994.

SOLIMAN, M. A. et al. Rapid gas chromatography-mass spectrometry screening method form human pharmaceuticals, hormones, antioxidants and plasticizers in water. **Journal Chromatography A**, v. 1029, p. 223-237, Nov. 2004.

TAN, B. L. L. Comprehensive study of endocrine disrupting compounds using grab and passive sampling at selected wastewater treatment plants in South East Queensland, Australia. **Environment International**, v. 33, n. 5, p. 654-669, Feb. 2007.

TERNES, T. et al. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – II. Aerobic batch experiments with activated sludge. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 91-99, Jan. 1999.

TERNES, T. A. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 419-434, 2001.

THEIR, H. P.; ZEUMER, H. **Manual of pesticide analysis**. New York: Verlag Chemie, 1987. v.1, p. 37-44.

TRENHOLM, R. A. Broad range analysis of endocrine disruptors and pharmaceuticals using gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 65, p. 1990-1998, Sept. 2006.

VALENTE, A. L. P. et al. **Análise quantitativa por cromatografia**. Universidade Estadual de Campinas. Disponível em: <http://www.chemkeys.com/bra/md/mds_11/aqpc_5/extras/ancrom-vf.pdf>. Acesso em: 01 fev. 2006.

VIÑAS, P. et al. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the analysis of tetracycline residues in honey. **Journal of Chromatography A**, v. 1022, n. 1-2, p 125-129, Jan. 2004.

VOLKMANN, H. et al. Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 277-286, Oct. 2004.

VULLIET, E. et al. Analytical methods for the determination of selected steroid sex hormones and corticosteroids in wastewater. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 2143–215, Jan. 2007.

WALSH, J. R. et al. Determination of tetracyclines in bovine and porcine muscle by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 596, n. 2, p. 211-216, Dec. 1991.

WOLLENBERGER, L. et al. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 40, p. 723-730, Apr. 2000.

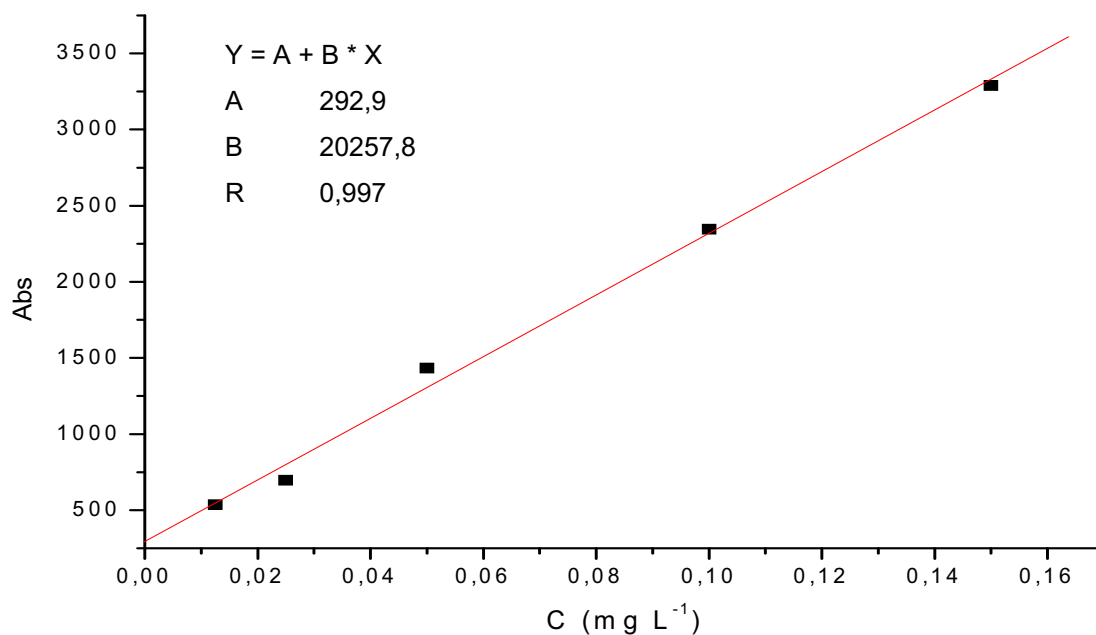
XIAO, X-Y. et al. Analysis of estrogens in river water and effluents using solid phase extraction and gas chromatography – negative chemical ionization mass spectrometry of pentafluorobenzoyl derivatives. **Journal of Chromatography A**, v. 963, n. 1, p. 195-204, May 2001.

