

THIAGO BERNARDO CAVASSANI

**“Avaliação da Ocorrência de Fitoestrógenos de Soja em
Efluente de Estação de Tratamento de Esgoto, Água
Superficial e Subterrânea da Cidade de Araraquara”**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Química, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Química

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mary Rosa Rodrigues de Marchi

**Araraquara
Julho/2010**

FICHA CATALOGRÁFICA

C376a	Cavassani, Thiago Bernardo Avaliação da ocorrência de fitoestrógenos de soja em efluentes de estação de tratamento de esgoto, água superficial e subterrânea da cidade de Araraquara / Thiago Bernardo Cavassani. - Araraquara : [s.n], 2010 114 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Mary Rosa Rodrigues de Marchi Co-orientador: Wagner Vilegas 1. Química-analítica. 2. HPLC. 3. Alteradores endócrinos. 4. Daidzeína. 5. Genisteína. I. Título.
-------	--

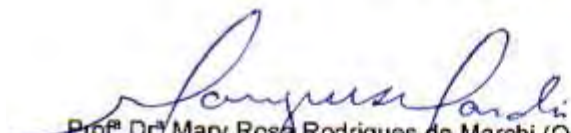
Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

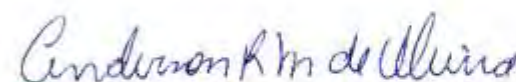
THIAGO BERNARDO CAVASSANI

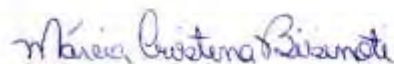
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 30 de julho de 2010.

BANCA EXAMINADORA


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


Prof. Dr. Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira
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

Dados Curriculares

Dados Pessoais:

Nome: Thiago Bernardo Cavassani

Nome em citações bibliográficas: CAVASSANI, T.B.

E-mail: thiagocavassani@ffclrp.usp.br

Formação Acadêmica/Titulação:

2008 - 2010 Mestrado em Química Analítica

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Instituto de Química -
UNESP Campus Araraquara – SP

Orientador: Prof^a. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi

2004 - 2007 Graduação em Química - Bacharelado

Universidade Estadual Paulista Julio de
Mesquita Filho – Instituto de Química - UNESP Campus Araraquara – SP

Atuação Profissional

2010-Atual- Químico- Departamento de Química- Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo - FFCLRP-USP

2007 - Estágio: Central Química Industrial – Araraquara

Trabalhos Publicados em anais de Congressos

CAVASSANI, T. B.; MARCHI, M. R. R. Validação de Método Analítico para
Determinação de Fitoestrógenos de Soja em Efluente de ETE, Água de Rio e
Subterrânea. In: ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA, 19., 2009,
Salvador. **Anais...** Salvador: [s.n.], 2009.

CAVASSANI, T. B.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L, WEINERT, P. L. Determinação de
metoclopramida em preparações farmacêuticas via análise por injeção em fluxo com
detecção espectrofotométrica. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA
UNESP, 18., 2006, Bauru. **Anais...** Bauru: [s.n.], 2006.

CAVASSANI, T. B. ; PEZZA, H. R. ; PEZZA, L , WEINERT, P. L. Determinação de

Cloridrato de Metoclopramida em urina e preparações farmacêuticas por espectroscopia em fluxo. In. CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 19., 2007, Presidente Prudente. **Anais...** Presidente Prudente: [s.n.], 2007.

“Dedico este trabalho ao meu pai Ezequiel e minha mãe Luci pelo apoio incondicional, amor e dedicação que tiveram;

Às minhas irmãs Fabiana e Elaine, pelo carinho fraterno e momentos agradáveis

“Às minhas sobrinhas Laura, Eloisa, Pietra e Eloah por sempre alegrar nossa vida.”

Agradecimento

Agradeço a Deus por permitir chegar até aqui.

À minha família pela compreensão e apoio.

À Prof^a. Mary pela orientação acadêmica, pelos ensinamentos de vida, carinho e confiança que sempre demonstrou. Aprendi muito mais que a pura Química no convívio com a Sr^a. Levo comigo uma eterna admiração e um profundo respeito. Muito obrigado Professora.

À Priscila que esteve ao meu lado durante grande parte desse período; obrigado pelo apoio, consideração e afeto...

Aos colegas do GRESCO pelos bons momentos. Em especial ao Zé, homenzinho, Dayana e Flávio que muito me ensinaram nestes anos.. Também ao Flávio, Stephane, Guilherme, Douglas e Eduardo Garbulho, João... Dona Marilei por tanta dedicação, muito obrigado.

Aos amigos da Pós, João e Rodrigo pela amizade e companheirismo desde o início. Letícia, Gabriel, Zé Renato, Thiago Sequinel...Obrigado pelos bons momentos.

Ao pessoal do Futebol, Zé Rufino, Piá, Gabriel, Juliano...

À turma 44 que sempre fez parte deste momento, em especial Vinícius,

Aos amigos de República neste período, Renan, Mito e Pepe, que muito fez por mim em Ribeirão, Obrigado.

Ao meu querido amigo Murilo, por todos esses anos de convivência, respeito e consideração. Obrigado.

Ao DAAE de Araraquara, que permitiu sem nenhum obstáculo as coletas de dados nestes 2 anos. Renata e Stephano, muito obrigado.

Aos amigos de Ribeirão que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a finalização do trabalho, em especial aos grandes companheiros André, Thiago...

À Joana, por apoiar-me nesta reta final, pela paciência de corrigir cada referência, pelo carinho e consideração, muito obrigado

Aos demais amigos que fazem parte desta obra.

Obrigado a todos.

Resumo

É consenso entre cientistas do mundo inteiro que existem moléculas com o poder de alterar o funcionamento do sistema endócrino humano e de diversas espécies de animais, conhecidas atualmente como alteradores endócrinos. Dentro deste grupo de substâncias, merece destaque as isoflavonas presentes em maior abundância nos grãos de soja, principalmente a genisteína (GEN) e a daidzeína (DAID), apontadas como responsáveis por desencadear inúmeros efeitos endócrinos em espécies aquáticas. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi otimizar e validar um novo método para determinação de GEN e DAID em efluente de ETE, água subterrânea, potável e de rio; aplicando o método já validado nestas matrizes na cidade de Araraquara e avaliar o comportamento sazonal destes alteradores endócrinos. O método apresentado é baseado na pré-concentração e simplificação de amostra proporcionado pelo uso de SPE aplicado a 2 litros de amostras de água de rio e subterrânea e ao volume de 1,5 litro de efluente de ETE, analisados por HPLC-UV utilizando um sistema MeOH/Água como alternativa ao uso de acetonitrila. A exatidão mostrou-se na faixa de 75 a 110%, com precisão entre 0,5 e 14 %. O LQ alcançado com o referido método foi de 6,3 e 188 ng L⁻¹ para daidzeína e 2,17 e 187 ng L⁻¹ para a genisteína nas matrizes de água subterrânea, superficial e efluente de ETE, respectivamente. A aplicação do método nas amostras de água subterrânea e do Ribeirão das Cruzes demonstrou que as concentrações de DAID e GEN situaram-se abaixo dos LD. Já para as amostras de efluente de ETE, estas moléculas foram identificados em todas as amostras coletadas, com concentrações variando entre 60-306 ng L⁻¹ para GEN e de 76 a 288 ng L⁻¹ para DAID. Comparando-se os dados de temperatura e pluviosidade com as concentrações destes fitoestrógenos no período amostrado, percebe-se que a temperatura e o aumento da pluviosidade tem efeito positivo no aumento da concentração de fitoestrógenos no efluente de ETE. Finalmente, estes são os primeiros dados referentes a estes contaminantes no estado de São Paulo, os quais indicam a necessidade de estudos mais detalhados sobre a dispersão de DAID e GEN a partir do ponto de lançamento dos efluentes da ETE e também uma avaliação detalhada do risco potencial à biota aquática que a ocorrência destas concentrações de fitoestrógenos pode representar.

Palavras-Chave: Genisteína; Daidzeína; Alterador endócrino; HPLC/UV

Abstract

It is a common thought among scientists worldwide that there are molecules with the capacity of altering the functioning of the endocrine system of humans and several species of animals, currently known as endocrine modifiers. Inside this group of substances, the highlighted ones are the isoflavones more abundantly present in soybean grains, especially genistein (GEN) and daidzein (DAID), pointed as those responsible for triggering a number of endocrine effects in aquatic species. Therefore, the aim of the present work was optimize and validate a new method for the determination of GEN and DAID in an effluent of a Sewage Treatment Unit (STU), as well as subterranean, drinking and river waters, applying the method already validated in these matrixes in the city of Araraquara, and then evaluate the seasonal behavior of these endocrine modifiers. The method presented is based on the sample pre-concentration and simplification enabled by the use of SPE applied to 2 liters of samples from subterranean and river waters, and to the volume of 1.5 liter of STU effluent, analyzed through HPLC-UV using a system of MeOH/Water as an alternative to the use of acetonitrile. The accuracy was shown to be in the range of 75 to 110%, with a precision between 0.5 and 14 %. The LQ reached with the method referred was of 6.3 and 188 ng L⁻¹ for daidzein, and 2.17 and 187 ng L⁻¹ for genistein in the matrixes of subterranean and superficial waters, as well as STU effluent, respectively. The application of the method in the samples of subterranean water and also in that of the Cruzes stream demonstrated that the DAID and GEN are below the LD. For the samples of STU effluent, such molecules were identified in all samples collected, with concentrations ranging between 60-306 ng L⁻¹ for GEN and 76-288 ng L⁻¹ for DAID. Comparing the temperature and rainfall data with the concentrations of these phytoestrogens in the period sampled, one can notice that the temperature and the rainfall increase have a positive effect in the increase in the concentration of phytoestrogens in the STU effluent. At last, these are the first data regarding these contaminants in the São Paulo state, which show the necessity of more detailed studies on the dispersion of DAID and GEN from the STU effluent releasing point, and also a detailed evaluation of the potential risk, to the aquatic biota, that the occurrence of these phytoestrogen concentrations may represent.

Key-words: Genistein; Daidzein; Endocrine Disruptor; HPLC

Lista de Figuras

Figura 1: Sistema endócrino humano.	4
Figura 2: Estruturas moleculares dos fitoestrógenos de soja daidzeína e genisteína.	11
Figura 3: Estrutura molecular da genistina e daidzina, formas glicosiladas da GEN e DAID, respectivamente.	13
Figura 4: Metabolismo das Isoflavonas de soja.	14
Figura 5: Semelhança estrutural entre os fitoestrógenos de soja e o 17- β -estradiol, possibilitando a ligação com o receptor específico	14
Figura 6: Classificação das Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos do estado de São Paulo.	24
Figura 7: Mapa esquemático contendo os principais corpos de água e municípios da URGHI-13.	25
Figura 8: Fluxograma do tratamento de água do município de Araraquara.	30
Figura 9: Fluxograma do processo de tratamento de esgoto do município de Araraquara.	32
Figura 10: Nomograma de força de solvente para fase reversa em HPLC.	36
Figura 11a: Espectro de absorção (UV) para genisteína, obtido no sistema Varian ProStar para solução de 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.	37
Figura 11b: Espectro de absorção (UV) para daidzeína, obtido no sistema Varian ProStar para solução de 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$.	37
Figura 12: Estrutura química do divinilbenzeno-vinilpirrolidona, fase sólida dos cartuchos Strata-X.	41
Figura 13: Localização de um ponto de captação de água superficial para abastecimento da cidade de Araraquara (seta A). A seta B indica a ETA Fonte.	42
Figura 14: Visão aproximada da lagoa do rio Ribeirão das Cruzes, na região urbana da cidade. A seta indica o ponto exato de amostragem de água superficial.	42
Figura 15: Localização do ponto de amostragem de água potável, indicado pela seta B (figura 1 e 2). Destaque para a proximidade do ponto de amostragem de água subterrânea, indicada pela seta A (figura 1 e 2).	43
Figura 16: Estação de tratamento de esgoto de Araraquara. (A) indica as lagoas de tratamento e (B) indica o ponto de despejo do efluente no Ribeirão das Cruzes, local onde é realizada as coletas de efluentes de ETE.	43
Figura 17: Fluxograma do tratamento de amostra de água subterrânea, superficial e potável.	45
Figura 18: Cromatograma (HPLC-UV) de extrato de efluente de ETE, submetido a SPE (Strata-X, 1,5 L, 200 mg) (A) sem e (B) com fortificação de 4,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada fitoestrógeno.	47
Figura 19: Fluxograma do tratamento de amostra (efluentes de ETE), com destaque para a etapa de clean up introduzida.	50
Figura 20: Cromatogramas (HPLC-UV) obtidos para os extratos SPE de amostras de efluente de ETE: sem (A) e com (B) clean-up com alumina. As linhas verticais indicam o tempo de retenção dos fitoestrógenos estudados.	51
Figura 21: Cromatograma (HPLC-UV) para extrato SPE de efluente de ETE, após cleanup em coluna de alumina (A) e padrão de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (B), utilizando-	52

se coluna cromatográfica C18 (Agilent, 4,6 mm x 250 mm x 5 μ m). As condições de eluição seguiram o método utilizado para água subterrânea, descrito na figura 19.

- Figura 22: Cromatograma (HPLC-UV) para extrato SPE de efluente de ETE, utilizando-se 0,5 g de Sílica gel (A) e 0,5 g de Alumina (B) na etapa de Clean-up, método descrito na Figura 19. 53
- Figura 23: Fluxograma do tratamento de amostras de efluente de ETE. 54
- Figura 24: Fluxograma do procedimento de condicionamento do cartucho SPE Strata-X. 62
- Figura 25: Cromatograma (HPLC/UV) da análise em branco, utilizando 2L de água deionizada, com pico interferente para genisteína em 12,5 min. 63
- Figura 26: Cromatograma (HPLC-UV) da análise em branco, utilizando 2 L de água deionizada. 64
- Figura 27: Cromatograma (HPLC/UV) obtido para solução padrão dos fitoestrógenos ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) em metanol nas condições otimizadas para o sistema Varian LC-920. (1) Daidizeína e (2) Genisteína. 65
- Figura 28: Gráficos de linearidade obtidos no sistema LC-920 para os fitoestrógenos em estudo. 66
- Figura 29: Representação das curvas analíticas obtidas para GEN (a) e DAID (b) 69
- Figura 30: Cromatograma (HPLC-UV) do extrato de água de rio com fortificação de 875 ng L^{-1} (2L, Strata-X 500mg). 72
- Figura 31: Cromatograma (HPLC-UV) da matriz de água potável submetido a SPE (2L; Strata-X, 500 mg) (A) Amostra testemunha de água potável; (B) Amostra de água potável e (c) Água subterrânea com fortificação de 175 ng.L^{-1} de cada fitoestrógeno. Intensidade dos picos no cromatograma (B) revela a degradação dos fitoestrógenos em água potável. 74
- Figura 32: Cromatograma (HPLC-UV) do extrato efluente de ETE com fortificação de $1,16 \mu\text{g/L}$ de cada fitoestrógeno (1,5L; Strata-X 500mg). 75
- Figura.33: Comparação entre os cromatogramas do padrão na menor concentração estudada ($0,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (A) e da amostra testemunha de água subterrânea (B). 76
- Figura 34: Cromatograma completo da amostra testemunha de água superficial (A), ampliação da região de interesse (B) e comparação com o padrão na menor concentração estudada ($0,01 \mu\text{g.mL}$ 77
- Figura 35: Cromatograma da amostra testemunha de efluente de ETE. 78
- Figura 36: Cromatograma completo de efluente de ETE (A). Ampliação da região de interesse (B) Cromatograma do padrão dos fitoestrógenos na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (C). 82
- Figura 37: Disposição gráfica dos dados de concentração obtidos para DAID e GEN em efluente da ETE-Araraquara e os dados meteorológicos para o município no período de amostragem (junho a novembro/2009). 87

Lista de Tabelas

Tabela 1: Principais hormônios presentes no organismo humano.	5
Tabela 2: Concentração média de daidzeína (DAID) e genisteína (GEN) em alimentos de origem vegetal.	12
Tabela 3: Concentração média de daidzeína (DAID) e genisteína (GEN) em soja e derivados.	12
Tabela 4: Alguns métodos para análise e concentrações encontradas para fitoestrógenos em matrizes ambientais.	20
Tabela 5: Dados de saneamento e população dos municípios que compõem a URGHI-13.	27
Tabela 6: Locais de obtenção das amostras para a otimização e validação do método.	42
Tabela 7: Propriedades físico-químicas dos fitoestrógenos de soja.	46
Tabela 8: Testes de pH em amostras de esgoto tratado.	48
Tabela 9: Concentrações de DAID e GEN nas amostras fortificadas utilizadas no estudo de recuperação do método.	59
Tabela 10: Condições cromatográficas otimizadas e utilizadas neste trabalho.	65
Tabela 11: Dados obtidos para a construção da curva analítica da Daidzeína.	67
Tabela 12: Dados obtidos para a construção da curva analítica da Genisteína.	68
Tabela 13: Dados obtidos pela injeção seqüencial de padrão 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos analitos. 1ª bateria de análises (n = 10).	70
Tabela 14: Dados obtidos pela injeção seqüencial de padrão 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos analitos. 2ª. bateria de análises (30 dias após a 1ª.) (n = 10).	70
Tabela 15: Resultados dos ensaios de recuperação para amostras de água subterrânea fortificada com os analitos (n=3).	71
Tabela 16: Resultados dos ensaios de recuperação para amostras de água subterrânea fortificada com novas concentrações dos analitos (n=3).	71
Tabela 17: Resultados dos ensaios de recuperação para amostras de água superficial fortificada com os analitos (n=3).	72
Tabela 18: Resultados dos ensaios de recuperação para amostras de efluentes de ETE fortificada com os analitos (n=3).	75
Tabela 19: Dados da regressão da curva analítica efetuada na amostra de Efluente de ETE e em solvente.	78
Tabela 20: Parâmetros das curvas analíticas obtidas com os padrões em solvente e nas matrizes de água subterrânea e superficial.	79
Tabela 21: Resultados do estudo da precisão instrumental para amostras de água subterrânea e superficial fortificados com 875 ng.mL^{-1} dos analitos e efluente de ETE, fortificado com 1,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (n = 7).	80
Tabela 22: Limites de Detecção e Quantificação do método para a matriz de água subterrânea, superficial e efluente de ETE.	81
Tabela 23: Concentrações de DAID e GEN encontradas nas amostras ambientais analisada neste trabalho.	83
Tabela 24: Dados meteorológicos para Araraquara, no período de julho a novembro/2009.	86

Lista de Abreviaturas

AE – Alterador Endócrino
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CV - Coeficiente de Variação
DAD - Detector de Arranjo de Diodos
DAID - Daidzeína
DES - Dietilestilbestrol
E1 - Estrona
E2 - Estradiol
EE2 – Etnilestradiol
ETA - Estação de tratamento de água
ETE - Estação de tratamento de esgoto
GEN - Genisteína
GC - Cromatografia Gasosa
HPA - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HPLC/UV - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector ultra violeta
ICH - International Conference on Harmonisation
LC -MS/MS – Cromatógrafo Líquido acoplado com espectrômetro de massas
p.a. - Grau Analítico
RSD - Desvio Padrão Relativo
SPE – Solid-phase extraction - extração em fase sólida
UGRHI - Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos
WHO - Organização Mundial da Saúde

Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Sistema endócrinos e os hormônios	1
1.2 Hormônios estrogênicos	6
1.3 Alteradores endócrinos	7
1.3.1 Fitoestrógenos de soja: Daidzeína e Genisteína	11
1.3.1.1 Fitoestrógenos e o meio ambiente aquático	16
1.3.1.2 Métodos de quantificação de fitoestrógenos de soja em matrizes ambientais	18
1.4 Área de Estudo - Unidade de Gerenciamento dos Recursos Hídricos Tietê-Jacaré (URGHI 13)	23
1.4.1 O município de Araraquara	28
1.4.1.1 Tratamento de água	29
1.4.1.2 Ribeirão das Cruzes	30
1.4.1.3 Tratamento de esgoto	31
2 OBJETIVOS	33
3 PARTE EXPERIMENTAL	34
3.1 Otimização e validação de método	34
3.1.1 Materiais e equipamentos	34
3.1.2 Preparação das soluções padrão dos fitoestrógenos	34
3.1.3 Modificação do método cromatográfico para análise por HPLC/UV	35
3.1.4 Validação de métodos cromatográficos	38
3.1.5 Avaliação da resposta do sistema cromatográfico LC-920	38
3.1.5.1 Linearidade	39
3.1.5.2 Precisão instrumental	40
3.1.5.3 Limites instrumentais	41
3.1.6 Otimização do preparo da amostra	41
3.1.6.1 Testes Preliminares	41
3.1.6.2 Obtenção das amostras utilizadas na otimização do método	41
3.1.6.3 Otimização do método empregando SPE para quantificação de fitoestrógenos em água (superficial, potável e subterrânea).	44
3.1.6.4 Otimização do método empregando SPE para efluente de ETE	45
3.1.6.5 Avaliação da seletividade e do efeito matriz	54
a) Água subterrânea e superficial	56
b) Efluente de ETE	56
3.1.6.6 Avaliação da precisão	57
3.1.6.7 Avaliação da exatidão: estudos de recuperação do método	58
3.1.6.8 Avaliação da precisão instrumental na matriz	59
3.1.6.9 Limites de detecção e quantificação do método	59
3.2 Estratégia de amostragem	60
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1 Testes preliminares	62
4.2 Avaliação da resposta do sistema cromatográfico	64
4.2.1 Linearidade	65
4.2.2 Precisão instrumental	69
4.2.3 Limites instrumentais	70
4.3 Ensaios de recuperação	70
4.3.1 Água subterrânea	70
4.3.2 Água superficial	72

4.3.3 Água potável	73
4.3.4 Efluente de ETE	75
4.4 Avaliação da seletividade:	76
4.4.1 Água subterrânea e superficial	76
4.4.2 Efluente de ETE	78
4.5 Avaliação do efeito de matriz em água subterrânea e superficial	79
4.6 Avaliação da precisão instrumental na matriz de água subterrânea, superficial e efluente de ETE	80
4.7 Limite de detecção e quantificação para as matrizes estudadas	81
4.8 Análise de fitoestrógenos em amostras de Araraquara	81
5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema endócrino e os hormônios

Os sistemas endócrinos e nervosos compõem os dois maiores sistemas de comunicação do organismo humano. Formado pelo conjunto de glândulas, o sistema endócrino difere dos demais sistemas do organismo uma vez que as diferentes glândulas que o constitui não estão anatomicamente conectadas, mas sim difusas pelo corpo; as quais constituem um sistema no sentido funcional. Estas glândulas são responsáveis pela secreção de hormônios (VANDER; SHERMAN; LUCIANO, 1994).