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

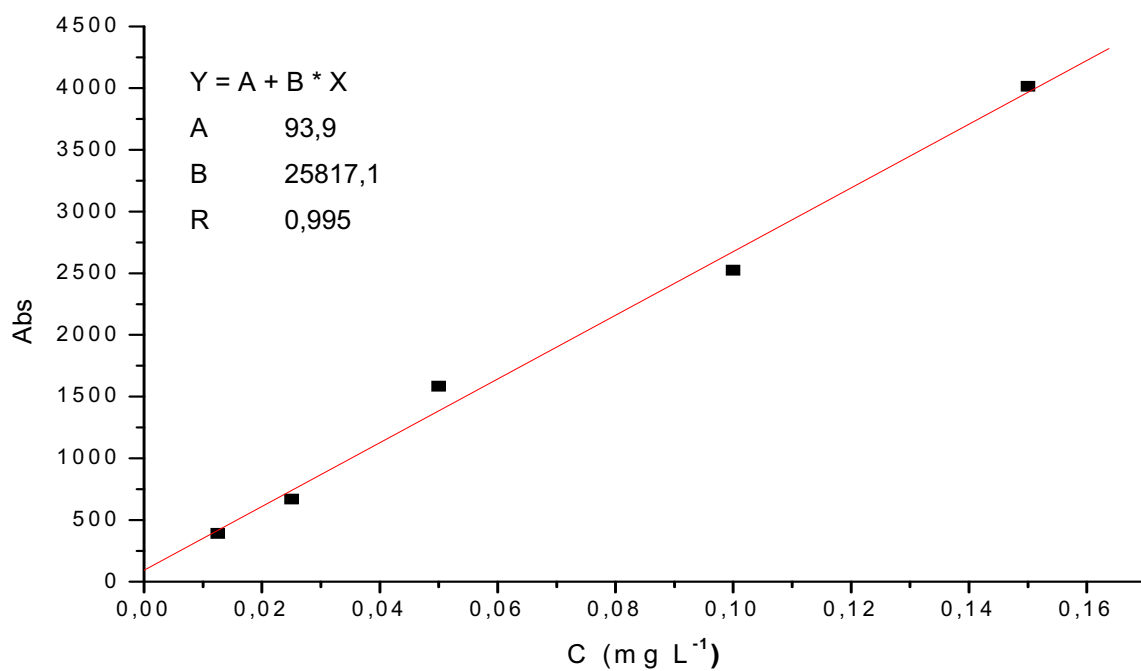
ZHANG, X. et al. Degradation of 17 α -ethinylestradiol in aqueous solution by ozonation. **Journal of Hazardous Materials B**, v. 133, p. 291-29, Jan. 2006.

ZHU, J. et al. Analysis of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal Chromatography A**, v. 928, p. 177-186, July 2001.

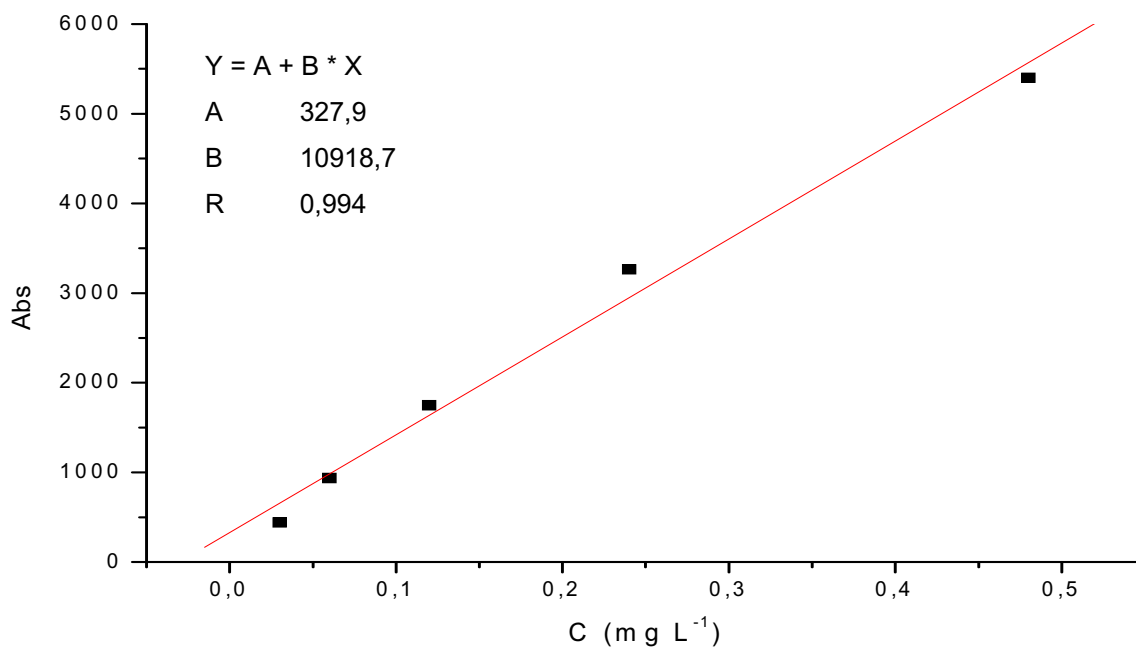
ANEXO 1 – CURVAS ANALÍTICAS PARA OS ANTIBIÓTICOS



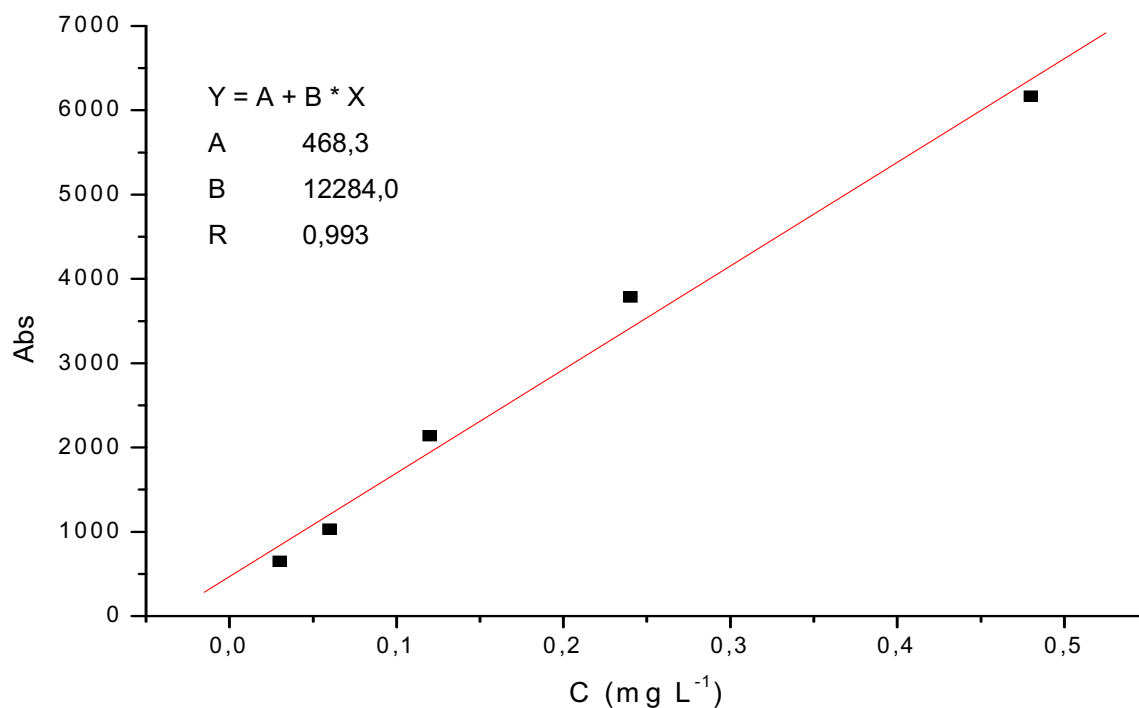
1- Curva analítica para a Oxitetraciclina obtida no modo de análise A, em ácido oxálico 0,01 mol L⁻¹.



2 - Curva analítica para a Tetraciclina obtida no modo de análise A, em ácido oxálico 0,01 mol L⁻¹