Este termo (hormônio) foi utilizado pela primeira vez ainda em 1905 por Ernest H. Starling e descende do grego *hormo*, que significa "pôr em movimento", excitar. O autor usou o termo para descrever substâncias químicas secretadas diretamente na corrente sanguínea, sem dutos que a transportassem para um local específico dentro do organismo animal (RUSHTON, 2009).

Os hormônios hidrossolúveis são transportados no plasma sanguíneo e não requerem nenhum tipo de mecanismo específico para este fim. Os mais insolúveis, no entanto, são transportados por meio de ligação à proteínas solúveis. Quando um hormônio livre entra na célula, a proteína carregadora não ligada se encarrega de substituir a molécula por um hormônio recém-lançado. Este processo assegura que todas as células têm acesso até mesmo aos mais insolúveis dos hormônios (WILSON; FOSTER, 1998).

Os hormônios estão envolvidos na ligação entre o genoma e o ambiente, sendo o sistema endócrino capaz de interpretar a variação ambiental e produzir uma gama de fenótipos de um mesmo genótipo. Variações dos sinais endócrinos podem produzir alterações na transcrição genética, modificando taxas metabólicas nas células-alvo; inibindo, estimulando e/ou produzindo interações sinérgicas com outros hormônios. Além disso, a resposta de um indivíduo aos sinais endócrinos pode mudar ao longo do tempo, aumentando o potencial dos hormônios de influenciar a variabilidade fenotípica (DUFTY; CLOBERT; MØLLER 2002).

De forma geral, quase todos os animais multicelulares utilizam-se do sistema nervoso e endócrino para controlar e coordenar os processos orgânicos internos (GOETTLICH, 2001). O sistema nervoso geralmente permite a transmissão rápida

(isto é, em frações de segundos) de informações entre as diferentes partes do organismo. Por outro lado, a comunicação hormonal, que está baseada na produção, liberação e transporte dos hormônios, tem papel de destaque em situações que exigem ações regulatórias de maior intensidade e duração. Assim, os dois sistemas de comunicação se complementam e, além disso, interagem entre si: um estímulo oriundo do sistema nervoso pode influenciar a liberação de certos hormônios e vice versa (STURMHÖFEL; BARTKE, 1998). Estes sistemas operam conjuntamente para controlar todas as funções e processos orgânicos (GOETTLICH, 2001).

Diferentes tipos de hormônios causam diferentes efeitos sobre células ou tecidos do organismo e, conjuntamente com o sistema nervoso, reprodutor e alguns órgãos como fígado e pâncreas, são responsáveis por manter e controlar diversos parâmetros, como os níveis de energia do corpo; o crescimento e desenvolvimento; a própria reprodução; a composição eletrolítica dos fluidos corporais, respostas a estímulo do ambiente, estresse e lesões físicas; além de manter a homeostase (THE HORMONE FOUNDATION, 2010), que pode ser entendida como a manutenção da constância do meio interno dentro de limites estreitos, independentemente das variações ocorridas no meio externo (GAGLIARDINO, 2004).

Alguns hormônios têm poucas células-alvo específicas, ao passo que outros afetam diversos tipos de células no organismo. As células-alvo para cada hormônio são caracterizadas pela presença de estruturas moleculares dentro ou na superfície das células que, seletivamente, conectam-se aos hormônios. Estas estruturas são chamadas de receptores hormonais (STURMHÖFEL; BARTKE, 1998).

Normalmente, hormônios hidrossolúveis usam receptores localizados na superfície da membrana da célula do tecido-alvo. Uma série de moléculas especiais no interior da célula, conhecidas como "mensageiros secundários", transportam as informações do hormônio para o interior da célula. Já os hormônios lipossolúveis, como os esteróides, passam através da membrana da célula e ligam-se a receptores encontrados no citoplasma (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE MEDICINA BIOMOLECULAR, 2010).

Estas moléculas apresentam distintas formas de atuação nas células-alvos. Atuando na membrana celular, os hormônios podem ligar-se aos seus respectivos receptores e ativar enzimas que atuam como mensageiros secundários. Os

hormônios também podem alterar as propriedades físico-químicas da membrana celular, tais como a permeabilidade a íons, nutrientes e metabólitos; acarretando um aumento da absorção de substâncias essenciais para o crescimento e desenvolvimento celular. Além disso, estas substâncias podem atuar como reguladores da expressão genética, penetrando na célula e ligando-se a receptores no citoplasma. Como resultado, este receptor ativado pode adentrar o núcleo, ligar-se ao DNA e ativar ou desativar genes específicos, modulando a atividade celular. Os hormônios esteróides são exemplos de moléculas que atuam desta forma. Complementarmente, a atuação hormonal pode ser feita através da diferenciação celular, sendo os hormônios da tireóide e também os sexuais responsáveis por trazer a diferenciação e a morfogênese para novas estruturas. Por fim, os hormônios podem agir no organismo através de efeitos sistêmicos, cujo resultado dificilmente é observado em experimentos *in vitro*. Como exemplo, pode-se citar ações acarretadas por modificações no sistema vascular (TALWAR, 2010; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE MEDICINA BIOMOLECULAR, 2010).

As variadas formas de atuação dos hormônios são consequências das diferentes estruturas moleculares gerais que estes compostos apresentam, como por exemplo, o tamanho molecular e suas propriedades químicas. Consequentemente, seus mecanismos de ação também diferem-se substancialmente (EMANUELE, N.; EMANUELE, M.A., 1997).

Para que os hormônios consigam atuar de forma eficaz, o corpo humano conta com mecanismos de retorno altamente sensíveis, que são capazes de reduzir ou aumentar as quantidades de diferentes hormônios na corrente sanguínea; garantindo, assim, o efeito biológico necessário ao organismo (EMANUELE, N.; EMANUELE, M.A., 1997).

A Figura 1 ilustra as principais glândulas que secretam hormônios, enquanto que na Tabela 1 são apresentados os hormônios secretados por estas glândulas, bem como sua classificação, funções e regulação.

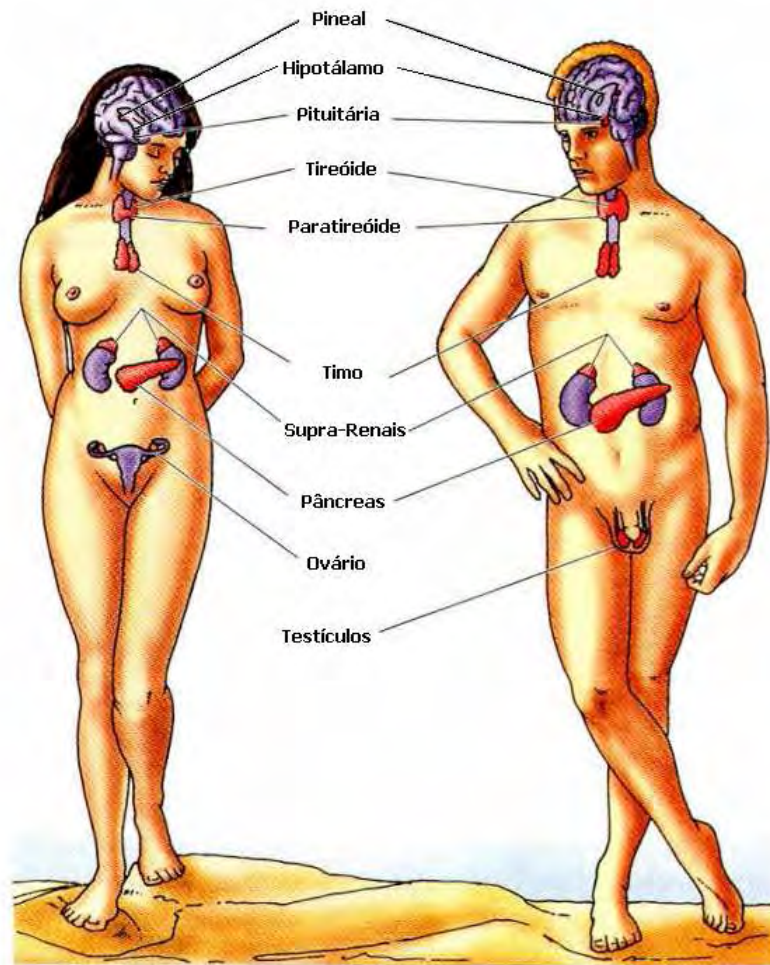


Figura 1 : Sistema endócrino humano (SODRÉ et al., 2007)

Tabela 1: Alguns hormônios presentes no organismo humano (adaptado de GUYTON; HALL, 1996)

Glândula	Hormônio	Classificação	Função	Regulação
Hipófise (Adeno- Hipófise)	GH-Somatotrofina	Proteína	Estimula o crescimento geral do corpo; afeta o metabolismo das células	Hormônios do Hipotálamo
	PRL-Prolactina	Proteína	Estimula a produção e a secreção do leite	Hormônios do Hipotálamo
	FSH-Folículo estimulante	Proteína	Estimula os folículos ovarianos nas fêmeas e a espermatogênese nos machos	Estrógenos no sangue; hormônios do hipotálamo
	LH-Luteinizante	Proteína	Estimula o corpo amarelo e a ovulação nas fêmeas e as células intersticiais nos machos	Progesterona ou testosterona; hormônios do hipotálamo
	TSH-Tireotrofina	Proteína	Estimula a tireóide a secretar seus hormônios	Tiroxina; hormônios do hipotálamo
	ACTH-Adrenocorticotrófico	Proteína	Estimula a secreção de glicocorticóides pelas glândulas adrenais	Cortisol; hormônios do hipotálamo
Tireóide	Triiodotironina (T3) e Tiroxina (T4)	Aminoácidos	Estimula e mantém os processos metabólicos	Tireotrofina
	Calcitonina	Peptídeo	Baixa o nível de cálcio no sangue e inibe a liberação de cálcio dos ossos	Concentração de cálcio no sangue
Ovários	Estrógenos	Esteróides	Estimula o crescimento da mucosa uterina; desenvolve e mantém os caracteres sexuais secundários femininos	Hormônio folículo estimulante; hormônio luteinizante
	Progesterona	Esteróide	Promove a continuação de crescimento da mucosa uterina	Hormônio folículo estimulante; hormônio luteinizante
Testículos	Andrógenos	Esteróides	Estimula a espermatogênese; desenvolve e mantém os caracteres sexuais secundários masculinos	Hormônio folículo estimulante; hormônio luteinizante
Pâncreas	Insulina	Proteína	Baixa a taxa no sangue; estimula o armazenamento de glicose pelo fígado; estimula a síntese de proteínas	Concentração de glicose no sangue; somatostatina
Supra Renal	Glicocorticóides	Esteróides	Afeta o metabolismo de carboidratos; aumenta o açúcar no sangue	Adrenocorticotrófico

1. 2 Hormônios estrogênicos

Os estrógenos constituem um grupo de hormônios esteróides quimicamente semelhante entre si, com 18 átomos de carbono derivados da molécula de colesterol (GRUBER et al, 2002). Os hormônios conhecidos como estrona, 17- β -estradiol e estriol são mais importantes estrógenos produzidos no corpo humano. Por causa de suas respectivas posições na sequência da biossíntese, a estrona é citada como E1, o estradiol como E2 e o estriol como E3 (FERNANDES; FORTUNATO; PINTO, 2010; GUYTON; HALL, 1996).

Em mulheres na idade reprodutiva, o ovário é o mais importante sítio de biossíntese de estrogênios (BULUN et al, 2000). O principal estrógeno secretado por este órgão é o estradiol, cuja potência estrogênica é 12 vezes maior do que a da estrona e 80 vezes maior do que a do estriol (GUYTON; HALL, 1996); exibindo uma alta atividade estrogênica mesmo em concentrações muito baixas (aproximadamente 10^{-9} mol L⁻¹ para ensaios in vitro) (FERREIRA, 2008).

Os estrógenos endógenos são responsáveis pela regulação de diversos processos fisiológicos em tecidos-alvo, principalmente em órgãos do sistema reprodutivo, onde são responsáveis pelo desenvolvimento da maioria das características sexuais secundárias femininas; desempenhando um importante papel na diferenciação sexual, na regulação da fertilidade, no crescimento e desenvolvimento desses tecidos (GUYTON; HALL, 1996; PIRES, 2008; FRIEDRICH, 2008).

Além do efeito sobre o sistema reprodutivo, os estrógenos atuam ainda sobre outros tecidos e órgãos, como por exemplo: 1) rins: promovem a reabsorção de sódio, contribuindo para a retenção hídrica observada ciclicamente em algumas mulheres; 2) ossos: inibem a reabsorção óssea, aumentam a formação de tecido ósseo, induzindo localmente a síntese de fatores de crescimento. Promovem, ainda, a fusão das extremidades dos ossos longos, motivo pelo qual as mulheres têm, em geral, uma estatura inferior à dos homens.; 3) fígado: promovem a síntese de diversas proteínas, incluindo as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (o “bom” colesterol), contribuindo ainda para diminuir os níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (o “mau” colesterol); 4)

sistema vascular: ação vasodilatadora e anti-vasoconstritora, pois aumentam a síntese de substâncias vasodilatadoras (NO) e inibem a formação de endotelina-1 (vasoconstritor) (FERNANDES; FORTUNATO; PINTO, 2010). Além disso, os estrógenos podem atuar no sistema nervoso central, na pele, no desenvolvimento de câncer de mama e endometrial e na proteção contra neoplasias de cólon (FRIEDRICH, 2008).

1.3. Alteradores endócrinos.

Atualmente, é consenso entre cientistas do mundo inteiro que o sistema endócrino (humano ou animal) pode ter seu funcionamento alterado na presença de diversas substâncias químicas exógenas. O primeiro alerta neste sentido foi postulado em 1962 por Rachel Carson, em seu livro *Silent Spring*, no qual a autora advertiu que certos produtos químicos utilizados como pesticidas de uso agrícola poderiam estar afetando o equilíbrio entre as espécies.

As discussões geradas pela publicação de Rachel Carson induziram a realização em 1979 da conferência *Estrogens in the Environment I* (NIEHS, 1979), onde os participantes concluíram que existem substâncias no meio ambiente que se comportam como hormônios, sendo que os organismos expostos podem estar sujeitos a alteração no sistema endócrino com conseqüências difíceis de serem previstas. No entanto, foi apenas em 1985, na conferência *Estrogens in the Environment II* que se apresentaram os efeitos dos xenobióticos sobre o desenvolvimento dos organismos e informações sobre a variedade de seus potenciais como hormônios exógenos (SERRANO; FERNÁNDEZ; OLMEDO, 2001).

Desde então, surgiram diversas nomenclaturas para estas substâncias. Se uma substância produz o mesmo efeito no organismo que um estrôgeno natural, a nomenclatura em inglês traz os termos “estrogen-like,” “estrogenic” ou até mesmo “estrogen mimic.” As traduções mais utilizadas para estes termos são: “perturbadores endócrinos”, “disruptivos ou disruptores endócrinos”, “desreguladores endócrinos”, “interferentes endócrinos”, “estrogênios ambientais”, “alteradores endócrinos” (AE) dentre outras (GHISELLI; JARDIM, 2007; AMERICAN CHEMISTRY CONCIL, 2010).

Há ainda uma nomenclatura que leva em conta a origem das moléculas classificadas como AE. Caso sejam de origem industrial, pode-se encontrar o termo “synthetic estrogen” ou estrógeno sintético. Da mesma forma, moléculas estrogênicas encontradas no meio ambiente são às vezes chamadas de “estrógenos ambientais”. Assim, estrógenos naturais encontrados em plantas passaram a ser denominados fitoestrógenos (AMERICAN CHEMISTRY CONCIL, 2010).

A partir de então, foram postuladas diversas definições para os alteradores endócrinos, todas bastante similares, como pode ser observado a seguir:

“Substância ou uma mistura exógena que altera o funcionamento do sistema endócrino e que, conseqüentemente, prejudica a forma de vida de um indivíduo, de sua descendência ou de populações inteiras” (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

“Por alteração endócrina se entende um mecanismo que afeta o funcionamento do sistema endócrino, ou seja, o desenvolvimento, crescimento, reprodução e comportamento humano e animal” (EUROPEAN UNION, 1999).

“Alterador endócrino é um agente exógeno que interfere na produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação, ação ou eliminação do hormônio natural no corpo responsável pela manutenção da homeostase e regulação dos processos de desenvolvimento” (KAVLOCK et al, 1996).

A exposição aos alteradores endócrinos causa grande preocupação devido aos inúmeros relatos de efeitos adversos observados em certos animais selvagens, peixes e ecossistemas que tiveram contato com estas substâncias; além do aumento da incidência de certas doenças endócrinas em humanos e também devido às alterações endócrinas observados em animais experimentais expostos a estas moléculas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

As evidências que certas substâncias poderiam atuar como hormônios levaram Colborn e colaboradores (apud BILA; DEZOTTI, 2007) a publicarem, ainda em 1993, uma revisão sobre anomalias em pássaros e peixes associadas à exposição de subprodutos industriais.

No entanto, o estudo mais aprofundado que poderia comprovar os efeitos prejudiciais aos organismos por tais moléculas foi publicado em 1996 por Guillette e colaboradores, no qual apresentou-se a hipótese de que anomalias no sistema

reprodutivo e alterações nos níveis de testosterona em répteis nos EUA seriam reflexos de exposição à AE nos no meio ambiente, especialmente à molécula de DDT.

As evidências de que algumas moléculas atuam sobre o complexo sistema endócrino humano e animal levou diversas organizações no ano de 2000 a listar possíveis substâncias que poderiam ser classificadas como AE. Assim, a Comunidade Européia produziu uma lista com 553 substâncias sintéticas e 9 hormônios naturais e sintéticos. Destas substâncias, havia indícios concretos de alteração endócrinas para apenas 118 moléculas. As demais moléculas foram estudadas em detalhes, outras substâncias foram acrescentadas a esta lista e para outras moléculas não foram encontradas evidências suficientes para classificá-las como AE (BILA; DEZOTTI, 2007).

No entanto, a ação dos AE em animais e seres humanos ainda é um assunto controverso e bastante discutido no meio científico. A falta de dados que comprovem a alteração endócrina e o meio de ação de uma molécula deixam margens a diversas questões. De fato, a fase da vida em que ocorre a exposição a estas moléculas é de fundamental importância no respectivo efeito biológico que o organismo pode apresentar, sendo que o agente não precisa ser persistente para ter um determinado efeito, especialmente se a exposição ocorre durante um período crítico do desenvolvimento (KAVLOCK et al., 1996). Além disso, a exposição na idade adulta pode ser compensada pelos mecanismos homeostáticos normais e pode, portanto, não resultar em qualquer efeito significativo ou detectável (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

Desta forma, várias pesquisas têm demonstrado que os AE podem atuar em diversos tecidos/órgãos por meio de múltiplos mecanismos de ação. Para a maioria das associações relatadas entre a exposição aos AE e uma variedade de resultados biológicos, os mecanismos de ação não são totalmente esclarecidos. Isto torna difícil distinguir entre efeitos diretos e indiretos da exposição aos AE.

Uma vez que os mecanismos de ação estrogênica dos AE não são completamente conhecidos, deve-se ter cautela na extrapolação de dados *in vitro* para efeitos *in vivo*, bem como em predição a dados de efeitos limitados *in vivo*, e na

extrapolação de dados obtidos com animais de experimentação para a situação humana (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

De maneira geral, os alteradores endócrinos interferem no funcionamento do sistema endócrino pelo menos de três formas distintas (EUROPEAN UNION, 1999):

- Imitando a ação de um hormônio produzido naturalmente (como o estrogênio ou a testosterona) e desencadeando, deste modo, reações químicas semelhantes no corpo;
- Bloqueando os receptores nas células que recebem os hormônios (receptores hormonais), impedindo assim a ação hormonal normal; ou
- Afetando a síntese, o transporte, o metabolismo e a excreção dos hormônios, alterando, portanto, as concentrações destes hormônios naturais.