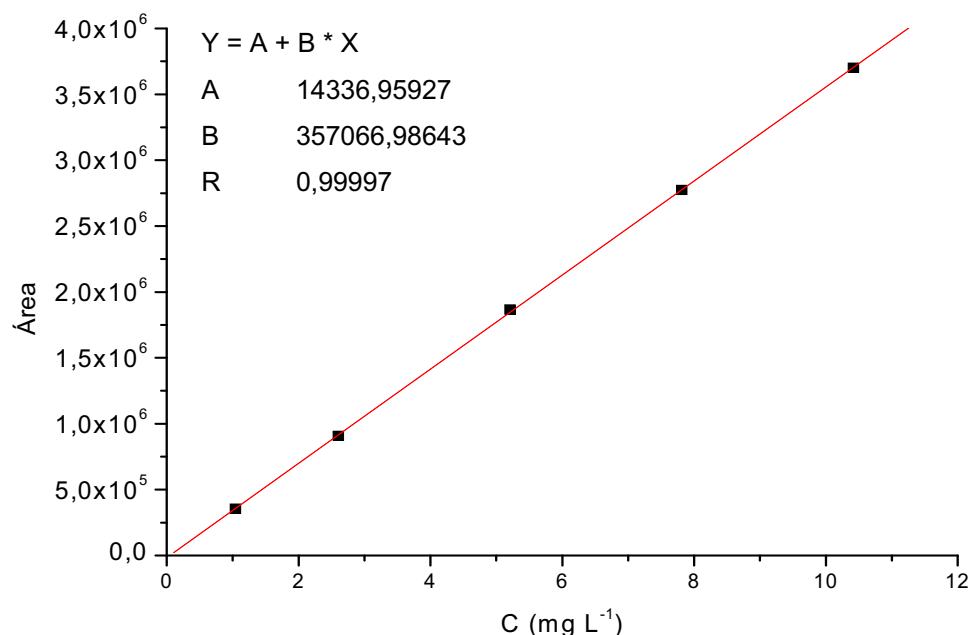


3 - Curva analítica para a Clorotetraciclina obtida no modo de análise A, em ácido oxálico 0,01 mol L⁻¹.

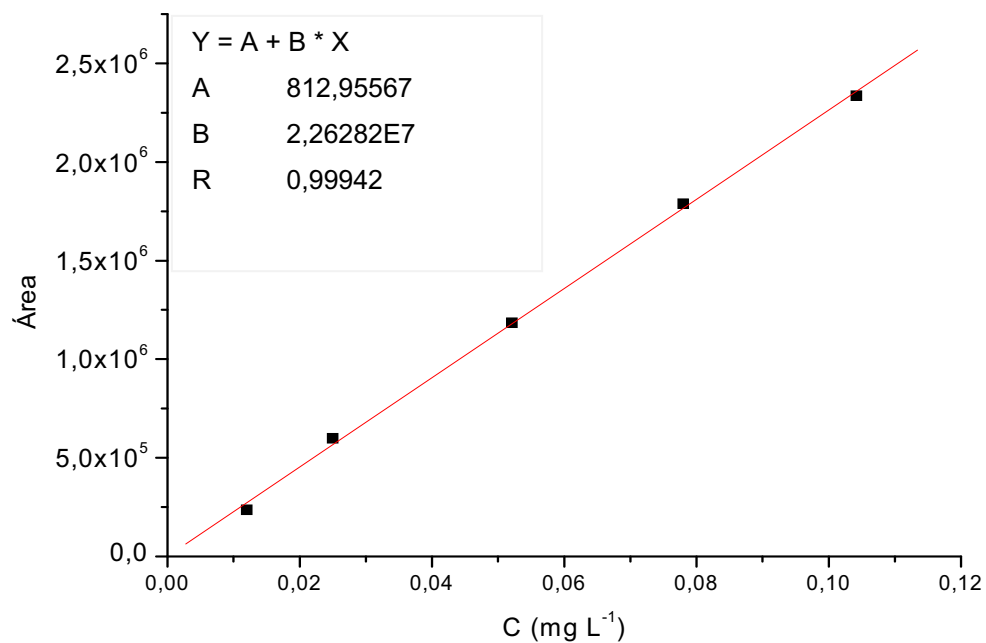


4 - Curva analítica para a Doxiciclina obtida no modo de análise A, em ácido oxálico 0,01 mol L⁻¹.

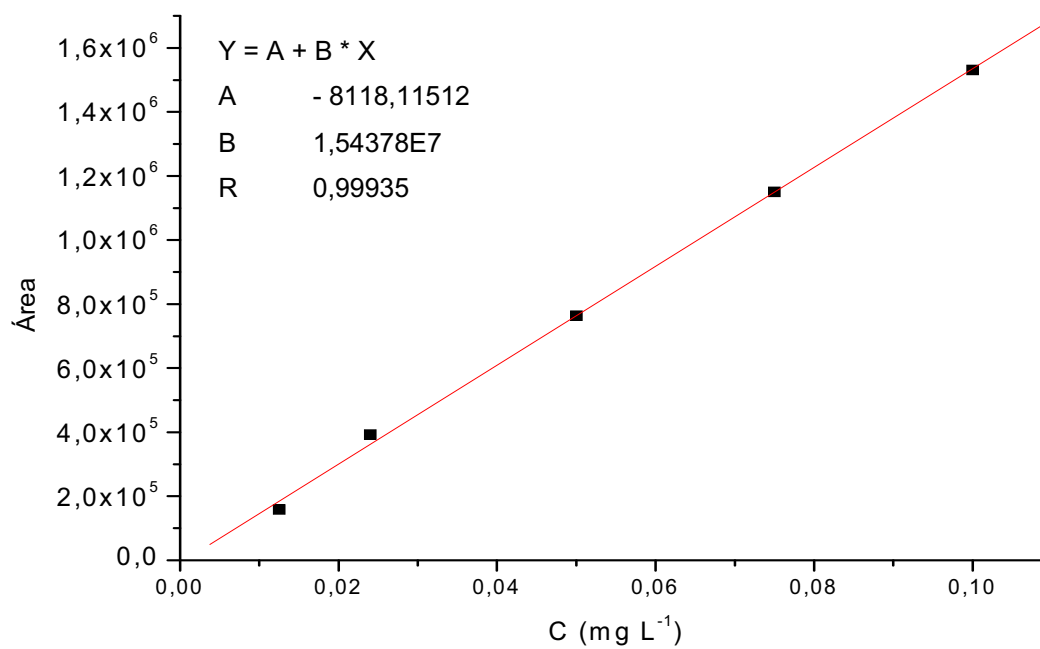
ANEXO 2 – CURVAS ANALÍTICAS PARA ESTRÓGENOS