As substâncias classificadas como AE, incluindo substâncias naturais e sintéticas, usadas ou produzidas para uma infinidade de finalidades podem ser agrupadas em duas classes (BILA; DEZOTTI, 2007):

✓ substâncias sintéticas

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

✓ substâncias naturais

- estrogênios naturais 17 β -estradiol, estrona e estriol
- fitoestrógenos, tais como, genisteína, daidzeína e metaresinol

A presença de um anel fenólico e um segundo grupamento capaz de realizar ligações de hidrogênio são características estruturais necessárias para a ligação dos estrógenos aos receptores estrogênicos. Deste modo, qualquer composto que induza a dimerização do receptor e subsequente ligação ao elemento de resposta ao estrogênio pode ser considerado um estrógeno (LIMER; SPEIRS, 2004; CORNWELL et. al., 2004 apud SILVA, 2005).

Dentre os diversos grupos de moléculas que apresentam atividade estrogênica, merecem destaque os fitoestrógenos, principalmente as moléculas presentes em maior concentração nos grãos de soja: genisteína e daidzeína.

1.3.1. Fitoestrógenos de soja: Daidzeína e Genisteína.

Os fitoestrógenos são compostos não esteroidais derivados de plantas, as quais podem ser classificadas estruturalmente como flavonas, isoflavonas, cumestanos e ligninas.

Estas moléculas são de grande relevância do ponto de vista fisiológico, pois exibem importantes atividades biológicas. Nas plantas, acredita-se que estas moléculas estejam ligadas, primariamente, às funções antioxidantes (ALBERTAZZI; PURDIE, 2002), papel crucial na manutenção celular. Além disso, atuam na filtração da radiação UV-B (OLSSON et al, 1998; ROZEMA et al, 1997), podendo agir como precursores de pigmento, agentes de lignificação, herbicidas, reguladores hormonais (BERKETT et al., 2003 apud DUARTE, 2008) ou ainda podem ser classificados como produtos de excreção de diversas plantas (PELISSERO et al, 2000).

Muitos isoflavonóides exibem um amplo espectro de atividade antimicrobiana e, portanto, acredita-se que estas moléculas ajudam a planta no combate a doenças causadas por este tipo de infecção (DIXON; FERREIRA, 2002).

As isoflavonas estão presentes em uma vasta gama de verduras, frutas e grãos. Entretanto, estão presentes em quantidades expressivas quase exclusivamente em plantas leguminosas e oleaginosas; sendo a soja uma rica fonte de genisteína (GEN) e daidzeína (DAID) (Figura 2) (REINLI; BLOCK, 1996; MURKIE; WILCOX; DAVIS, 1998).

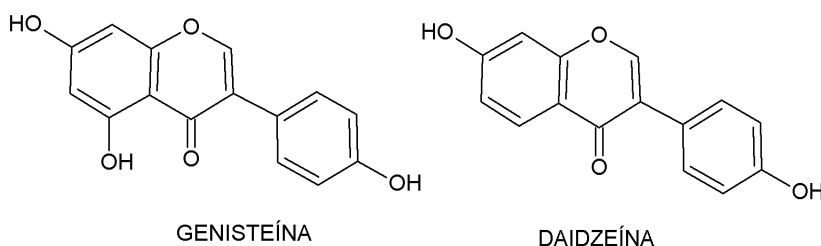


Figura 2: Estruturas moleculares dos fitoestrógenos de soja daidzeína e genisteína.

A seguir apresentam-se as quantidades destas isoflavonas em alimentos de origem vegetal (Tabela 2), e em soja e alimentos a base de soja (Tabela 3), ficando claro o papel da soja como fornecedora destas moléculas na dieta humana.

Tabela 2: Concentração média de daidzeína (DAID) e genisteína (GEN) em alimentos de origem vegetal

Fonte	DAID (mg/kg)	GEN (mg/kg)	Referência
Groselha	0,56	2,17	LIGGINS et al., 2000a, 2000b
Manga	0,25	0,21	
Maracujá	0,25	0,4	
Passas	0,69	1,46	
Castanha do Pará	0,012	nd	
Coco	0,12	0,19	
Morango	0,045	0,457	
ameixas pretas secas (cozidas)	0,15	0,66	
Feijão Trepador (<i>Phaseolus coccineus</i> L.)	7,1	8,9	
Ervilha, Fava, Vagem, Feijão-Guandu, alfafa	nd	nd	AGUIAR et al., 2007

nd= não detectado

Tabela 3: Concentração média de daidzeína (DAID) e genisteína (GEN) em soja e derivados

Fonte	DAID	GEN	Isoflavonas Totais*	
Grãos de soja	39%	54%	110 (mg/100g)	BARBOSA et al., 2006
Farinha desengordurada de soja comercial	38%	57%	191 (mg/100g)	
Farinha integral	37%	57%	200 (mg/100g)	
Farinha desengordurada de soja	35%	58%	381 (mg/100g)	
Isolado protéico de soja	34%	62%	124 (mg/100g)	
Proteína texturizada de soja	38%	53%	95 (mg/100g)	
Suplemento (Gérmen de Soja)	60%	20%	711 (mg/100g)	

*A porcentagem total de cada aglicona representa a soma das formas livres e conjugadas, expressas como agliconas, em relação ao total (m/m)

As isoflavonas de soja, em especial a genisteína e a daidzeína, ocorrem nas plantas na sua forma inativa, conjugada com moléculas glicosídicas, sendo que estas formas glicosiladas são chamadas daidzina e genistina (Figura 3).

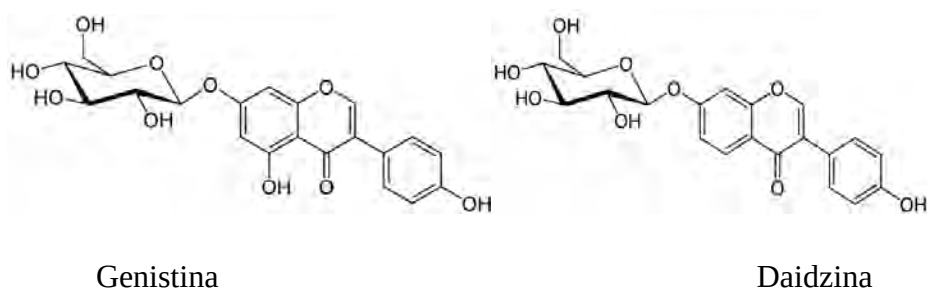


Figura 3: Estruturas moleculares da genistina e daidzina, formas glicosiladas da GEN e DAID, respectivamente.

Estas moléculas em sua forma glicosilada podem ser hidrolisadas no cólon por enzimas da microbiota intestinal, transformando-as nas agliconas, DAID e GEN, que são as formas absorvidas pelo organismo humano (COS et al., 2003; KULLING et al.2000).

Estudos sobre a biodisponibilidade das isoflavonas indicaram que as concentrações máximas de daidzeína e de genisteína no plasma sanguíneo ocorrem entre 7,5 e 8,5 horas após da ingestão de alimentos contendo tais substâncias. A taxa de excreção na urina exhibe nível máximo para ambos os compostos entre 6 e 12 horas após o consumo de soja, com mais de metade da excreção ocorrendo durante as primeiras 12 horas (KING; BURSILL, 1998).

Os fitoestrógenos são rapidamente conjugados com ácido glucurônico e em pequena extensão com sulfatos no organismo, sendo a maior parte excretada como conjugado na urina. Uma pequena porcentagem ainda é reabsorvida pelo ciclo enteroepático (SHELNUTT et al., 2002; COS et al., 2003). Em média, a forma glucurônica corresponde de 70 a 80% das isoflavonas excretadas na urina, enquanto a forma aglicona corresponde a apenas 5% do montante excretado (ZHANG; HENDRICH; MURPHY, 2003; HENDRICH 2002). A excreção fecal é extremamente baixa, variando de 1 a 2%. (SOYFEMME, 2010). A Figura 4 ilustra o metabolismo das isoflavonas de soja.

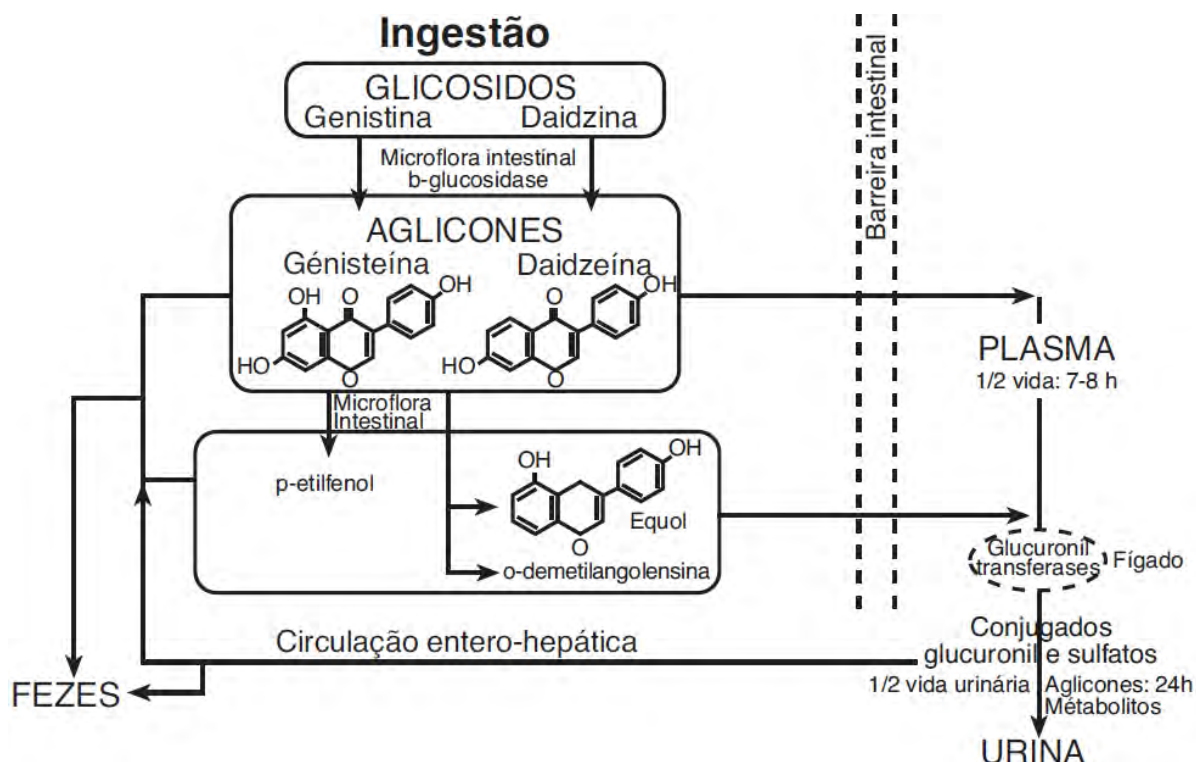


Figura 4: Metabolismo das Isoflavonas de soja (adaptado de FERNANDES, 2006)

Ambos os fitoestrógenos de soja (DAID e GEN) tem a capacidade de mimetizar a ação do 17- β -estradiol e, por isso, os possíveis efeitos agonistas ou antagonistas sobre os humanos ou animais vem sendo intensamente estudados nas ultimas décadas (ALBERTAZZI; PURDIE, 2002; GUTENDORF e WESTENDORF, 2001). A Figura 5 ilustra a semelhança conformacional entre as isoflavonas de soja e o 17- β -estradiol.

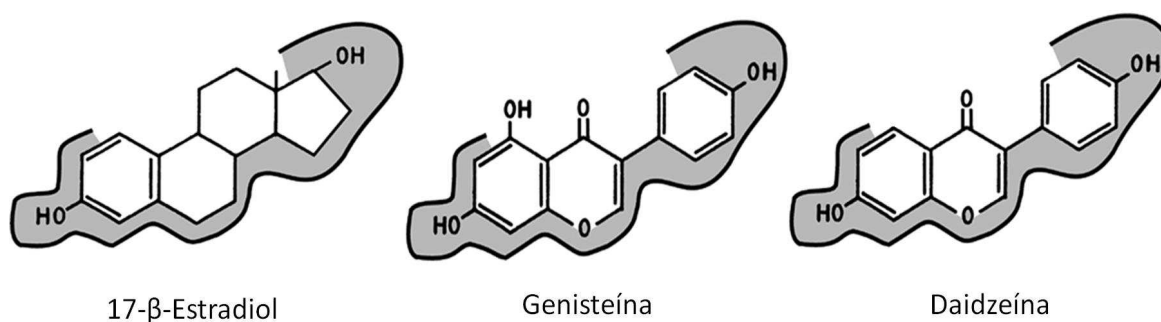


Figura 5: Semelhança estrutural entre os fitoestrógenos de soja e o 17- β -estradiol, possibilitando a ligação com o receptor específico. (adaptado de ADAMS e MCCAULEY, 2005)

As isoflavonas, no entanto, têm uma afinidade pela ligação aos receptores estrogênicos relativamente fraca, da ordem de 10^2 a 10^5 vezes menos ativo que o 17- β -estradiol. No entanto, em algumas circunstâncias, a exposição a estes fitoestrógenos pode ser extremamente elevada como para animais confinados e humanos através do consumo de alimentos a base de soja (COS et al., 2003).

O grande consumo de alimentos a base de soja é, em parte, resultado da crença que estas isoflavonas seriam alternativas naturais à reposição hormonal na menopausa (CLAPAUCH et al., 2002). Acredita-se também que o consumo de fitoestrógenos pode ser utilizado como alternativa para atenuar os sintomas do climatério (HAN et al., 2002) e na prevenção contra diversos tipos de câncer (ADLERCREUTZ, 2002).

Alem disso, estudos demonstram que uma dieta rica em fitoestrógenos reduz os níveis de LDL (o “mau” colesterol) e a taxa total de colesterol sanguíneo tanto em animais quanto em humanos (HAN et al., 2002; TERPSTRA; BEYNEN, 1984; SIRTORI; LOVATI, 2001).

O grande consumo de alimentos a base de soja pelos povos orientais é associado a uma menor incidência de câncer de próstata (STRAUSS et al., 1998). Estima-se que estas populações apresentam consumo na ordem de 20 a 150 mg/dia, níveis bastante superiores aos consumidos no ocidente, estimado em 1 a 3 mg/dia (GLAZIER e BOWMAN, 2001). Apenas para compreender a magnitude do consumo destas substâncias no ser humano, há relatos que a média de fitoestrógenos que ocorrem naturalmente na dieta ocidental contém uma atividade potencial estrogênica milhões de vezes superior aos níveis residuais de pesticidas que ocasionalmente possam conter atividade estrogênica (AMERICAN CHEMISTRY CONCIL, 2010).

A atividade estrogênia das isoflavonas e seus efeitos adversos foram reportados pela primeira vez em 1946 em ovinos, na chamada “doença do trevo”. Severos distúrbios reprodutivos culminaram em infertilidade permanente em fêmeas que pastavam em campos ricos em trevo vermelho (*Trifolium pratense*) na Austrália (BENNETTS et al., 1946 apud KURZER; XU, 1997). A partir de então, estudos in vivo realizados em ratos demonstraram que animais expostos a altas doses de fitoestrógenos apresentaram alteração do ciclo menstrual (DELCLOS et al. 2008),

aumento da incidência de câncer vulvar (THIGPEN et al., 2001) e nos casos de câncer na glândula mamária na prole destes ratos (CLARKE et al., 1999); além da suspeita de provocar múltiplos efeitos na morfologia e também na função ovariana destes animais (JEFFERSON et al., 2002).

Por fim, recentemente ficou comprovado que os fitoestrógenos, entre eles a GEN e DAID, apresentam efeitos genotóxicos em experimentos *in vitro*. Além disso, maior cuidado deve ser tomado com seus metabólitos, que também apresentaram efeitos genotóxicos. Dessa forma, os reais efeitos dos fitoestrógenos na saúde humana e animal passam a ser de grande interesse e debate na comunidade acadêmica (STOPPER; SCHMITT; KOBRAS, 2005).

A exposição humana a fitoestrogenos de soja, via ambiente, principalmente ar e água é pouco provável, no entanto o alto consumo de soja diretamente através dos grãos e derivados, ou indiretamente pelos derivados de soja presente em diversos alimentos industrializados é, sem dúvida, a principal via de exposição humana. Entretanto, a excreta humana e animal contendo estes fitoestrógenos pode representar um risco efetivo para a biota, principalmente a aquática.

1.3.1.1. Fitoestrôgenos e o meio ambiente aquático

Dado que muitos dos AEs têm o potencial para desencadear uma resposta estrogênica a concentrações muito baixas (partes por milhão ou partes por trilhão), é causa de preocupação as concentrações encontradas destes alteradores em estações de tratamento de esgoto, águas superficiais, sedimentos, água subterrânea e também em água potável (CAMPBELL et al., 2006).

A preocupação com os efeitos dos efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) no meio aquático iniciou-se quando, na Inglaterra, peixes machos expostos a este tipo de efluente apresentaram síntese de vitelogenina, ou seja, uma clara evidência do processo de feminização (SUMPTER, 1995; SUMPTER; JOBLING, 1995). Mais tarde, vários outros estudos mostraram que as águas receptoras de efluentes de ETE foram realmente estrogênicas para peixes e que a proporção da intersexualidade nestas espécies estava correlacionada com a quantidade dos efluentes lançados nas águas dos rios estudados (SOLÉ et al., 2003; VAN DEN BELT et al., 2004 apud PÁDUA, 2009).

Neste cenário, a presença de fitoestrogenos de soja no ecossistema aquático torna-se relevante, tendo-se em vista que estes AEs tem um significativo potencial para afetar o comportamento de peixes e diversos outros animais em seu habitat natural (CLOTFELTER; RODRIGUEZ, 2006). Estudos realizados por Kiparissis et al. (2003) indicaram que a exposição aquática de certas espécies de peixes a GEN induziu diversas anomalias sexuais. Este mesmo estudo relatou que 72% dos machos expostos a altas concentrações destas moléculas ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$) desenvolveram características secundárias femininas.

Em outro estudo, Scholz e colaboradores (2004) demonstraram que peixes expostos a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de fitoestrógenos apresentam síntese de vitelogenina. Estudos realizados com enguias européias (*Anguilla anguilla*) alimentadas com ração contendo GEN demonstraram um aumento na população feminina, comprovando que esta molécula pode induzir o fenômeno de intersexualidade em algumas espécies aquáticas (TZCHORI et al., 2004).

População de sapos *Xenopus*, expostos a concentrações superiores a $80 \mu\text{g L}^{-1}$ de fitoestrógenos, especialmente GEN, apresentaram comprovadas alterações em seu desenvolvimento embrionário, além de evidentes prejuízos a reprodução a esta espécie (INGHAM et al., 2004).

Um número expressivo de estudos já foi realizado em diversos países no intuito de quantificar estas moléculas em matrizes ambientais. As concentrações encontradas destes alteradores endócrinos variam significativamente em cada estudo em função de múltiplos fatores, no entanto, de forma geral, a carga de fitoestrógenos lançada nos corpos hídricos por meio das estações de tratamento de esgoto e as concentrações já quantificadas nas matrizes ambientais são relevantes; apesar de não atingirem individualmente os níveis necessários para uma resposta biológica efetiva, mas sempre deve ser ressaltado nestes casos que efeitos sinérgicos podem ocorrer em matrizes complexas como estas, com conseqüências de difícil previsão.

Portanto, a avaliação da extensão da contaminação destas substâncias nos corpos hídricos brasileiros é de grande relevância, uma vez que há apenas um relato na literatura sobre quantificação destas substâncias no país. Neste trabalho, desenvolvido por Kurster e colaboradores (2009) na região metropolitana do Rio de Janeiro, o grupo analisou um total de 20 amostras coletadas ao longo do rio Paraíba

do Sul, realizadas em 2 etapas, nos meses de março e abril de 2007. Como resultado, os fitoestrógenos DAID e GEN estiveram presentes em apenas 2 e 4 amostras analisadas, respectivamente. No entanto, os níveis detectados chegaram a 276 e 366 ng. L⁻¹ para DAID e GEN, respectivamente.

1.3.1.2. Métodos de quantificação de fitoestrógenos de soja em matrizes ambientais

Considerando-se os efeitos potenciais dos fitoestrógenos e a sua possível presença no ambiente, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos para a determinação destas substâncias no ambiente aquático (AURIOL et al, 2006). A grande preocupação em avaliar os níveis destes contaminantes em águas superficiais levou uma série de países a monitorar a presença destes fitoestrógenos e inúmeros outros AE nas mais diversas matrizes ambientais. Diversos estudos já foram realizados pelo mundo para a avaliação da ocorrência destes fitoestrógenos, utilizando variadas técnicas e diversos procedimentos, compilados na Tabela 4.

De forma geral, os métodos para a quantificação destas moléculas em efluentes e afluentes de ETE, efluentes agrícolas e água de rio incluem filtração em membrana de fibra de vidro, seguida por extração em fase sólida utilizando-se diversos tipos de fase extratoras e, por fim, a análise propriamente dita por cromatografia líquida.

Utilizam-se diferentes volumes de amostras em cada um dos métodos propostos, levando-se em conta as concentrações estimadas para cada matriz estudada e também os limites instrumentais para cada equipamento utilizado.

Na maioria dos trabalhos, o processo de validação destes métodos, no entanto, incluem experimentos de recuperação realizados em um único nível de fortificação (KANG;PRICE; HICK, 2006; KAWANISHI et al., 2004), além de níveis de fortificação estudados que diferem em até duas ordens de grandeza daqueles quantificados nas amostras ambientais (LAGANÀ et al., 2004; BACALONI et al., 2005; KUSTER et al., 2009). Há também estudos de recuperação do método utilizando-se água ultra pura para avaliação deste importante parâmetro de validação (ERBS et al., 2007; KUSTER et al., 2009).

Outro aspecto importante sobre a forma de validação utilizada nos trabalhos existentes na literatura, diz respeito às diversas formas de cálculos dos limites de detecção e quantificação. No geral, são reportados apenas os limites de detecção do sistema cromatográfico, obtidos freqüentemente pela relação sinal/ruído. Raramente são apresentados os limites de quantificação e quando reportados, referem-se também ao sistema analítico e não ao método como um todo. Dessa forma, a maior parte dos trabalhos carece desta importante ferramenta de validação.

Tabela 4: Alguns métodos para análise e concentrações encontradas para fitoestrógenos em matrizes ambientais

Analito	Concentração encontrada (ng L ⁻¹)	Matriz	Local	Técnica	Volume de amostra	SPE/ Eluente	Rec (%)	LQ (ng L ⁻¹)	LD (ng L ⁻¹)	Ref.		
GEN	3-5	Água de rio	Itália	LC-MS/MS	1L	Oasis HLB 200mg/ 10mL CH ₃ OH	97	nr	1	BACALONI et al., 2005 ²¹		
	160-954	ETE-Afluente			100 mL		94	nr	6			
	7-22	ETE-Efluente			250mL		97	nr	5			
DAID	2-4	Água de rio			1L		93	nr	0,5			
	97-1685	ETE-Afluente			100mL		95	nr	5			
	5-81	ETE-Efluente			250mL		93	nr	3			
GEN	nd	Água de rio	Austrália	LC-MS/MS	600mL	Oasis HLB 200mg/ 10mL CH ₃ OH	89	nr	5	KANG;PRICE; HICK, 2006.		
	80	ETE-Afluente			100mL		93	nr	10			
DAID	7	Água de rio			600mL		92	nr	3			
	390	ETE-Afluente			100mL		87	nr	5			
GEN	4-7	Água de rio	Itália	LC-MS/MS	1L	Oasis HLB 200mg/ 7mL CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH (50:50 v/v)	98	nr	0,7	LAGANÀ et al., 2004.		
	195-384	ETE-Afluente			100mL		100	nr	4,3			
	15-83	ETE-Efluente			250mL		99	nr	1,3			
DAID	2-3	Água de rio			1L		100	nr	0,2			
	75-120	ETE-Afluente			100mL		99	nr	3,5			
	7-16	ETE-Efluente			250mL		97	nr	2,5			
GEN	74	Água de rio	Portugal / Rio Douro	HPLC-DAD	2L	Oasis HLB 500mg/ 20mL CH ₂ Cl ₂ : CH ₃ OH (50:50 v/v)	95-96	9,8	3,2	RIBEIRO et al., 2007		
DAID	29		Portugal/ Rio Sado		2L		97-99	31,7	10			
GEN	100-320						95	26,0	8,6	RIBEIRO et al., 2009		
DAID	160-500						98	25,0	8,3			

Tabela 4: Continuação

Analito	Concentração encontrada (ng L ⁻¹)	Matriz	Local	Técnica	Volume de amostra	SPE/ Eluente	Rec (%)	LQ (ng L ⁻¹)	LD (ng L ⁻¹)	Ref.
GEN	nd	Água de rio	Suiça	LC–MS/MS	1 L	Oasis HLB 200 mg/ 10mL MeOH	68-92	nr-	2,2	ERBS et al., 2007
	nq-14	Efluente agrícola					77-87		2,0	
DAID	nq	Água de rio					83-99		1,8	
	5-13	Efluente agrícola					84-103		1,0	
GEN	143.400	Água de Rio	Japão	HPLC-DAD	500 mL	Waters Sep-Pak Plus C18 Env /2mL DMSO	52-87	nr	nr	KAWANISHI et al., 2004
DAID	42.900							nr	nr	
GEN	3,96–366	Água de Rio	Brasil (Rio de Janeiro)	LC-MS/MS	500 mL	LiChrounRP-18 500 mg/5mL MeOH+5mL MeOH 2%NH ₄ OH	94	nr	2,46	KUSTER et al., 2009
DAID	36,2–276						111	nr	0,95	

nr = não reportado; nd= não detectado, nq = não quantificado, abaixo do LQ,

Os dados apresentados na Tabela 4, indicam valores preocupantes para os fitoestrógenos de soja no ambiente, levando-se em conta que os efeitos que estas substâncias podem apresentar a longo prazo e a associação com outros contaminantes ambientais não são totalmente esclarecidos (KUSTER et al., 2009). Estes fitoestrógenos ocorrem em uma vasta faixa de concentrações, que variam em função das matrizes analisadas, das características ambientais e climáticas dos locais estudados, das singularidades culturais da população e, principalmente, da tecnologia empregada no tratamento de esgoto em cada local analisado.

Chama a atenção o grande índice de remoção destes contaminantes nos países europeus, fruto de um reconhecido trabalho sanitário para a proteção dos mananciais em virtude da escassez deste recurso e da grande demanda de água pela alta taxa de urbanização existente nestes países.

Contraditoriamente, pode-se observar o alarmante índice destas substâncias em um rio japonês, da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$, consequência da característica oriental em consumir grandes quantidades de alimentos a base de soja aliada à possível atividade industrial que contribui com lançamentos destas substâncias no ambiente (KAWANISHI et al., 2004).

Por fim, há um único trabalho que reporta a quantificação destes fitoestrógenos em matrizes ambientais brasileiras. As concentrações encontradas no estudo de rios do estado do Rio de Janeiro chegaram a mais de 350 ng L^{-1} destas substâncias; atribuídas a despejos de esgoto sem tratamento e a baixa eficiência de remoção destes compostos pelas estações de tratamento de esgoto, cujos efluentes são despejados nestes corpos d'água. Dessa forma, estes valores podem compreender um risco real ao ambiente aquático e, futuramente, ao ser humano (KUSTER et al., 2009).

A maioria dos métodos analíticos utilizados para a quantificação destas moléculas utiliza a técnica LC-MS/MS, conseguindo limites de detecção e quantificação menores que aqueles alcançados pelos métodos que utilizam detector UV, como o desenvolvido por Ribeiro e colaboradores (2007).

No entanto, LC-MS/MS é um equipamento oneroso e não está disponível no IQ/UNESP. Assim sendo, neste trabalho optou-se pelo uso da pré-concentração proporcionada pelo uso de SPE (Extração em Fase Sólida)

aliada a análise por HPLC/UV como base do método para análise destes fitoestrógenos nas matrizes ambientais de interesse.

1.4. Área de estudo - Unidade de Gerenciamento dos Recursos Hídricos Tietê-Jacaré (URGHI 13)

O estado de São Paulo é atualmente dividido em 22 Unidades de Gerenciamento dos Recursos Hídricos, URGHI. Dentre estas, merece destaque a Bacia Hidrográfica do Tietê-Jacaré, URGHI-13 (Figura 6). Esta unidade localiza-se na porção central do Estado e é definida pelas bacias hidrográficas de cursos d'água afluentes ao rio Tietê no trecho de cerca de 140 km, entre as barragens das UHEs de Ibitinga e Barra Bonita, dos quais se destacam os rios Jacaré-Pepira, Jacaré-Guaçu e Jaú pela margem direita e os rios Bauru e Lençóis pela margem esquerda. (SÃO PAULO, 2010a)

A URGHI-13 é composta por 34 municípios (Figura 7) dos quais 16 estão totalmente inseridos dentro de sua área e 18 possuem parte de seus territórios em UGRHIs vizinhas. Esta unidade abriga mais de 3 % da população do Estado sendo que 96 % dos habitantes vivem em áreas urbanas (HIRATA; SUHOGUSOFF; FERNANDES, 2007).

No aspecto econômico, evidenciam-se as grandes usinas de açúcar e álcool. A cultura da laranja e a pecuária também são importantes, sendo que esta última está voltada para o abastecimento da indústria agro alimentar. A indústria de calçados, bem como a de máquinas e equipamentos, além do tecnopólo na região de São Carlos complementam o cenário das atividades econômicas existentes nesta região (SÃO PAULO, 2008).

Os municípios de Araraquara, Bauru, Jaú e São Carlos respondem juntos por mais da metade da população da UGRHI, totalizando 881.841 habitantes (61,37% da população da UGRHI-13) (COOPERATIVA DE SERVIÇOS, PESQUISAS TECNOLÓGICAS E INDUSTRIAIS, 2008). Na Figura 7, apresentam-se os principais municípios e mananciais hídricos da UGRHI-13.

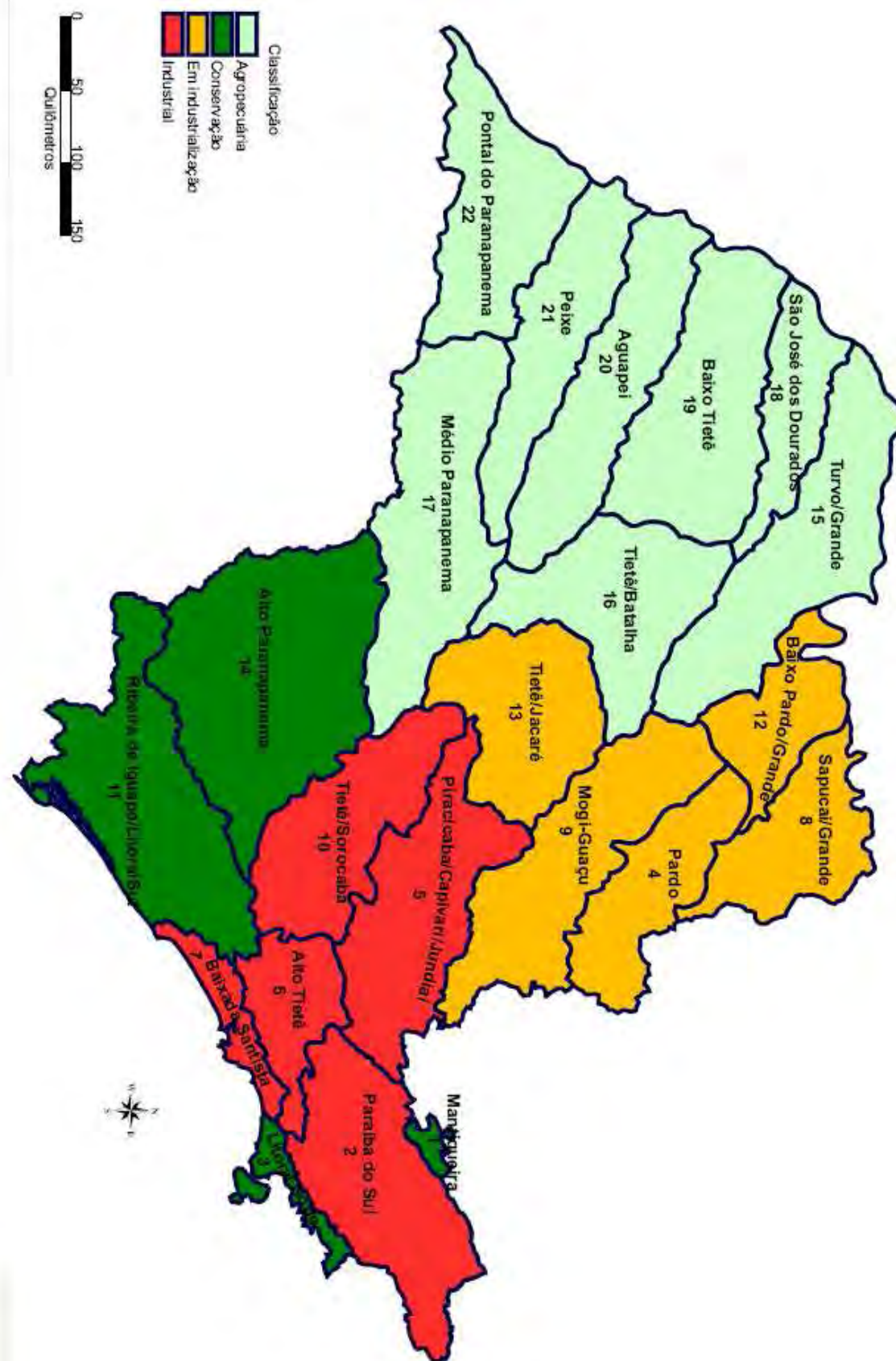


Figura 6: Classificação das Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos do estado de São Paulo (FUNDAÇÃO SISTEMA ESTADUAL DE ANÁLISE DE DADOS, 2003)

O índice de abastecimento público na UGRHI 13 é superior a 99% e, apesar deste alto índice de abastecimento, no que diz respeito à disponibilidade e às demandas por água, pode-se dizer que a situação da UGRHI 13 é delicada. A maior parte da demanda utiliza recursos hídricos superficiais e para o abastecimento público, os recursos hídricos subterrâneos são mais utilizados, cerca de 70%; sendo que em quatro das seis Sub-Bacias que compõe a bacia hidrográfica do Tietê-Jacaré, a relação demanda/disponibilidade já é crítica quando se considera a disponibilidade dos aquíferos confinados (COOPERATIVA DE SERVIÇOS, PESQUISAS TECNOLÓGICAS E INDUSTRIAIS, 2008).

Desde o ano de 1999, o Relatório de Situação dos Recursos Hídricos do Estado de São Paulo – Relatório Zero (SÃO PAULO, 2000) aponta os problemas desta UGRHI, destacando dentre eles (SÃO PAULO, 2010a):

- Elevadas demandas de água devido à irrigação e ao setor sucro alcooleiro, principalmente no médio Jacaré-Guaçu e Ribeirão dos Lençóis;
- Riscos de rebaixamento acentuado da superfície do lençol subterrâneo nas áreas urbanas de Baurú e Araraquara;
- Risco de poluição das águas subterrâneas nas regiões de Bauru, Araraquara, Brotas e arredores;
- Baixo índice de cobertura de tratamento de esgotos;
- Média a alta suscetibilidade a inundações nas sub-bacias dos rios Jacaré-Guaçu e Jacaré-Pepira, com agravamento nas áreas urbanizadas
- Suscetibilidade muito alta a erosão nas regiões noroeste e sudeste da UGRHI

Nesta UGRHI, observam-se índices de coleta de esgoto muito satisfatórios, em torno de 94 % do esgoto produzido. No entanto, o índice de tratamento é da ordem de 35 % do total do esgoto gerado, índice muito baixo tendo-se em vista o montante coletado (SÃO PAULO, 2009) (Tabela 5).

Tabela 5: Dados de saneamento e população dos municípios que compõem a URGHI-13 (adaptada de FUNDAÇÃO SISTEMA ESTADUAL DE ANÁLISE DE DADOS, 2010; SÃO PAULO, 2010b)

Município	Abastecimento de Água: % da população atendida	Coleta de esgoto: % da população atendida	Tratamento de esgoto: % tratado em relação ao coletado	População (FUNDAÇÃO SISTEMA ESTADUAL DE ANÁLISE DE DADOS) 2010
Agudos	92	86	nr	32.981
Araraquara	99	97	100	203.773
Arealva	100	98	100	7.598
Areiópolis	100	100	100	10.720
Bariri	100	100	nr	32.141
Barra Bonita	98	100	12	39.212
Bauru	100	96	<9	366.769
Boa Esperança do Sul	nr	98	100	14.396
Bocaina	100	98	100	11.109
Boracéia	100	100	100	4.308
Borebi	100	100	25	2.443
Brotas	100	95	100	23.268
Dois Córregos	100	100	10	25.850
Dourado	96	93	nr	9.444
Gavião Peixoto	100	100	nr	4.618
Iacanga	100	90	100	9.370
Ibaté	nr	80	100	31.610
Ibitinga	100	100	nr	53.478
Igaraçu do Tietê	90	100	80	24.539
Itaju	100	100	100	2.806
Itapuí	nr	80	nr	12.314
Itirapina	90	54	72	15.255
Jaú	100	100	85	134.415
Lençóis Paulista	100	100	nr	63.767
Macatuba	100	100	100	18.134
Mineiros do Tietê	nr	100	nr	13.400
Nova Europa	nr	98	100	9.905
Pederneiras	100	96	100	42.111
Ribeirão Bonito	nr	96	nr	12.238
São Carlos	100	98	85	230.410
São Manuel	95	92	100	40.755

Tabela 5 (continuação)

Município	Abastecimento de Água: % da população atendida	Coleta de esgoto: % da população atendida	Tratamento de esgoto: % tratado em relação ao coletado	População (FUNDAÇÃO SISTEMA ESTADUAL DE ANÁLISE DE DADOS) 2010
Tabatinga	nr	97	22	14.999
Torrinha	nr	100	nr	9.821
Trabiju	nr	90	100	1.454
nr-não reportado				

Dessa forma, o principal problema da Bacia do Tietê-Jacaré é, sem dúvida, a poluição dos cursos d'água em decorrência da falta de destinação adequada dos resíduos sólidos e tratamento de esgotos domésticos e industriais. Somente um dos rios de maior porte que atravessam a região – o Jacaré Pepira - ainda não apresentam grandes danos causados pela poluição. (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2003)

O comprometimento dos rios urbanos em razão da degradação das áreas urbanas e da má gestão ambiental nos municípios está presente na maioria dos municípios, atingindo praticamente toda a bacia, acarretando o despejo de água contaminada nos rios principais e contribuindo significativamente para a degradação do meio ambiente local (TUNDISI et al., 2008).

Com relação às águas subterrâneas, um cuidado ainda maior deve ser tomado, uma vez que esta região se caracteriza como uma área de recarga do aquífero Guarani. Deve-se ressaltar, ainda, um comprometimento parcial dos aquíferos nesta região pelo uso desordenado do solo e despejo de resíduos, além de déficit na recarga do mesmo pela deficiência da vegetação e aumento da contaminação deste importante recurso (TUNDISI et al., 2008).

1.4.1. O município de Araraquara

Configura-se a atividade sucroalcooleira e agroindustrial como os principais setores econômicos de Araraquara, aliado a química fina, alimentos

e, juntamente com a cidade de São Carlos, destaca-se um importante tecnopolo emergente (MACEDO, 2007).

Com a população estimada para o ano de 2010 de mais de 200 mil habitantes, configura-se como a terceira maior população urbana da bacia hidrográfica a qual está inserida. Um destaque para este município é o fato de possuir altos índices de desenvolvimento sanitário, com abastecimento de água acima de 99%, com 97% do esgoto coletado e tratamento total do montante coletado (SÃO PAULO, 2008).

1.4.1.1. Tratamento de água (ARARAQUARA, 2010a)

O município de Araraquara conta atualmente com 2 estações de tratamento de água, denominadas ETA-Fonte e ETA-Paiol. O processo de tratamento de água para o consumo humano é relativamente simples, sendo composto por uma primeira etapa de coagulação com a adição de cloreto férrico e cal. Após este processo, a água segue para tanques de decantação, sendo filtrada posteriormente por filtros compostos de carvão ativado, areia e cascalho. Por fim, antes de ser disponibilizada para consumo, a água é desinfetada pela adição de cloro gasoso e fluoretada (Figura 8).

A captação de água para distribuição na rede pública é realizada por aduções em pontos de água superficial e subterrânea. O município conta atualmente com 3 pontos de captação superficial e 12 poços subterrâneos.

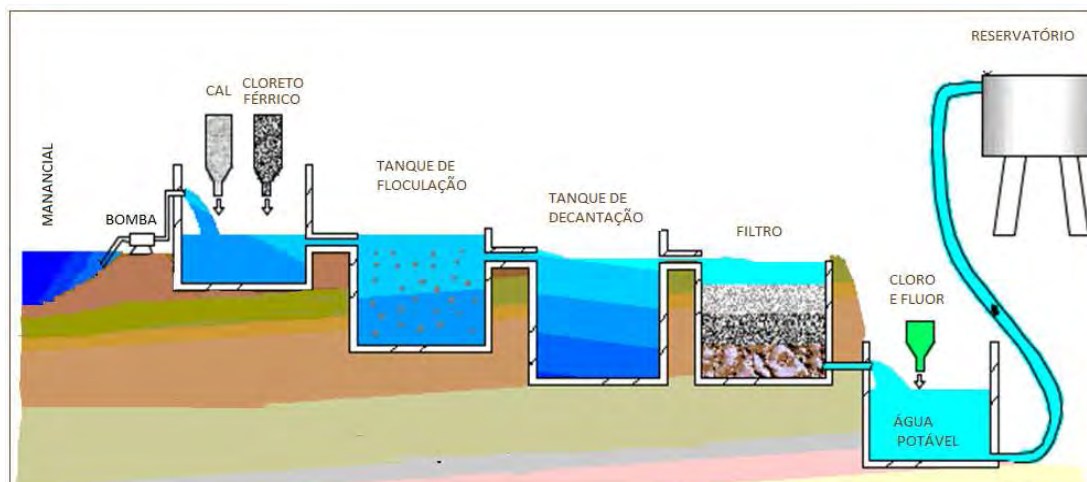


Figura 8: Fluxograma do tratamento de água do município de Araraquara (ADAPTADO DE UENF, 2010)

1.4.1.2 Ribeirão das Cruzes

O Ribeirão das Cruzes é enquadrado como Classe 4 na classificação segundo a resolução CONAMA 357/2004, desembocando no Rio Jacaré-Guaçu (SCALIZE et al., 2004), sendo responsável pela maior captação de água bruta do município de Araraquara, cerca de 1/3 do total, além de ser um dos interceptores da rede coletora da Estação de Tratamento de Esgoto de Araraquara (ETE).