1 - Curva analítica para a Estrona dissolvida em ACN, obtida no sistema HPLC/Flu no modo gradiente (ACN:H₂O)



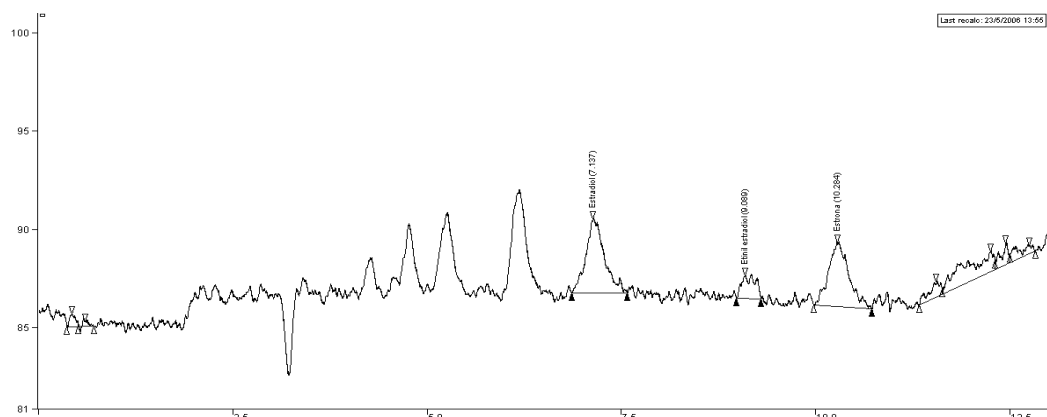
2 - Curva analítica para o 17 β -estradiol dissolvido em ACN, obtida no sistema HPLC/Flu no modo gradiente (ACN:H₂O)



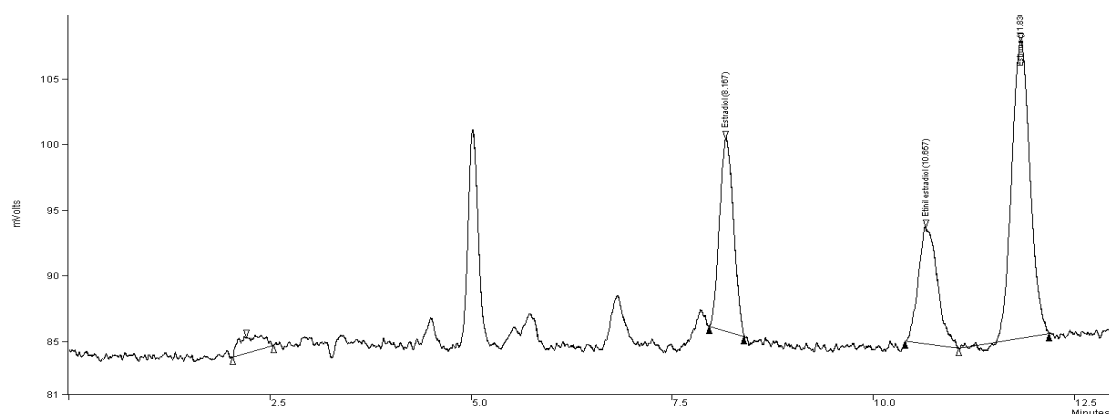
3 - Curva analítica para o 17 α -etinilestradiol dissolvido em ACN, obtida no sistema HPLC/Flu no modo gradiente (ACN:H₂O)