O Ribeirão das Cruzes está sujeito a diversas influências, tipicamente antrópicas, como: a) ausência de mata ciliar; b) áreas altamente urbanizadas; c) pesque-pagues; e d) áreas de pastagens (LOT, 2006). No entanto, a principal causa de degradação dos corpos d'água consiste em supostas ligações clandestinas de esgoto nas galerias de águas pluviais, despejos irregulares de efluente no ribeirão e ocupação desordenada das margens. Além disso, deve-se considerar a questão da poluição difusa, ocasionada principalmente pelo escoamento superficial sobre áreas urbanas, responsável pelo carreamento de resíduos dos logradouros para o corpo d'água (MACEDO; TEIXEIRA; RIOS, 2008).

1.4.1.3. Tratamento de esgoto

As tecnologias de tratamento de esgoto são desenvolvidas tendo por principal referência o lançamento em corpos d'água, levando-se em conta a fragilidade dos ecossistemas aquáticos e da necessidade de preservação dos usos múltiplos da água. Assim, necessita-se de substancial redução da carga de matéria orgânica biodegradável e de sólidos em suspensão, de macronutrientes, de remoção ou inativação de diversos grupos de organismos patogênicos, além do controle das concentrações de inúmeros constituintes químicos com propriedade tóxicas à saúde humana e aquática (FLORÊNCIO et al., 2006).

Para atender estas necessidades, o município de Araraquara conta com duas Estações de Tratamento de Esgotos: Araraquara e a Bueno de Andrada, atendendo a mais de 98% dos estabelecimentos municipais e respondendo pelo tratamento de 100% dos esgotos recolhidos.

A ETE de Araraquara, localizada na Rodovia SP 255 às margens do Ribeirão das Cruzes, é constituída de dois módulos com capacidade total de tratamento de 800 litros de esgotos por segundo. O tratamento do esgoto bruto é realizado por um gradeamento do afluente, no qual é retirado os maiores detritos carregados pelo corpo d'água. Posteriormente, o esgoto atravessa caixas de areias e peneiras de espaçamentos menores, cujos resíduos são depositados em caçambas por esteiras mecanizadas.

Logo após este processo, o esgoto tem sua vazão aferida e é enviado para desarenadores, cuja função é separar a areia do líquido. Assim, o esgoto pré-processado é então levado a Lagoas Aeradas, cujos aeradores movimentam a água promovendo a oxigenação da mistura, eliminando gases indesejáveis e acelerando o processo de decomposição. Por fim, o esgoto é enviado para as Lagoas de Sedimentação, onde as partículas sólidas ainda presentes na mistura se depositam no fundo da Lagoa, as quais vão se transformando em lodo ao longo do processo de tratamento. O efluente das lagoas de sedimentação é, enfim, enviado para o Ribeirão das Cruzes (SCALIZE, 2003; ARARAQUARA, 2010b) (Figura 9).

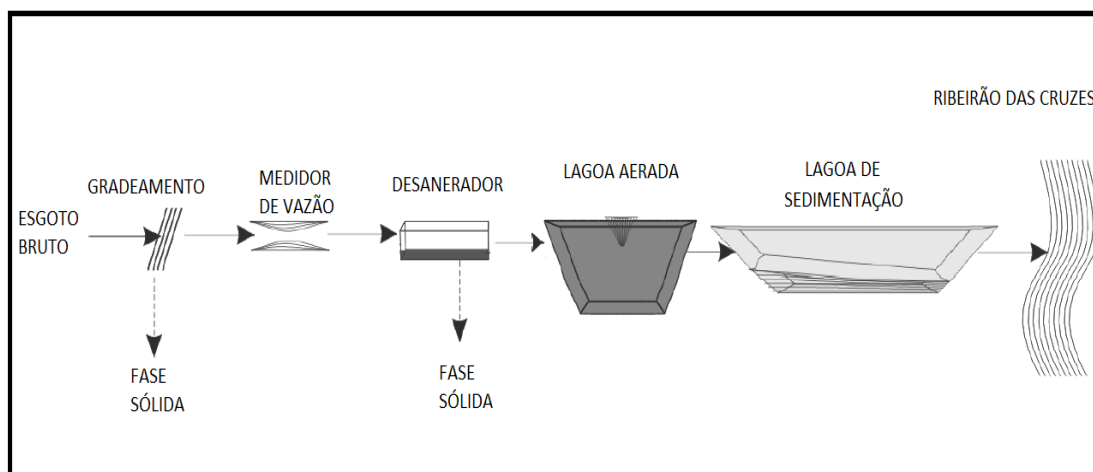


Figura 9: Fluxograma do processo de tratamento de esgoto do município de Araraquara (ADAPTADO DE VON SPERLING, 2006 apud FLORENCIO, 2006).

De forma geral, a eficiência da ETE – Araraquara, comparando as características de DBO do afluente e efluente, compreende a faixa de 80 a 84% (PIERRI, 2001 apud SCALIZE; 2004, SCALIZE, 2003), podendo ser considerada uma eficiência satisfatória.

Obviamente, a estação de tratamento de esgoto em questão contribui significativamente para o meio ambiente local, uma vez que o efluente do processo de tratamento contribui com as altas cargas orgânicas determinadas neste rio (MACEDO; TEIXEIRA; RIOS, 2008), não obstante a sugestão que a ETE-Araraquara parece interferir pouco na qualidade da água do Ribeirão das Cruzes; uma vez que após o lançamento do efluente no corpo d'água ocorre uma redução gradativa das concentrações devido a fenômenos de autodepuração, diluição e sedimentação (MENDONÇA et al, 2005).

2. OBJETIVOS

Considerando-se o aumento do consumo de soja e derivados no Brasil, principalmente na última década; que os efluentes domésticos podem conter os fitoestrógenos de soja em concentrações que podem representar risco à biota aquática; que os sistemas de tratamento de esgoto mais utilizados no Brasil podem não ser eficientes para a eliminação destas substâncias e que no Brasil existe poucos dados sobre a ocorrência de fitoestrógenos nos corpos hídricos, este trabalho tem como objetivo geral contribuir para a geração de conhecimento sobre a ocorrência e dispersão de fitoestrógenos na Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos Tietê-Jacaré (UGRHI-13), onde está inserido o município de Araraquara, tendo sido objetivos específicos deste trabalho:

- ➔ Otimizar e validar método para determinação de genisteína e daidzeína em efluente de ETE, água subterrânea, água potável e água de rio.
- ➔ Aplicar o método validado a amostras provenientes das ETA e ETE de Araraquara, por um período de seis meses para avaliar o comportamento sazonal destes contaminantes

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Otimização e validação de método

3.1.1. Materiais e equipamentos

- Metanol e Acetonitrila grau HPLC (Tedia e JT Baker)
- Ácido Fosfórico 85% p.a., Synth
- Ácido Acético Glacial, Mallinckrodt
- Hidróxido de Amônio p.a., 28% (m/m) Synth
- Água ultra pura (sistema Milli-Q, Millipore)
- Genisteína e Daidzeína 98% pureza, Sigma-Aldrich
- Nitrogênio gasoso 99,9% de pureza AGA
- Cartuchos para SPE Strata-X (divinilbenzeno-vinilpirrolidona) 500 e 200mg de sorvente, 6mL de reservatório, Phenomenex.
- Balança analítica Mettler Toledo AG245 com precisão 0,01mg
- Manifold para SPE de 20 pontos – Agilent Technologies,
- Conjunto de Filtração Wheaton
- Filtro de fibra de vidro ϕ 47 mm, porosidade 0,45 μ m Sartorius
- Membrana filtrante, poro de 0,45 μ m, Φ 13 $\pm$ 0,5mm, Millipore,
- Bomba tipo hidrovácuo MA 053 Marconi
- Balões volumétricos: 10 e 25 mL Classe A
- Micropipetas Eppendorf (10-100 μ L), LabMate (100-1000 μ L) e Tedia pet (20-200 e 100-1000 μ L)
- Colunas para HPLC C18: Phenomenex (4,6 mm x 150 mm x 5 μ m) e Agilent (4,6 mm x 250 mm x 5 μ m)
- Óxido de Alumínio neutro, Sigma-Aldrich
- Silicagel 60 (70-230 mesh ASTM) Sigma-Aldrich

3.1.2. Preparação das soluções padrão dos fitoestrógenos.

A preparação da solução estoque dos fitoestrógenos foi realizada pesando-se em uma balança analítica a massa de 1,02 e 1,03 mg dos padrões de GEN e DAID, respectivamente. Estas massas foram dissolvidas em metanol, transferindo-se quantitativamente para um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com metanol. Soluções de trabalho foram preparadas por diluições sucessivas destas soluções estoque, utilizando-se

sempre metanol como solvente. As soluções estoque e de trabalho foram utilizadas por um período máximo de 30 dias.

3.1.3. Modificação do método cromatográfico para análise por HPLC/UV

Inicialmente, todas as análises cromatográficas (HPLC/UV) foram efetuadas em um sistema Varian Pro-Star UV-DAD. Uma vez que este sistema HPLC/UV não apresentava detectabilidade adequada para o estudo pretendido, foi utilizado um novo sistema HPLC/UV (Varian LC 920) para a continuidade do trabalho e, a partir de então, todas as análises passaram a ser efetuadas neste equipamento.

O método cromatográfico utilizado no sistema Varian ProStar foi realizado segundo preconizado por Zocolo (2009), que incluía coluna HPLC C-18 (Phenomenex, 4,6 mm x 150 mm x 5 µm) dotada de pré-coluna (Phenomenex, 30 mm x 4,6 mm) e utilizando como fase móvel acetonitrila/água em gradiente variando de 10 a 65% de ACN em 10 min. Neste gradiente, os tempos de retenção eram de 8,29 e 11,42 min para DAID e GEN, respectivamente. Entre os anos de 2008 e 2009, a ACN sofreu um grande aumento de preço e, assim sendo, optou-se por substituir a ACN por metanol (MeOH) na otimização do método cromatográfico para o sistema Varian LC 920.

O desenvolvimento do gradiente utilizando o novo solvente na fase móvel foi adaptado do método utilizado no sistema ProStar, no qual 10% de acetonitrila da fase móvel correspondia a, aproximadamente, 15% de metanol conforme o nomograma apresentado na Figura 10 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). Testes preliminares indicaram a fase móvel de composição inicial MeOH:H₂O 20: 80 (v/v) como ideal, ajustando o tempo de corrida necessário para cada amostra, sendo a fração orgânica incrementada linearmente até 100% em 15 min. Neste gradiente, os tempos de retenção dos analitos foram de 11,3 e 12,3 min para DAID e GEN, respectivamente, o que corresponde a apenas um pequeno aumento do tempo total de análise quando comparado ao método que utilizava acetonitrila. Observa-se também uma aproximação dos picos de interesse utilizando-se MeOH como solvente na fase

móvel. A elevação da porcentagem de metanol a 100 % tem como finalidade garantir que todas as substâncias que eventualmente possam estar presentes na amostra sejam totalmente eluídas da coluna cromatográfica (BACALONI et al., 2005).

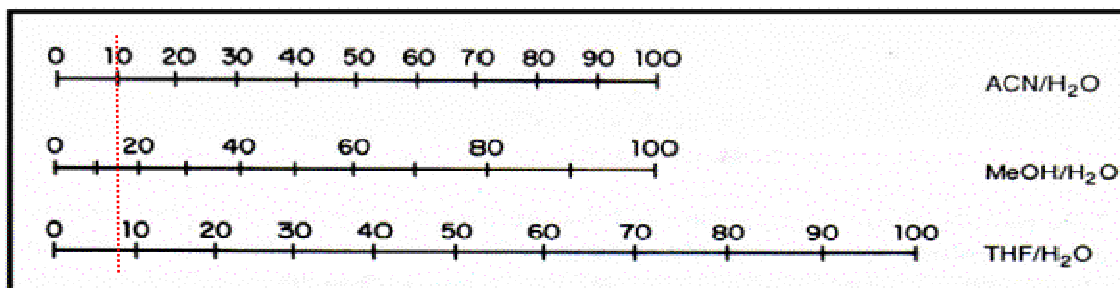


Figura 10: Nomograma de força de solvente para fase reversa em HPLC. (Adaptado de SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997)

Tanto a água quanto o metanol utilizado como fase móvel foram acidificados com 0,1% de Ácido Acético, tendo como finalidade estabilizar os silanóis residuais da coluna na forma protonada, bem como manter os analitos também nesta mesma forma, minimizando a possibilidade de assimetria posterior dos picos cromatográficos.

Sabe-se que um aumento na temperatura da coluna cromatográfica de 1°C resulta em um decréscimo de 1 a 2% no tempo de retenção dos analitos, sendo também considerado um importante parâmetro para mudança de espaçamentos de bandas e aumento da resolução cromatográfica (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). Assim, desde que uma mudança nos tempos de retenção e também na seletividade pode ser conseguida com pequenas variações na temperatura, é desejável que esta seja mantida constante durante análises de rotina utilizando-se HPLC (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Portanto, como o equipamento utilizado neste trabalho é dotado de forno para controle de temperatura da coluna cromatográfica, esta foi mantida constante a 30°C, garantindo análises com pequenos desvios nos tempos de retenção e nas áreas dos analitos. Este valor foi escolhido uma vez que esta temperatura é sempre maior que aquela do ambiente onde o equipamento se encontra, sendo facilmente alcançada e evitando que a coluna sofra oscilações consideráveis na temperatura durante a realização dos experimentos.

No sistema ProStar-DAD a detecção foi realizada em varredura entre 200 e 400nm. Para o sistema LC-920, foi necessária a escolha dos comprimentos de onda para a detecção, uma vez que este sistema não conta com arranjo de diodos. Para isso, utilizaram-se os espectros de absorção traçados para os dois fitoestrógenos (Figuras 11a e 11b). As medidas espectrofotométricas de absorbância são normalmente feitas em um comprimento de onda correspondente a um pico de absorção dos analitos, no qual a variação da absorbância por unidade de concentração é a maior possível, obtendo-se, assim, uma maior sensibilidade (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 1998). Desta maneira, foram escolhidos os comprimentos de onda correspondentes aos máximos de absorção para cada substância, ou seja, 260 e 249 nm, para GEN e DAID, respectivamente. O segundo comprimento de onda foi utilizado nos cromatogramas demonstrados neste trabalho.

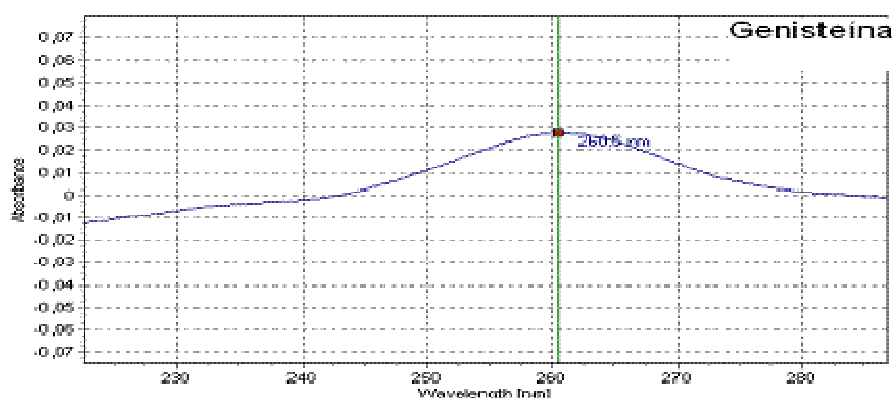


Figura 11a: Espectro de absorção (UV) para genisteína, obtido no sistema Varian ProStar para solução de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

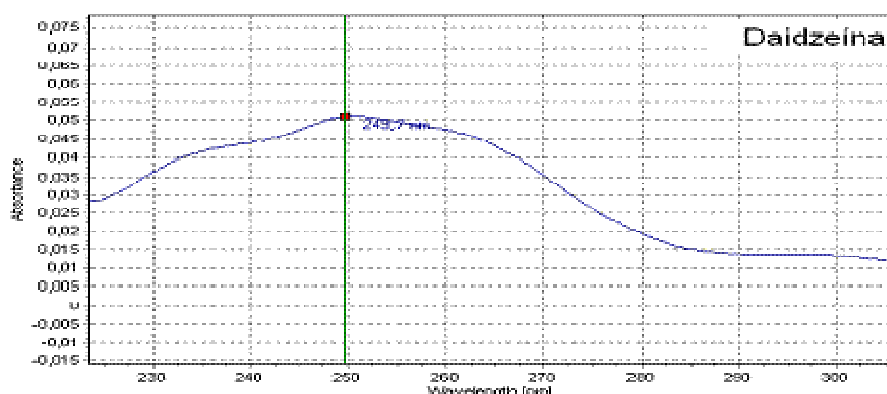


Figura 11b: Espectro de absorção (UV) para daidzeína, obtido no sistema Varian ProStar para solução de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.1.4. Validação de métodos cromatográficos.

A validação analítica é uma etapa imprescindível em qualquer estudo analítico e/ou ambiental, pois permite avaliar a confiabilidade dos resultados obtidos.

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e aplicação (RIBANI et al., 2004). São muitas as definições utilizadas para o termo “validação”, aqui destacamos duas delas, que consideramos mais relevantes. A EURACHEM (1998), um organismo não governamental que congrega a comunidade de Químicos Analíticos da Europa, considera que “validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer”. Em complementação, a ANVISA (2003) postula que “a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”

Dessa forma, a validação analítica pode ser interpretada como um processo dinâmico e constante que começa nas fases de seleção, desenvolvimento e otimização do método e na qualificação dos instrumentos, materiais e pessoal e continua da fase de experimentos e transferência do método. Um processo de validação bem definido e documentado fornece evidência objetiva de que o sistema e o método são adequados ao uso pretendido (BARROS, 2002), capaz de engendrar informações confiáveis que possam refletir a realidade de uma determinada matriz em estudo (BRITO et al., 2003).

3.1.5. Avaliação da resposta do sistema cromatográfico LC-920

Para avaliação da resposta de um sistema analítico, alguns parâmetros são fundamentais, como o intervalo de resposta linear, a sensibilidade (inclinação da curva resposta vs concentração) e os limites de detecção e de quantificação instrumental. Inicialmente, esta avaliação pode ser feita pelo uso de soluções padrão dos analitos em diversas concentrações. Posteriormente é

importante que seja avaliada a influência da matriz na resposta do sistema analítico.

3.1.5.1. Linearidade

“A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação” (RIBANI et al., 2004).

Uma forma incomum, entretanto simples e muito eficiente para a avaliação da linearidade pode ser alcançada através da aplicação do Teste de Huber (também chamado de gráfico de linearidade), conforme descrito por Valente, Augusto e Riedo (2010). Nesta abordagem, estabelece-se um valor central, correspondente à mediana da série de valores Área/concentração obtidos experimentalmente, definindo-se um intervalo de confiança acima e abaixo deste. Para o estabelecimento deste ponto central, prefere-se a mediana à média, porque o primeiro não é afetado por valores anômalos.

A sistemática para a definição destes valores é feita calculando as razões entre áreas associadas a cada analito e sua respectiva concentração (A/C). Calcula-se a mediana desses valores (md) e, posteriormente, as diferenças absolutas entre cada valor de A/C e a mediana calculada. Calcula-se a mediana destas diferenças (mad) e estabelecem-se os intervalos de confiança (IC), definido como:

$$IC = k \cdot mad$$

Onde k é um fator que pode variar entre 2 e 8.

Assim, tem-se o Limite superior (ICs) definido como

$$ICs = md + k \cdot mad$$

e o Limite inferior (ICi) definido como

$$ICi = md - k \cdot mad.$$

Após atribuído o valor para a constante k, é possível com estes dados gerar um gráfico de Área/concentração por concentração, com o intervalo de confiança associado.

Posteriormente, constrói-se as curvas analíticas (Área vs concentração) e analisados os resíduos, obtidos pela equação:

$$R_s = 100 \cdot (A_{int} - A_{exp}) / A_{int}$$

Onde R_s é o resíduo estatístico dos resultados, A_{int} é a área calculada pela curva analítica e A_{exp} é a área obtida experimentalmente (média de 3 análises, para cada concentração). Este valor representa quanto as áreas interpoladas se afastam das experimentais, dando suporte à escolha do valor de k , utilizado para determinar o intervalo de confiança na curva de linearidade (VALENTE; AUGUSTO; RIEDO, 2010).

Dessa forma, quando o coeficiente de correlação calculado para esta curva não for diferente da unidade, podemos afirmar que os dados apresentam linearidade aceitável (BRITO et al., 2003).

Para o estudo de linearidade do sistema e a construção da curva analítica, foram obtidas as soluções de trabalho com concentrações de 0,005; 0,01; 0,02; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,05; 0,5; 1; 5; 10 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos padrões de GEN e DAID a partir das soluções estoques. Cada solução foi injetada em triplicata no sistema LC-920, sob as condições de análise otimizadas e os resultados tratados pela aplicação do Teste de Huber.

3.1.5.2. Precisão instrumental

A precisão instrumental mede a dispersão dos dados relativos às medidas sucessivas de determinado instrumento analítico. Este parâmetro pode ser mensurado realizando-se injeções repetitivas, seqüenciais da mesma amostra, seguida pela média dos valores da área do pico e determinando a estimativa do desvio padrão relativo de todas as injeções. Assim, a literatura preconiza que este desvio padrão calculado não ultrapasse o valor de 1% para os valores de área (RIBEIRO et al., 2007).