ANEXO 3 – CROMATOGRAMAS – RECUPERAÇÃO ESTRÓGENOS

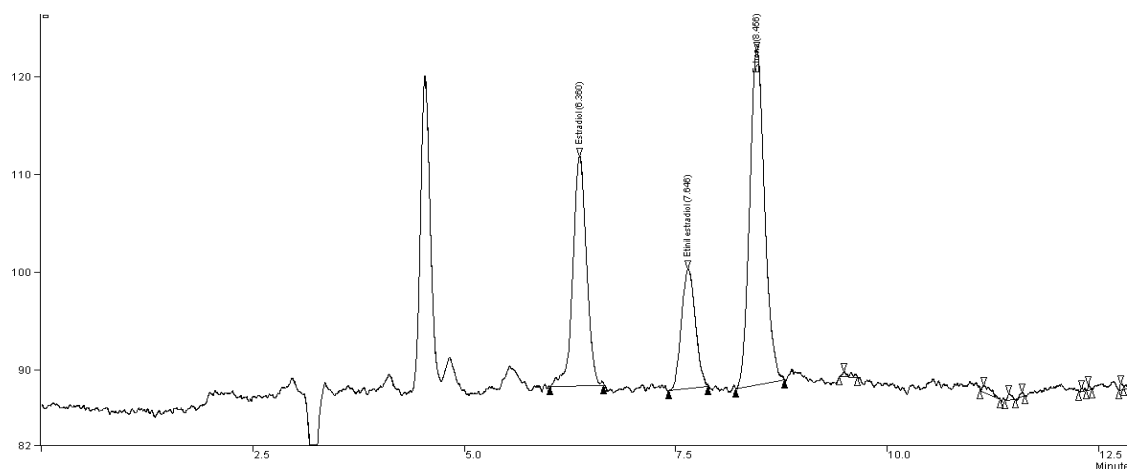
Cromatogramas da recuperação em Água Subterrânea



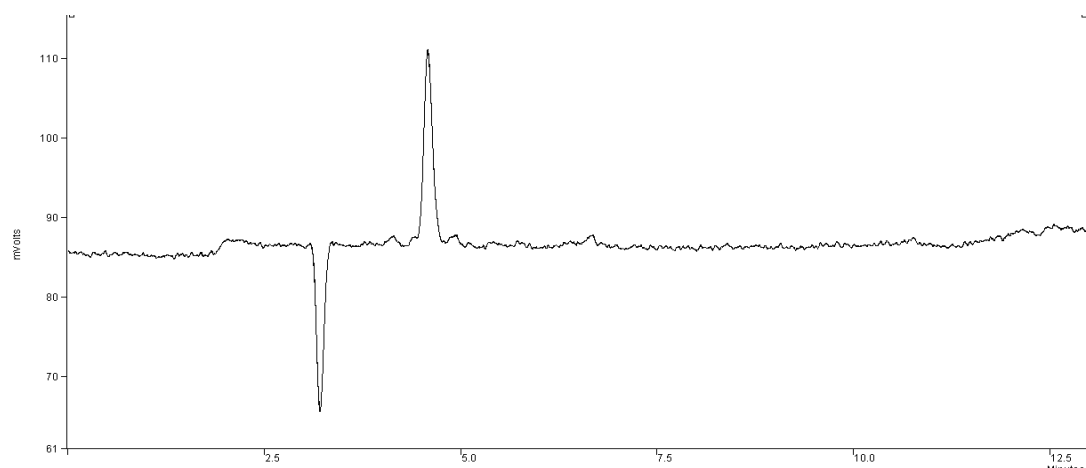
1 - Cromatograma HPLC/Flu da recuperação dos hormônios enriquecida com os analitos: E1 [0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$], E2 e EE2 [6,25 ng L^{-1}] – Nível baixo



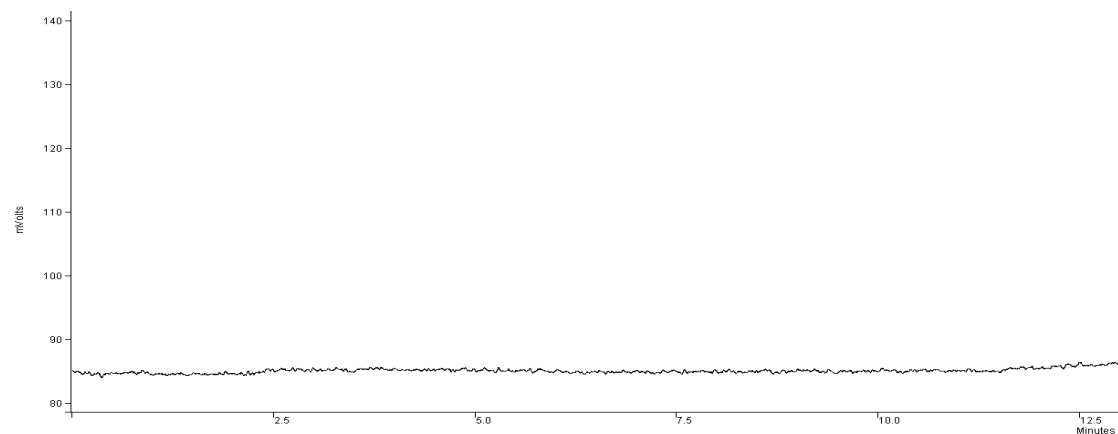
2 - Cromatograma HPLC/Flu da recuperação dos hormônios enriquecida com os analitos: E1 [2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$], E2 e EE2 [25 ng L^{-1}] - Nível médio