Este parâmetro foi avaliado através de injeções sucessivas dos padrões 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de GEN e DAID em 10 replicatas.

3.1.5.3. Limites Instrumentais

A determinação dos limites instrumentais foi definida a partir dos experimentos de linearidade obtidos pelo Teste de Huber. Dessa forma, o limite de quantificação instrumental definiu-se como a menor concentração dos analitos que se encontra dentro da faixa linear de concentrações e adotou-se como limite de detecção a concentração mais baixa fora da linearidade do sistema.

3.1.6. Otimização do Preparo da amostra

3.1.6.1. Testes preliminares

Para o desenvolvimento do método e subsequente aplicação em amostras de água, optou-se por utilizar cartuchos de extração em fase sólida Strata-X, tendo como finalidade a pré-concentração dos analitos de interesse e uma primeira simplificação da amostra. Este cartucho polimérico utiliza como sorvente o divinilbenzeno-vinilpirrolidona (Figura 12), cujo mecanismo de retenção consiste em ligações do tipo π - π e também ligação de hidrogênio, resultando em seletividade para compostos polares e aromáticos, compatíveis com as características dos analitos de interesse (PHENOMENEX, 2010).

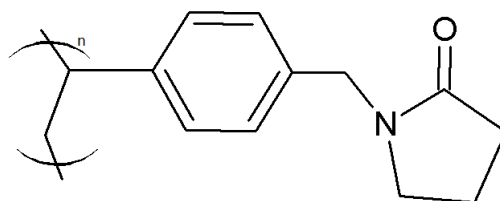


Tabela 6: Locais de obtenção das amostras para a otimização e validação do método

Matriz	Local de Obtenção	Figuras correspondentes
Água subterrânea	IQ/UNESP, pois é 100% abastecido por água subterrânea, sem cloração	Não se aplica
Água superficial	Ribeirão das Cruzes, no ponto de captação da ETE-Fonte	15 e 16
Água potável	Residência próxima ao IQ/UNESP	17
Efluente ETE	No exato ponto de despejo no manancial Ribeirão das Cruzes,	18

**Figura 13:** Localização do um ponto de captação de água superficial para abastecimento da cidade de Araraquara (seta A). A seta B indica a ETA Fonte.**Figura 14:** Visão aproximada da lagoa do rio Ribeirão das Cruzes, na região urbana da cidade. A seta indica o ponto exato de amostragem de água superficial.



Figura 15: Localização do ponto de amostragem de água potável, indicado pela seta B (figura 1 e 2). Destaque para a proximidade do ponto de amostragem de água subterrânea, indicada pela seta A (figura 1 e 2)



Figura 16: Estação de tratamento de esgoto de Araraquara. (A) indica as lagoas de tratamento e (B) indica o ponto de despejo do efluente no Ribeirão das Cruzes, local onde é realizada as coletas de efluentes de ETE.

3.1.6.3. Otimização do método empregando SPE para quantificação de fitoestrógenos em água (superficial, potável e subterrânea)

Como o método empregado para o tratamento das amostras de água subterrânea, água superficial e também de água potável são muito similares, estes foram agrupados para melhor dinâmica do texto.

Inicialmente, o volume de amostra a ser utilizado nestes experimentos foi otimizado fortificando 0,5, 1 e 2 L de água deionizada com concentração final de 175 ng L⁻¹ dos padrões de fitoestrógenos. Estas amostras foram submetidas ao cartucho de SPE e analisadas conforme indicado na Figura 17. Nos três volumes utilizados, observou-se recuperação dos analitos acima de 90% e, portanto, o maior volume de amostra testado foi utilizado na continuidade do trabalho, visando obter melhor detectabilidade analítica.

Após a coleta e transporte das amostras para o laboratório, as amostras das três matrizes em questão foram acidificadas com 20 mL (1% do volume amostrado) de ácido fosfórico a 85%, cujo pH final ficou próximo de 2. Esta etapa tem por objetivo protonar grupamentos fenólicos das moléculas de DAID e GEN e permitir uma melhor interação com a fase divinilbenzeno-vinilpirrolidona contidos nos cartuchos de SPE.

Após a acidificação, alíquotas 2 litros de cada amostra foram filtradas com auxílio de uma bomba de vácuo, através de uma membrana de fibra de vidro e submetidas à extração por SPE, analisadas em seguida por HPLC/UV.

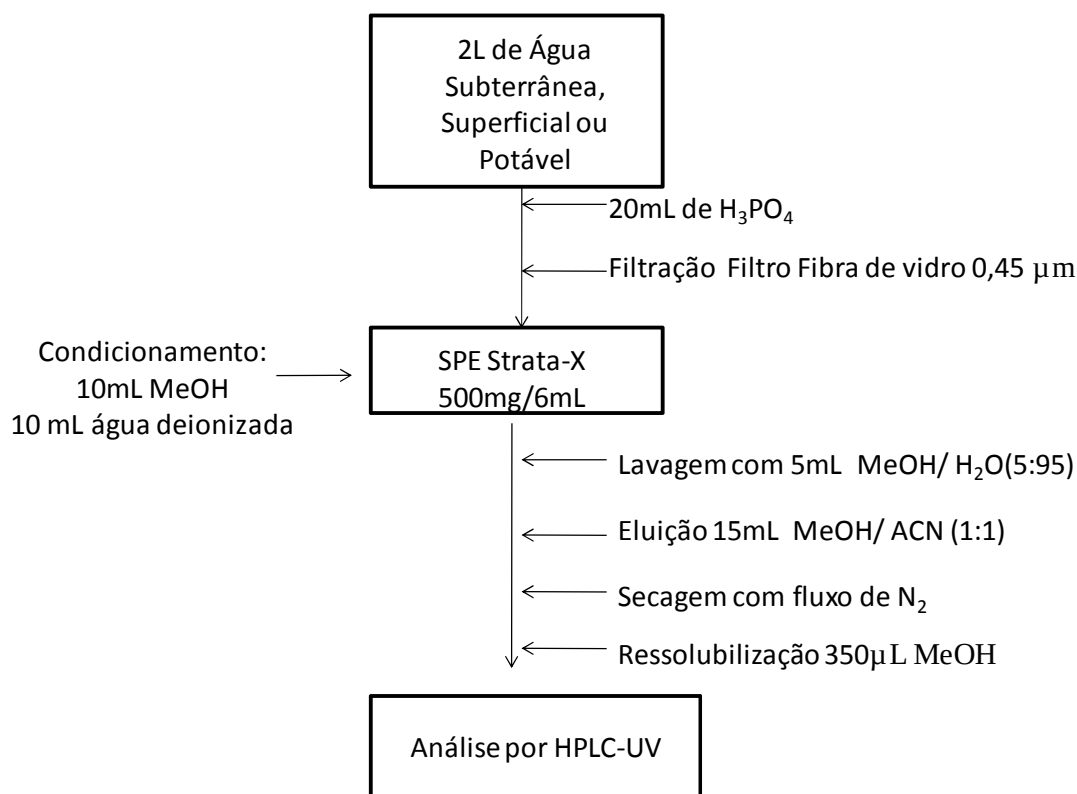


Figura 17 : Fluxograma do tratamento de amostra de água subterrânea, superficial e potável.

3.1.6.4. Otimização do método empregando SPE para efluente de ETE

Para a otimização do volume de amostra de efluente de ETE a ser processado, realizaram-se testes com 2 L, 1,5 L e também com 1 L do efluente, os quais foram acidificados com 1% de volume amostrado com ácido fosfórico (com o mesmo propósito das demais amostras) e filtrados por um filtro fibra de vidro 0,45 µm. Devido à presença de matéria orgânica e material particulado em suspensão, o processo de filtração das amostras tornou-se moroso, sendo que cada filtro não suportou mais do que 50 mL de amostra. Dessa forma, além de onerar o processo, o tempo necessário para o processamento de cada amostra tornava o método inaplicável.

Como alternativa, optou-se por centrifugar as amostras de efluente antes do processo de filtração. Os volumes de 2 L, 1,5 L e 1 L desta matriz já acidificados com H₃PO₄ foram divididos em 6 tubos de 500 mL próprios da centrífuga, mantidos a uma rotação de 10.000 rpm por 10 min e a temperatura

constante de 20°C. Pôde-se perceber a precipitação de grande quantidade de material no fundo dos tubos, cujo sobrenadante já apresentava um aspecto um pouco mais límpido. É importante ressaltar que a retirada de matéria orgânica e/ou material em suspensão proporcionado pela centrifugação das amostras não deve representar perda significativa destas moléculas, corroborado pela solubilidade em água das isoflavonas, indicado na Tabela 7.

Tabela 7: Propriedades físico-químicas dos fitoestrógenos de soja. (STANCANELLI et al, 2007; ENOKIZONO et al., 2008; ROTHWELL; DAY; MORGAN, 2005)

Fitoestrógeno	Solubilidade (mg/L)	pKa	Massa Molecular (g/mol)	Log Kow
Daidzeína	2,54	7,5	254,24	2,51
Genisteína	0,81	7,4	270,24	3,04

Kow= Coeficiente de partição octanol-água

Imediatamente após a centrifugação, as amostras foram filtradas através de filtro fibra de vidro 0,45 µm, sendo necessários, desta vez, apenas dois filtros por litro de matriz; cujo tempo total para passar as amostras pelos cartuchos foi considerado ideal, em vazão média de 8 mL min⁻¹.

As amostras de efluente, após centrifugação e filtração, foram submetidas ao procedimento otimizado anteriormente (item 3.1.6.3), sendo utilizados cartuchos de 500 mg para o volume de 2 e 1,5 litros de amostra e de 200 mg para amostras de 1 litro. Utilizando-se o volume maior de amostra (2L), a velocidade de filtração foi diminuindo continuamente, culminando com o entupimento dos canais do cartucho de 500mg de Strata-X, ocasionado, provavelmente, por pequenas partículas que eventualmente passaram pelos poros do filtro de fibra de vidro.

Assim, o volume de 1,5 L de efluente de ETE foi adotado para a continuidade do trabalho, realizando-se o mesmo procedimento para SPE utilizado para água subterrânea e de rio. O extrato obtido por SPE apresentava uma coloração negra, com aspecto pegajoso, o qual foi filtrado por meio de um

disco 0,45- μm e injetado no sistema cromatográfico com as condições otimizadas (item 3.1.3). Um exemplo de cromatograma obtido para este extrato pode ser visualizado na Figura 18. Nota-se elevação na linha de base, entre 3 e 16 minutos devido à elevada concentração de material orgânico no extrato. Além disto, o cromatograma revela a presença de uma grande quantidade de substâncias, o que é plenamente normal numa matriz de alta complexidade como esta. No entanto, no tempo de retenção correspondente a DAID (11,3 min) pode-se observar ao menos uma substância coeluinto com este analito, não apresentando resolução mínima necessária para quantificação deste fitoestrógeno.

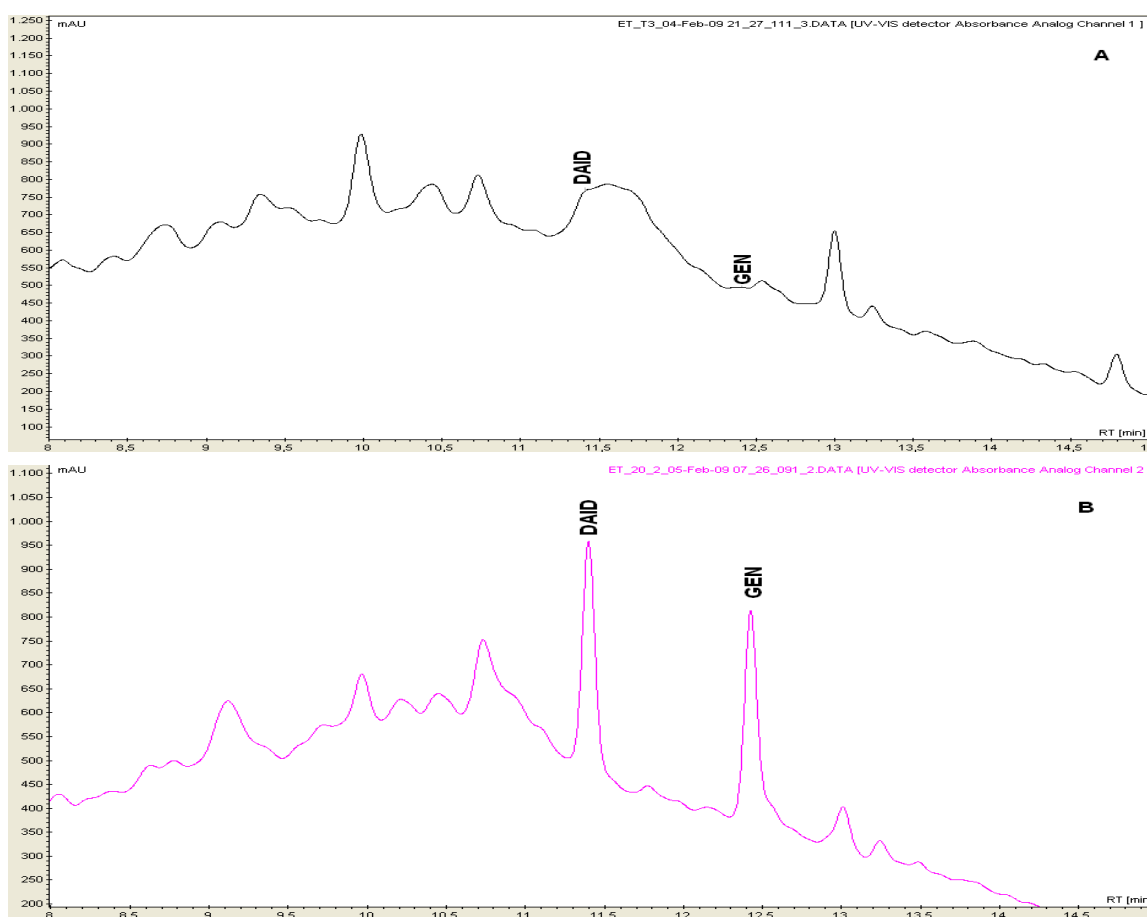


Figura 18: Cromatograma (HPLC-UV) de extrato de efluente de ETE, submetido a SPE (Strata-X, 1,5 L, 200 mg) (A) sem e (B) com fortificação de 4,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada fitoestrógeno.

Sabe-se que uma modificação do pH na técnica de Extração em Fase Sólida representa uma grande alteração na recuperação dos analitos. Assim,

ajustando o pH pode-se, por exemplo, reduzir ionização de ácidos fracos e bases, tão quanto manter constante força iônica para amostras e padrões utilizando fase-reversa (POOLE; GUNATILLEKA, SETHURAMAN, 2000). Dessa forma, ainda buscando uma melhor seletividade para a amostra de ETE, avaliou-se a influência do pH sobre a retenção nos analitos na fase sólida, utilizando amostras de esgoto acidificadas em 2 níveis, amostras de esgoto sem modificação de pH e também amostras basificadas com hidróxido de amônio.

Tabela 8: Testes de pH em amostras de esgoto tratado

Amostra (1,5L efluente de ETE)		pH final ^a
1	Sem adição de ácido	-
2	10 mL de H ₃ PO ₄	2,1
3	20mL de H ₃ PO ₄	1,8
4	5mL de NH ₄ OH	10,9
5	5mL de NH ₄ OH seguido de 10 mL de H ₃ PO ₄	2,2

^a valor calculado

A amostra 5 foi primeiramente basificada com NH₄OH, filtrada e posteriormente acidificada com H₃PO₄ para enfim ser passada pelo cartucho de SPE. A primeira etapa teve como objetivo solubilizar os componentes ácidos da amostra, permitindo que os componentes básicos da solução interajam com a matéria orgânica em suspensão e fiquem retidos nos filtros utilizados. Posteriormente a filtração, a acidificação tem como objetivo protonar os analitos da amostra e permitir que este tenha uma maior interação com a fase sólida.

Os resultados, no entanto, apresentaram o mesmo perfil cromatográfico da Figura 18, não demonstrando melhora na resolução dos picos correspondente aos analitos de interesse. Com a utilização de pH ácido no pré-tratamento da amostra, observou-se ainda uma maior precipitação de matéria orgânica quando comparado com pH básico, facilitando e agilizando o processo de filtração subsequente. Dessa forma, optou-se por manter a acidificação da amostra com 1% (v/v) de ácido fosfórico.

Outros experimentos foram realizados na tentativa de melhorar a resolução dos picos entre os fitoestrógenos de interesse e os componentes da matriz, desta vez, alterando o gradiente de eluição utilizado até aquele momento. Propuseram-se seis novos gradientes, tendo como base alguns métodos já descritos na literatura (LAGANÀ et al., 2004; RIBEIRO et al., 2007), bem como propondo novas condições de eluição, a partir dos resultados que foram sendo obtidos. Esta estratégia também não foi bem sucedida na eliminação da co-eluição que ocorria.

Optou-se por introduzir uma etapa de clean up após a eluição do cartucho de SPE, utilizando procedimento descrito por Ribeiro e colaboradores (2007).

Assim, testou-se alumina neutra (150 mesh, 58Å) e também sílica gel (70-230 mesh; 60Å), que foram totalmente desidratadas em uma estufa a temperatura de aproximadamente 100°C por um tempo mínimo de 12 horas antes do seu uso. Foram tomadas as massas de 1g e 0,5 g destes sólidos e transferido para uma coluna de vidro (15mm x 70mm), sendo devidamente empacotada antes da aplicação da amostra; tendo sido ainda condicionada pela aplicação de 2 mL de MeOH/ACN 50% .

De acordo com o sumarizado na Figura 19, após 1,5L das amostras de esgoto tratado ser eluída dos cartuchos SPE, estas foram totalmente transferida para a coluna de alumina e sílica gel; sendo eluidas novamente com solução de MeOH/ACN 50% , agora com um volume de 15mL da mesma mistura de solventes, levada a secar em fluxo de nitrogênio, ressolubilizado em 350 µL de metanol. Este volume foi filtrado e injetado no sistema cromatográfico nas condições de análise já otimizadas. O cromatograma pode ser visto na Figura 20.

Há uma melhora significativa do aspecto do cromatograma quando se realiza o clean-up com alumina neutra nestas amostras. A diminuição drástica da absorbância da linha de base já indica uma grande eliminação da matéria orgânica do extrato final. Apesar disto, ainda não se obteve uma resolução satisfatória entre os analitos e os componentes da matriz, necessitando de novas modificações no método proposto.

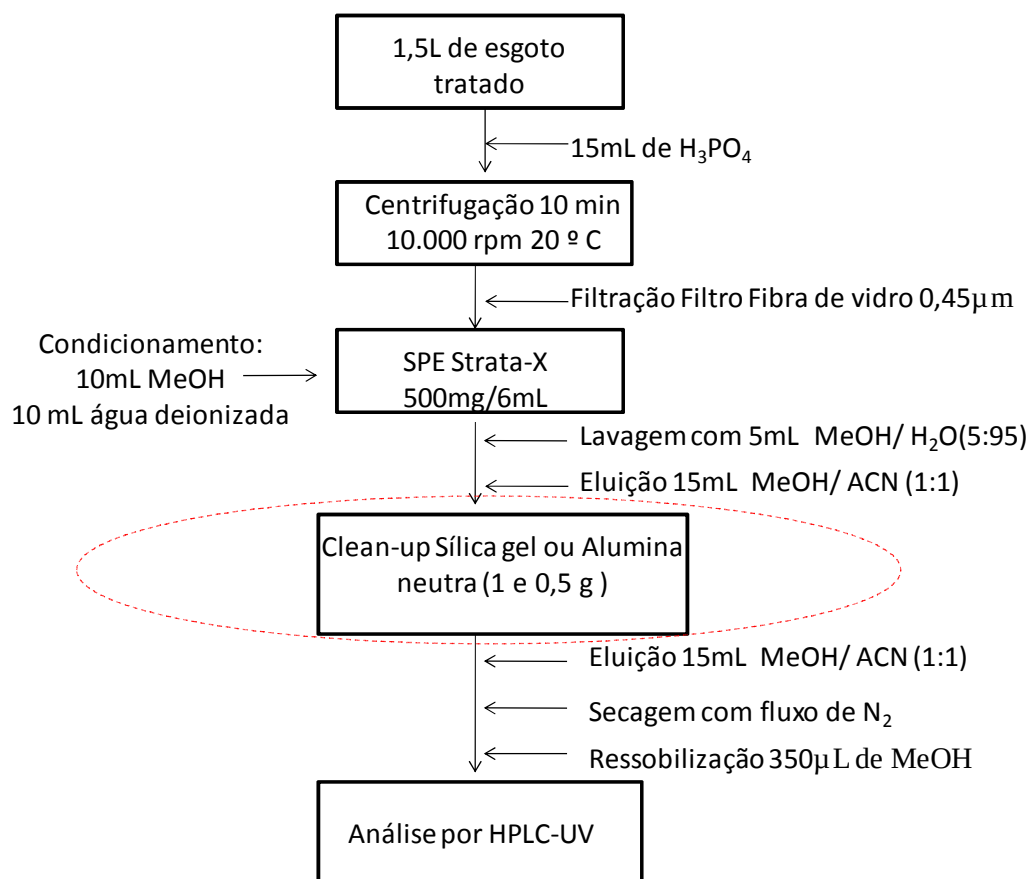


Figura 19: Fluxograma do tratamento de amostra (efluentes de ETE), com destaque para a etapa de clean up introduzida

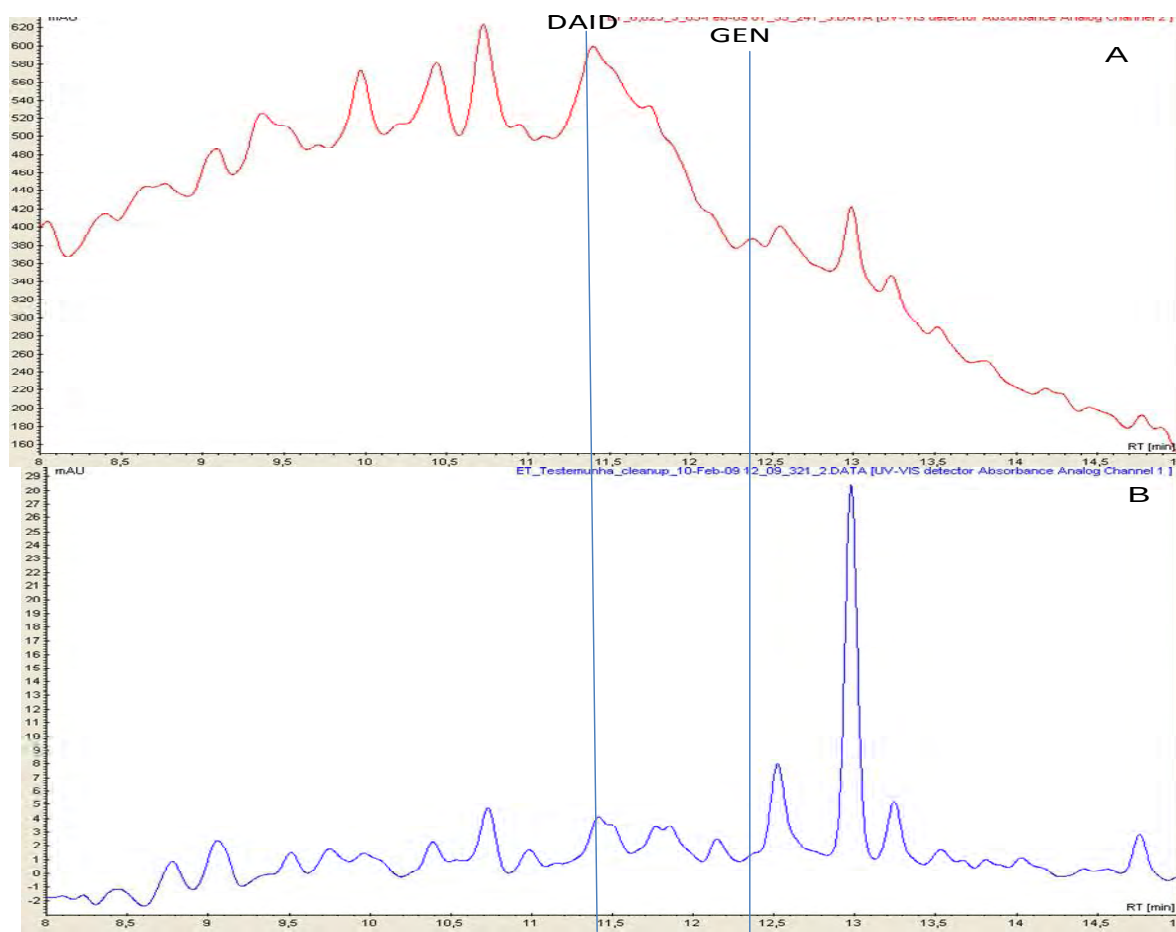


Figura 20: Cromatogramas (HPLC-UV) obtidos para os extratos SPE de amostras de efluente de ETE: sem (A) e com (B) clean-up com alumina. As linhas verticais indicam o tempo de retenção dos fitoestrógenos estudados.

A utilização de uma coluna de 25 cm surgiu como opção na separação efetiva destes compostos, como pode ser visualizado na Figura 21. Com a utilização desta coluna, o tempo de retenção dos analitos é aumentado em cerca de 1 minuto, sendo ainda possível manter o tempo de corrida total em 17 min.

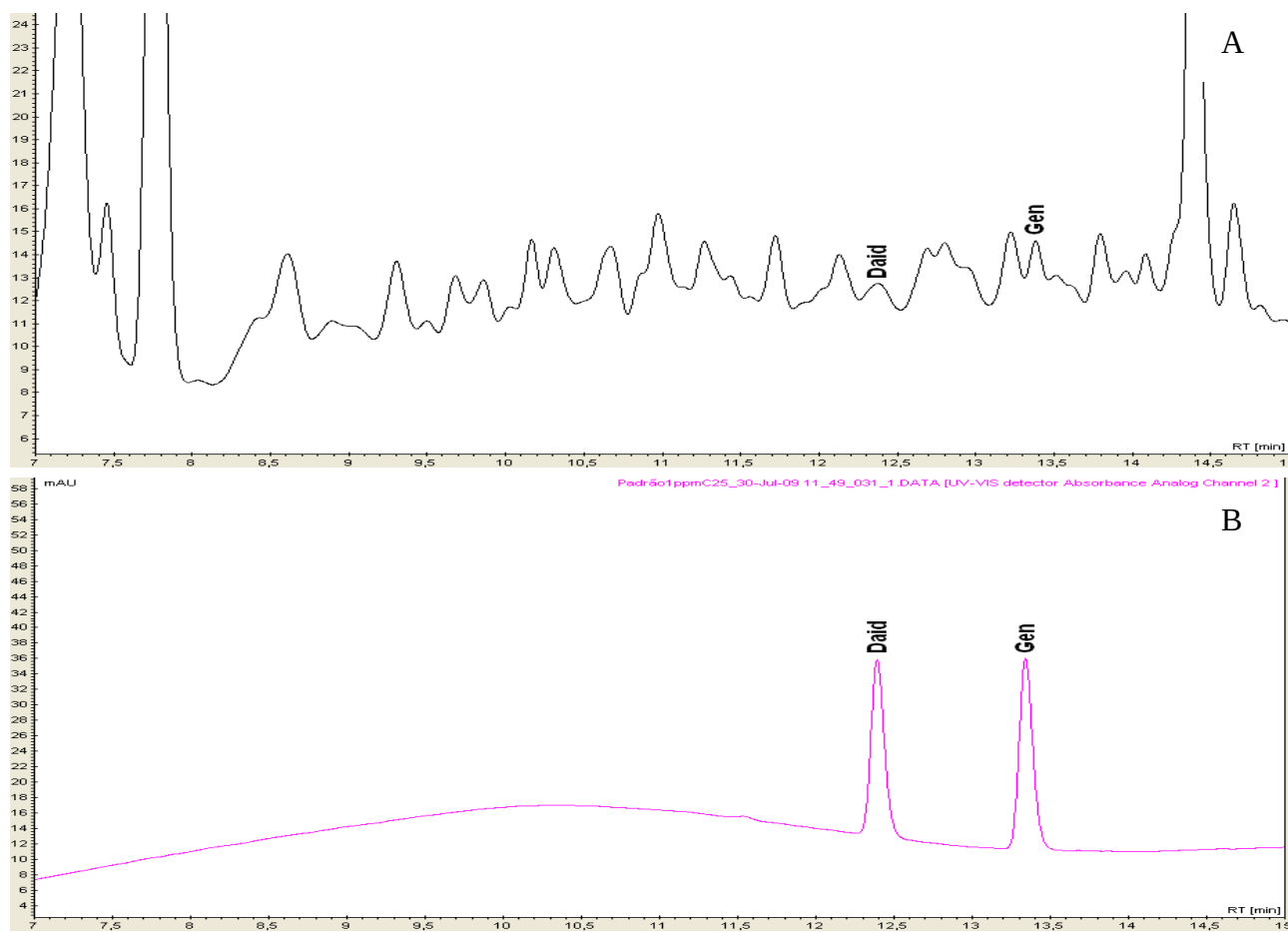


Figura 21: Cromatograma (HPLC-UV) para extrato SPE de efluente de ETE, após cleanup em coluna de alumina (A) e padrão de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (B), utilizando-se coluna cromatográfica C18 (Agilent, 4,6 mm x 250 mm x 5 μm). As condições de eluição seguiram o método utilizado para água subterrânea, descrito na figura 19.

Nos estudos preliminares, tanto o clean up com alumina quanto com sílica gel, aliado ao uso de uma coluna maior (250 mm) resultaram em uma melhora significativa da resolução cromatográfica entre os picos de interesse e os demais componentes da matriz.

Avaliou-se, então a recuperação obtida com um e outro sorvente na etapa de clean up, fortificando o volume de 1,5 L da amostra de esgoto tratado com 233 ng L^{-1} dos padrões de fitoestrógenos antes do processo de centrifugação da matriz.

Os testes com alumina não resultaram em recuperação apreciável dos analitos com 1g e também com 0,5 g do sólido, mesmo mudando o solvente de eluição de MeOH/ACN 50% para 15 mL de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1), conforme preconizado na literatura (BACALONI et al., 2005). Os ensaios de recuperação para DAID e GEN mostraram recuperações abaixo de 50% para a primeira

molécula e, conforme pode ser observado no cromatograma apresentado na Figura 22, a ausência de resposta para GEN, provavelmente em função de uma adsorção irreversível neste material.

Já utilizando a sílica gel, os resultados foram melhores utilizando 0,5 g do sólido para realização de clean-up e como solvente de eluição 15 mL de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1: 1).

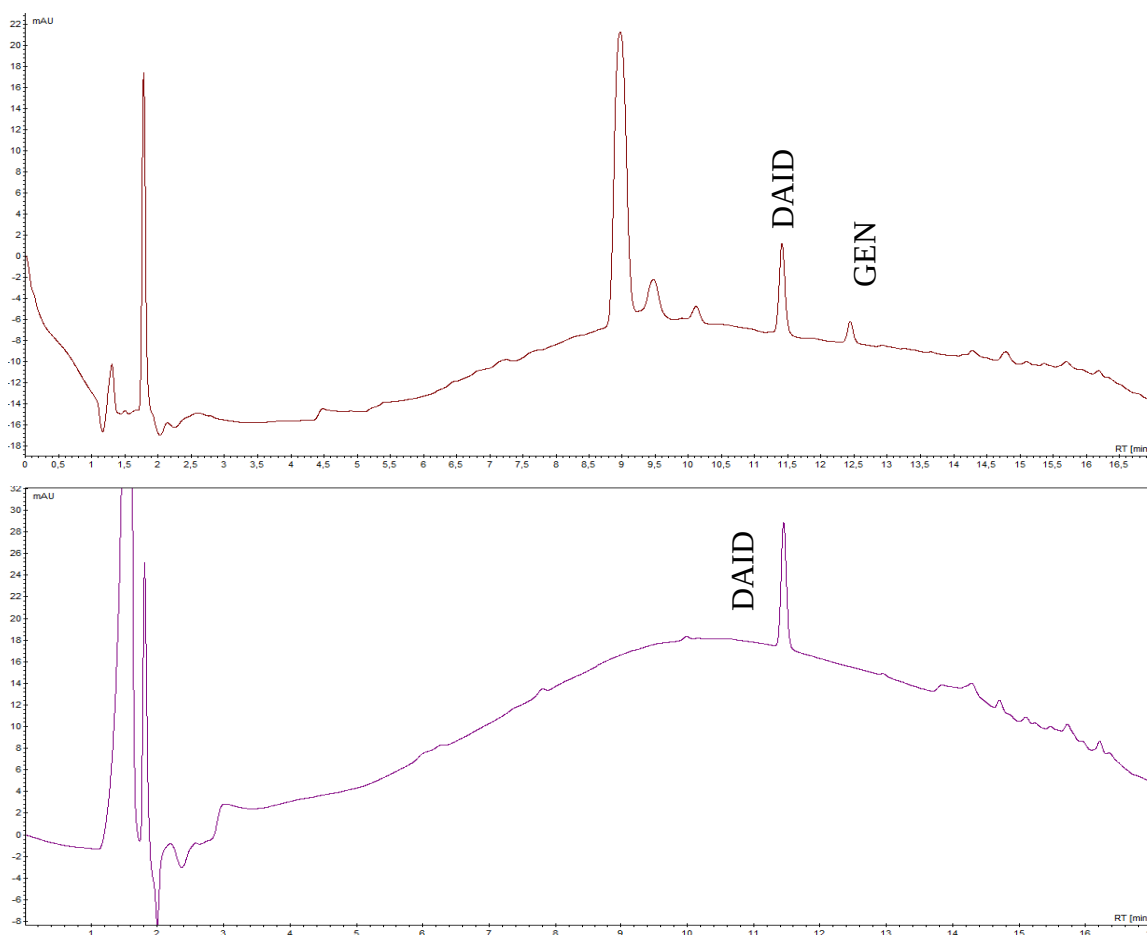


Figura 22: Cromatograma (HPLC-UV) para extrato SPE de efluente de ETE, utilizando-se 0,5 g de Sílica gel (A) e 0,5 g de Alumina (B) na etapa de Clean-up, método descrito na Figura 19.

O processo de tratamento de amostra de efluente de ETE otimizado está sumarizado na Figura 23.

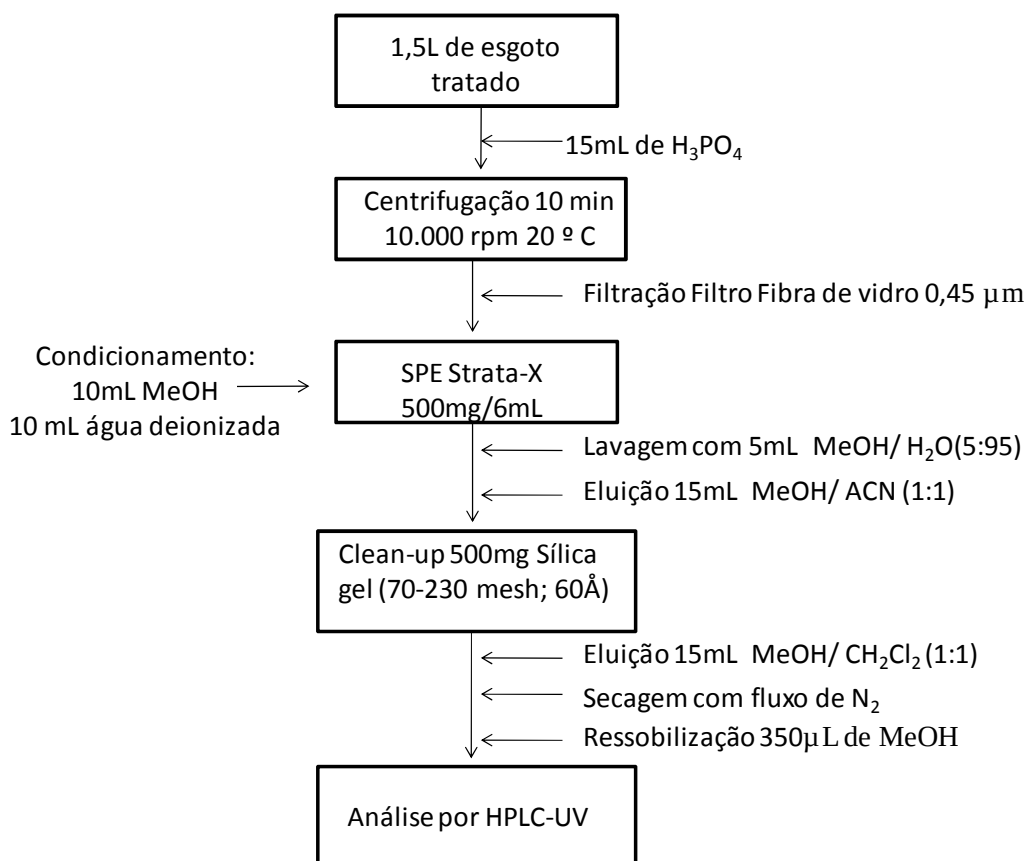


Figura 23: Fluxograma do tratamento de amostras de efluente de ETE.

O procedimento proposto difere dos métodos já reportados uma vez que é necessário a centrifugação prévia das amostras antes do processo de extração em fase sólida. O processo de clean-up também é acrescido no método proposto e está ausente nos demais métodos publicados, em função do sistema analítico utilizado na análise, geralmente HPLC acoplado com espectrômetro de massas.

3.1.6.5. Avaliação da seletividade e do efeito matriz

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa, ou seja, este termo define a capacidade do método em detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz (BRITO et

al., 2003; RIBANI et al., 2004), garantindo que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse.

Uma forma de se avaliar este parâmetro é comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra. Nos casos em que não é possível obter a matriz isenta da substância de interesse, este exame pode ser realizado através do método de adição padrão. Nesta abordagem, é feita uma curva analítica com adição da substância de interesse na amostra e comparada com uma curva analítica sem a presença da matriz. Comparam-se então as duas curvas analíticas e, caso elas sejam paralelas, pode-se dizer que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse; portanto o método é seletivo (RIBANI et al., 2004).

O efeito de matriz ou efeito da resposta cromatográfica induzida pela matriz pode ser definido como o efeito combinado de todos os componentes da amostra diferentes da substância de interesse sobre a quantificação de um determinado analito (IUPAC, 1997), que pode causar um aumento ou diminuição da resposta cromatográfica de um analito quando presente no extrato da amostra comparada ao mesmo analito em um determinado solvente (TOLEDO-NETTO, 2009)

A avaliação do efeito matriz é um importante passo na validação de métodos analíticos. O efeito de matriz pode ser avaliado comparando os coeficientes angulares das curvas analíticas preparadas na matriz com os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas em solvente. Quando a diferença entre estes valores for superior a 10%, pode-se inferir que a matriz atua sobre a sensibilidade do método em questão e os dados analíticos obtidos podem estar em desacordo com as reais concentrações na matriz de interesse (Thompson, Ellison e Wood; 2002). Neste caso será imprescindível que a quantificação seja feita a partir de uma curva construída na matriz.

a) Água subterrânea e superficial

A seletividade do método para as matrizes de água subterrânea e superficial foi avaliada comparando-se os cromatogramas das amostras testemunha de água subterrânea e também da matriz de água superficial com a menor concentração do padrão ($0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$) injetado no sistema cromatográfico otimizado.

A avaliação do efeito de matriz foi realizada comparando os coeficientes angulares das curvas analíticas na matriz com os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas em solvente, de acordo com Thompson et al. (2002). Para tanto, avaliou-se a possível interferência da matriz na resposta do sistema analítico fortificando-se o extrato final de água subterrânea a partir de padrões dos fitoestrógenos, cuja concentração final foi $0,015$; $0,1$; $0,5$; 1 ; 5 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ para GEN e $0,035$; $0,1$; $0,5$; 1 ; 5 e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para DAID. Já para água superficial, o extrato final foi fortificado com $0,01$; $0,5$; 1 ; 5 ; 10 e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ para GEN e $0,15$; $0,5$; 1 ; 5 ; 10 e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ para DAID. Em seguida, estes extratos foram analisados no sistema HPLC nas condições cromatográficas otimizadas, construindo-se as curvas analíticas.

b) Efluente de ETE

Não é possível obter esta matriz isenta dos analitos de interesse, desta maneira, fica impossibilitada a comparação do cromatograma da amostra com uma solução padrão, na avaliação da seletividade.

A literatura recomenda a técnica de adição de padrão para avaliação da seletividade do método quando não é possível obter a matriz isenta do analito. (RIBANI et al., 2004). Portanto, ao extrato final de amostras de ETE foram adicionadas as quantidades de $0,8$; 2 ; 5 ; 10 ; 15 e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos padrões de fitoestrógenos em estudo a partir de diluições sucessivas das soluções estoque. Então, uma curva analítica na amostra foi traçada e os coeficientes de correlação analisados.

3.1.6.6. Avaliação da precisão

A precisão de um procedimento analítico expressa o grau de concordância (grau de dispersão) entre uma série de medidas obtidas a partir de amostragem múltipla de uma mesma amostra homogênea, nas condições prescritas. Uma forma de avaliação da precisão pode ser obtida através de ensaios de repetibilidade (INTERNATION CONFERENCE OF HARMONISATION, 1995).

A repetitividade expressa a precisão sob as mesmas condições operacionais ao longo de um curto intervalo de tempo, sendo também denominada precisão intra-ensaio. A ICH 381 (1995) e ANVISA sugerem que a repetitividade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (ex.: três níveis, três repetições cada um), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado.

Uma forma de expressar a precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV), como pode ser visto na equação 1:

$$RSD (\%) \text{ ou } CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (1)$$

Onde s é a estimativa do desvio padrão e $\bar{x}$ a média aritmética dos valores obtidos experimentalmente.

Normalmente, métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um CV de 1 a 2%. Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos CV de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (RIBANI et al., 2004).

Neste trabalho, a avaliação da precisão do método foi realizada através da medida do coeficiente de variação das replicatas dos experimentos de recuperação do método, no qual foi estabelecido como aceitáveis para o escopo deste trabalho valores inferiores a 20%.

3.1.6.7. Avaliação da exatidão: estudos de recuperação do método

A exatidão, definida como a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico, constitui a chave para o propósito da validação. Para a avaliação deste parâmetro, utilizou-se o método de adição de padrão, no qual quantidades conhecidas da substância são adicionadas em diferentes níveis numa matriz da amostra, antes do procedimento de preparo da amostra que já contenha quantidades (desconhecidas) da substância.