2 - Cromatograma HPLC/Flu da recuperação dos hormônios enriquecida com os analitos: E1[10 $\mu\text{g L}^{-1}$], E2 e EE2 [0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$] - Nível alto

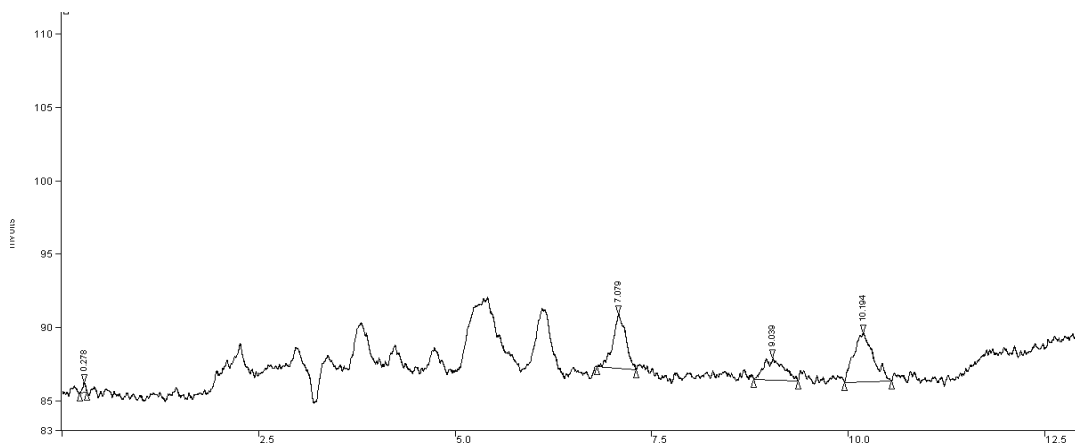


3 - Cromatograma HPLC/Flu da testemunha (matriz sem os analitos)

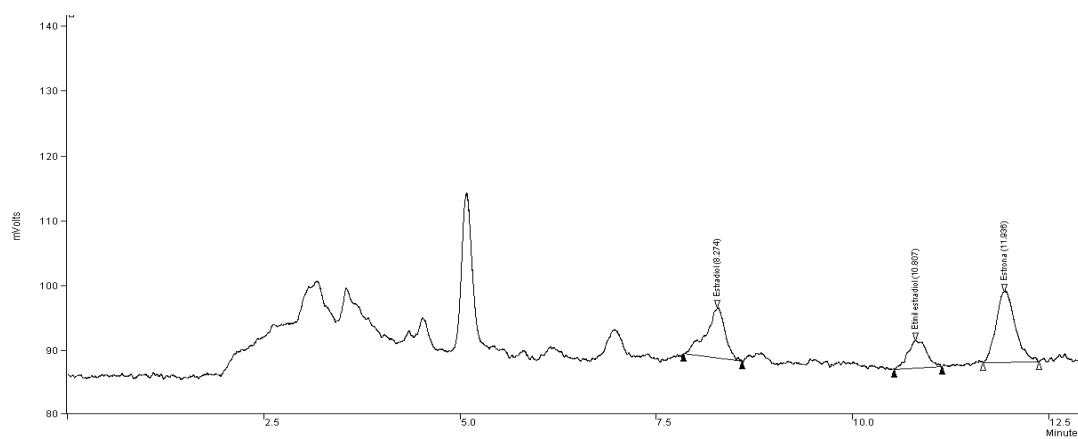


4 - Cromatograma HPLC/Flu do branco do cartucho utilizado na recuperação

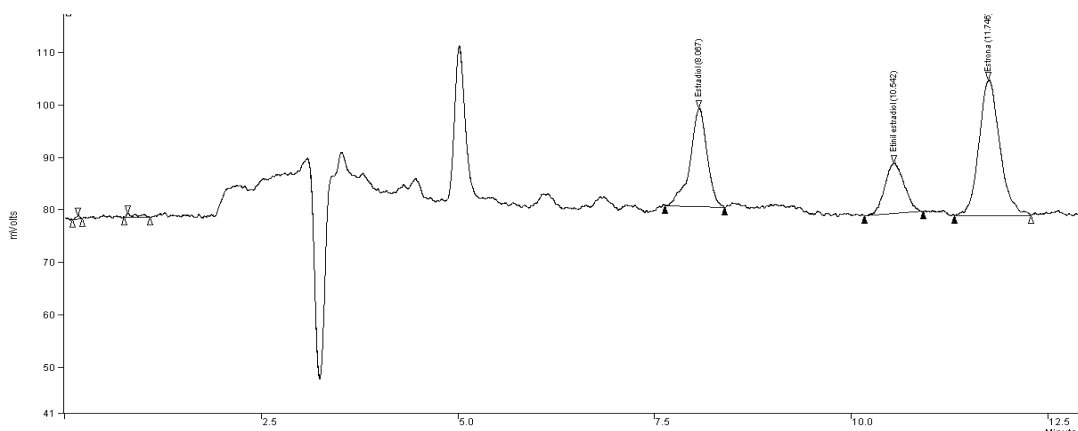
Cromatogramas da recuperação em Água Superficial



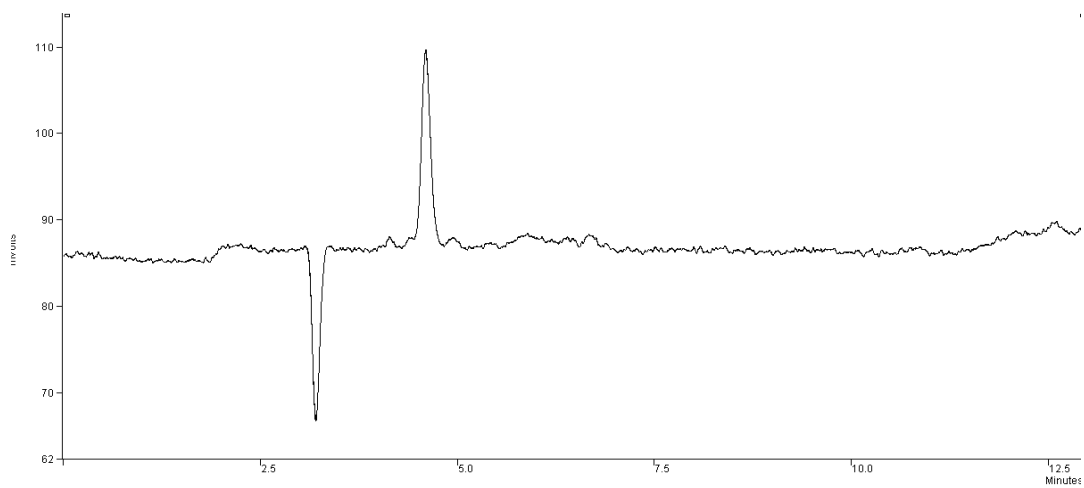
5 - Cromatograma HPLC/Flu da recuperação dos hormônios enriquecida com os analitos: E1[5 $\mu\text{g L}^{-1}$], E2 e EE2 [6,25 ng L^{-1}] - Nível baixo



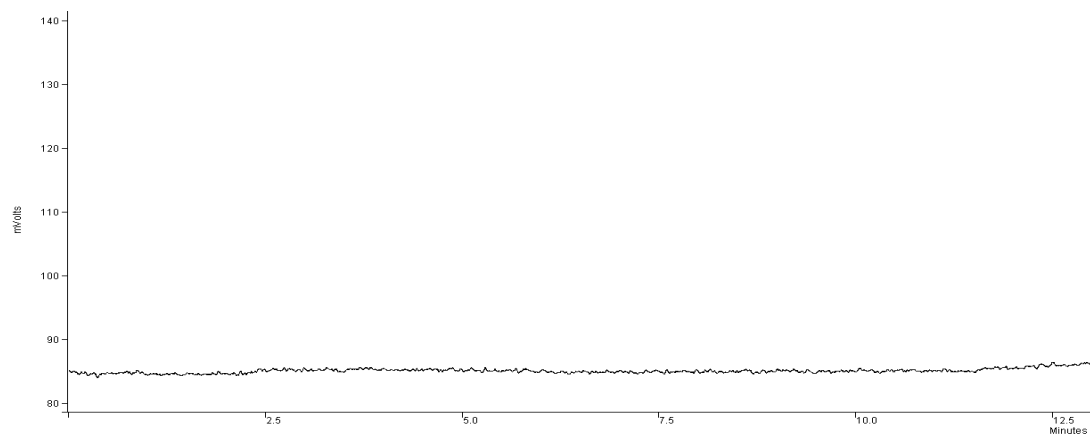
6 - Cromatograma HPLC/Flu da recuperação dos hormônios enriquecida com os analitos: E1[2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$], E2 e EE2 [25 ng L^{-1}] - Nível médio



7 - Cromatograma HPLC/Flu da recuperação dos hormônios enriquecida com os analitos: E1[10 mg L^{-1}], E2 e EE2 [0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$] - Nível alto



8 - Cromatograma HPLC/Flu da testemunha (matriz sem os analitos)



9 - Cromatograma HPLC/Flu do branco do cartucho utilizado na recuperação