A amostra sem adição do padrão e cada uma das amostras com o padrão adicionado são analisadas e as quantidades medidas relacionadas com a quantidade adicionada. Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120% (BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004).

O estudo de recuperação do método proposto para amostras de água superficial, subterrânea, potável e do efluente de ETE foi realizado pela fortificação destas amostras com os fitoestrógenos DAID e GEN após o processo de acidificação, sempre em triplicata. As amostras fortificadas foram acondicionadas em frascos fechados de vidro âmbar e mantidas sob refrigeração por um período mínimo de 6 horas para a completa interação das moléculas adicionadas com os demais componentes da matriz. Após este período, alíquotas adequadas de cada amostra foram processadas e analisadas conforme o método previamente otimizado para cada matriz. As concentrações das amostras fortificadas estão sumarizadas na Tabela 9.

As concentrações estudadas foram escolhidas considerando-se o intervalo de resposta linear do sistema cromatográfico e o fator de concentração que seria proporcionado pelo método de tratamento da amostra. Novos níveis de fortificação foram testados para as matrizes de água subterrânea e superficial após os resultados deste primeiro experimento, com o intuito de definir as menores concentrações dos analitos que apresentem exatidão e precisão compatíveis com o preconizado pela literatura.

Tabela 9: Concentrações de DAID e GEN nas amostras fortificadas utilizadas no estudo de recuperação do método

Matriz	Concentrações (ng L ⁻¹)				
Água subterrânea	2,63	4,38	6,13	175	1750
Água superficial	6,13	17,5	26,4	175	1750
Água potável	175	875	1750	-	-
Efluente de ETE	188	1166	2333	-	-

- Não avaliado

A princípio os estudo de enriquecimento da matriz água potável utilizou as mesmas concentrações utilizadas para água subterrânea, porém, como não foi possível a recuperação nestas concentrações, o estudo foi repetido utilizando as concentrações de 175, 875 e 1750 ng L⁻¹.

3.1.6.8 Avaliação da precisão instrumental na matriz

Para avaliação a precisão instrumental preconiza-se a injeção sucessiva de extratos da matriz fortificada, cujos coeficientes de variação das áreas obtidas não devem ultrapassar 1% (RIBEIRO et. al., 2007).

Este parâmetro foi estudado nas matrizes de água subterrânea, água superficial e também em amostras de efluente de ETE pela injeção sequencial das amostras de acordo com método cromatografico otimizado (n=7). Para as duas primeiras matrizes, os extratos finais foram fortificados com concentração nominal de 875 ng.L⁻¹ dos fitoestrógenos. Já para efluente de ETE, foram utilizadas amostras fortificadas desta matriz com concentração de 1,1µg L⁻¹.

3.1.6.9. Limites de detecção e quantificação do método

Limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob determinadas condições experimentais. O LD do método foi estimado pelos ensaios de recuperação mediante o desvio padrão do menor nível de fortificação (BRITO et al., 2003; LOURENCETTI; MARCHI; RIBEIRO, 2008), segundo a equação:

$$s_{com} = \sqrt{\frac{(m-1)s_A^2 + (n-1)s_B^2}{m+n-2}}$$

Na qual: m = o número de determinações do menor nível de fortificação; n = o número de determinações da amostra testemunha; S_A = desvio-padrão da amostra do menor nível de fortificação; S_B = desvio-padrão da amostra testemunha. A partir desse valor, estima-se o limite de detecção pela equação:

$$LD = \frac{2 \times t_{n,95\%} \times S_B}{S}$$

Já o limite de quantificação pode ser definido como a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas. (BARROS, 2002).

Neste trabalho, o LQ foi estimado segundo o método estatístico, no qual o limite de quantificação corresponde ao menor nível de fortificação estudado, para a qual a recuperação esteve entre 70 e 120%, com coeficiente de variação de até 20% (BRITO et al., 2003; LOURENCETTI; MARCHI; RIBEIRO, 2008).

3.2. Estratégia de amostragem

Os pontos de amostragem de água superficial e efluente de ETE foram descritos no item 3.1.6.2.

As amostras foram coletadas em frascos de vidro âmbar (4 litros) previamente lavados de acordo com o procedimento de limpeza descrito por Moura (2008), que inclui: a) solução aquosa a 4% de Extran^{MR} alcalino, por 1 hora; b) tríplice lavagem com água da torneira; c) tríplice lavagem com água destilada; d) tríplice lavagem com água ultra pura; f) enxágüe com acetona; f) secagem em estufa

Após a coleta, os frascos foram tampados (tampa de rosca com revestimento interno em Teflon^{MR}) e mantidos sob refrigeração (gelo reciclável, caixa isotérmica) até o laboratório do IQ/UNESP.

Todas as amostras foram processadas conforme o método estabelecido em, no máximo, 2 horas após a coleta; evitando qualquer tipo de degradação química ou biológica da mesma.

As amostras de efluente de ETE foram coletadas sempre entre 14 e 15 horas, horário em que são realizadas as amostragens por agentes do DAAE para as análises de rotina.

As amostras foram coletadas e analisadas no período compreendido entre Julho e Novembro de 2009.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

4.1 Testes Preliminares

Considerando-se as recomendações do fabricante, o condicionamento da fase estacionária do cartucho para SPE (Strata-X, 500 mg) foi efetuado utilizando-se metanol, seguido de água deionizada, com volume de 10 mL de cada solvente (ROSTAGNO et al., 2005). Após o condicionamento, aplicou-se a amostra de interesse. A vazão da amostra pelo cartucho foi fixada em cerca de 8 mL min^{-1} , sendo utilizado um sistema a vácuo nesta etapa. Posteriormente, o cartucho SPE foi lavado com 5 mL de MeOH:H₂O (5:95, v/v) e a eluição do analitos foi efetuada com 15 mL de MeOH:ACN 50:50 v/v. O eluato foi, então, submetido a evaporação à secura sob fluxo de N₂ e o resíduo resultante foi re-solubilizado em 350 μL de MeOH, cujo extrato final foi analisado por HPLC/UV.

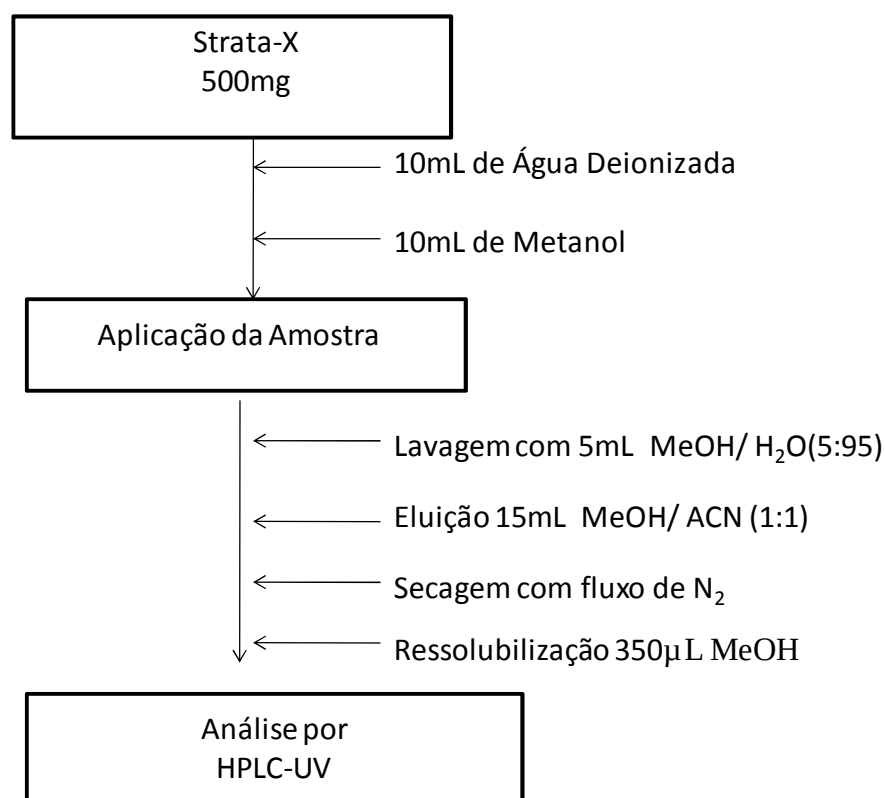


Figura 24: Fluxograma do procedimento de condicionamento do cartucho SPE Strata-X

O procedimento foi inicialmente aplicado ao cartucho em branco, utilizando-se 2L de água desionizada ao invés da amostra. Um cromatograma

típico obtido está apresentado na Figura 25, onde se podem notar dois picos (10,1 e 12,5 min), sendo que o segundo deles elui em tempo de retenção próximo à GEN, interferindo no pico de interesse.

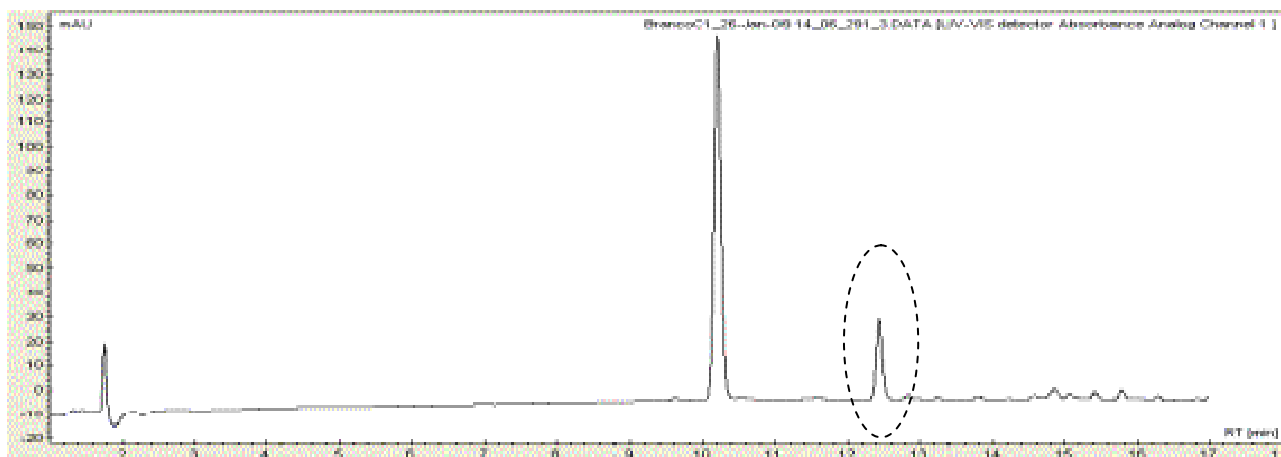


Figura 25: Cromatograma (HPLC/UV) da análise em branco, utilizando 2L de água deionizada, com pico interferente para genisteína em 12,5 min.

Supondo que este interferente estava presente nos cartuchos de SPE utilizados nas análises, o mesmo procedimento foi efetuado com um novo lote de Strata-X, o qual também apresentou o mesmo interferente com absorção similar. Para descartar o próprio cartucho como fonte da molécula desconhecida, apenas o mesmo volume da mistura de metanol/acetonitrila utilizada para a eluição do cartucho foi levada a secar e retomada em metanol para a avaliação, onde, surpreendentemente, também se constatou a presença do pico em questão.

Assim, iniciou-se uma série de experimentos na tentativa de identificar a fonte deste interferente, tendo como segundo passo a troca do metanol, acetonitrila e da água deionizada utilizada no processo de tratamento de amostra. Novamente, esta substância desconhecida eluiu com mesmo tempo de retenção do analito de interesse, apresentando ainda absorção semelhante.

Posteriormente, avaliou-se se as mangueiras de borrachas envolvidas com material vedante, utilizadas para a canalização do nitrogênio utilizado para secar as amostras, poderiam ser a fonte desta substância. Para tanto, o mesmo volume utilizado para eluir as amostras foi levado a secar utilizando-se um rotaevaporador, retomado em metanol e injetado no sistema

cromatográfico. Também neste procedimento constatou-se a presença da referida substância.

Por fim, a repetição do branco do cartucho realizada poucos dias depois culminou com a substância indesejada não mais eluindo no mesmo tempo de retenção da GEN (Figura 26). Infelizmente, não foi possível determinar a fonte do contaminante, entretanto o desaparecimento de tal interferência permitiu dar continuidade ao estudo do tratamento da amostra e a validação do método.

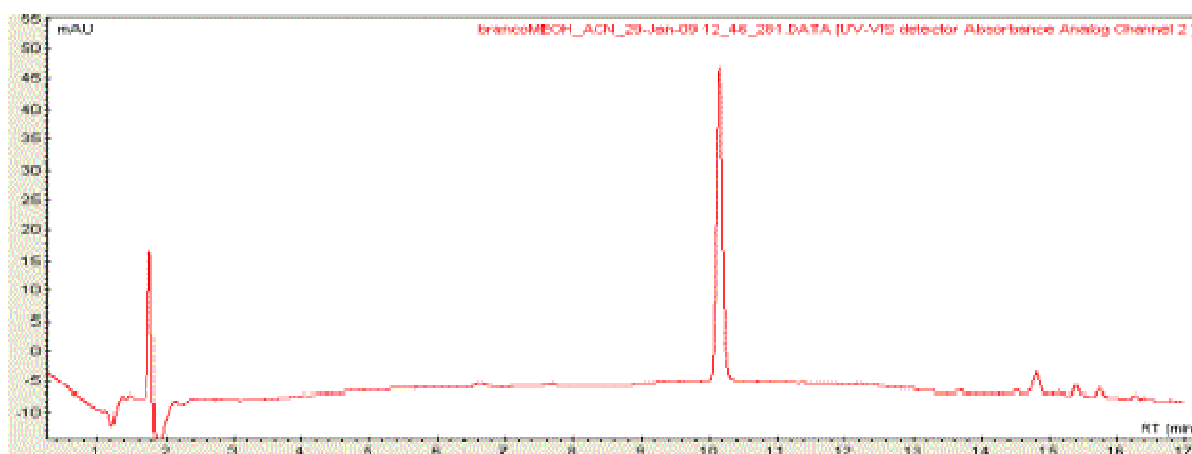


Figura 26: Cromatograma (HPLC-UV) da análise em branco, utilizando 2 L de água deionizada

4.2. Avaliação da resposta do sistema cromatográfico

Na Tabela 10 são apresentadas as condições otimizadas para análise dos fitoestrógenos no sistema HPLC LC-920, enquanto a Figura 27 apresenta o cromatograma obtidos para uma solução padrão dos fitoestrógenos no sistema cromatográfico.

Tabela 10: Condições cromatográficas otimizadas e utilizadas neste trabalho

Equipamento	Varian 920-LC
Coluna	C18 (Phenomenex, 4,6 mm x 150 mm x 5 μ m e 250 mm x 150 mm x 5 μ m)
Comprimento de onda	249 e 260 nm
Fase móvel	Metanol e Água acidificada com 0,1% com HAc glacial
Gradiente	Inicial 20% MeOH
	15min 100% MeOH
	17min 20% MeOH
	Tempo de equilíbrio 1min
Temperatura da Coluna	30°C
Volume injetado	20 μ L
Vazão da fase móvel	1mL min ⁻¹

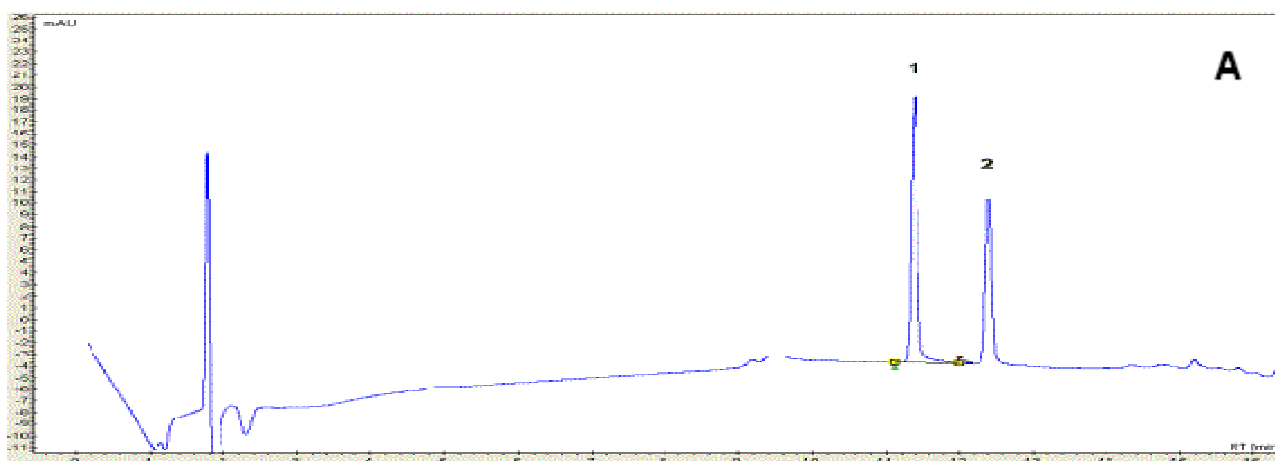


Figura 27: Cromatograma (HPLC/UV) obtido para solução padrão dos fitoestrógenos (1 μ g mL⁻¹) em metanol nas condições otimizadas para o sistema Varian LC-920. (1) Daidizeína e (2) Genisteína.

4.2.1. Linearidade

A avaliação da linearidade foi efetuada utilizando-se o Teste de Huber. Para este trabalho, adotou-se o valor de $k=4$ e, com estes dados, gerou-se um gráfico de razão Área/concentração por concentração, com intervalo de confiança associado. A Figura 28 apresenta os gráficos de linearidade obtidos.

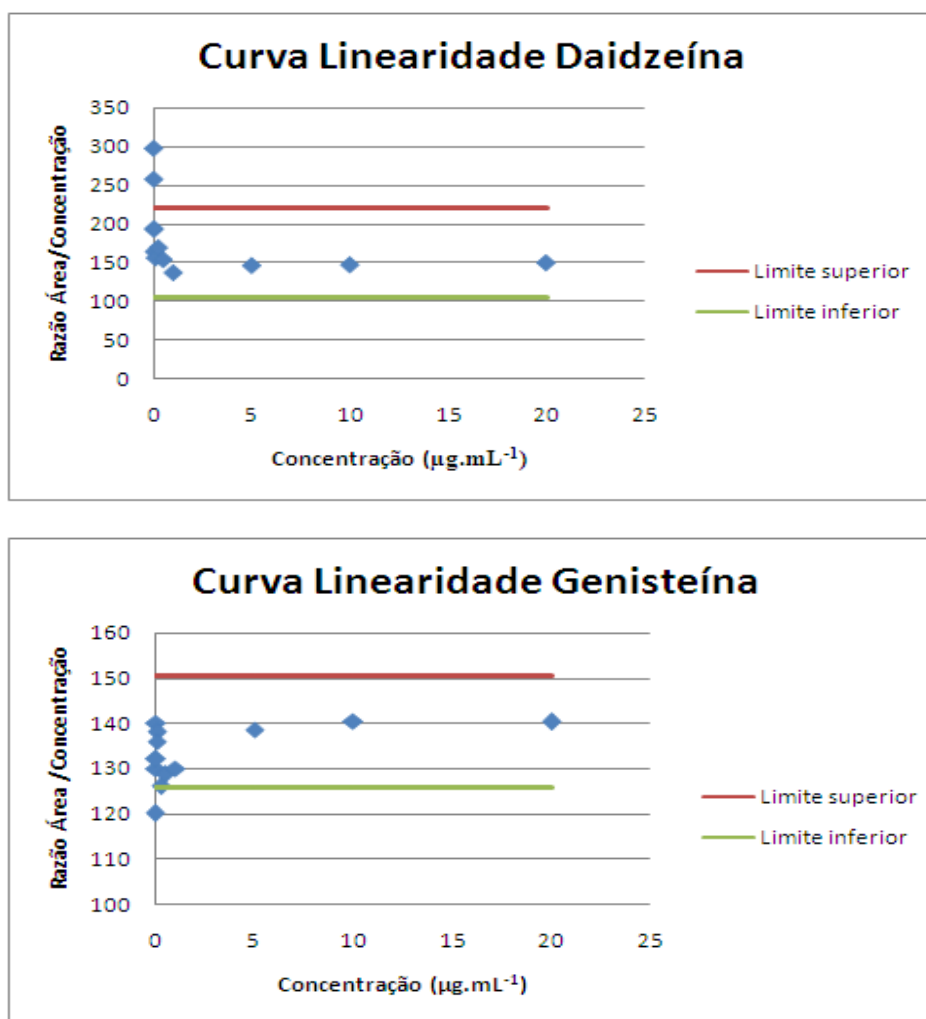


Figura 28. Gráficos de linearidade obtidos no sistema LC-920 para os fitoestrógenos em estudo

Observando a figura 28, nota-se que os dois primeiros pontos deste gráfico (0,005 e 0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$) encontram-se acima do intervalo de confiança estabelecido para DAID, e, dessa forma, estão fora do intervalo linear preconizado para a construção da curva de calibração (ou analítica). Para GEN, apenas o primeiro ponto estudado (0,005 $\mu\text{g mL}^{-1}$) encontra-se fora do intervalo linear, apresentando-se abaixo do valor mínimo estabelecido. Já os demais pontos encontram-se dentro do intervalo linear, podendo ser utilizados para a construção da curva analítica. Os valores obtidos estão apresentados nas Tabelas 11 e 12, para DAID e GEN, respectivamente.

Tabela 11: Dados obtidos para a construção da curva analítica da Daidzeína

Concentração (µg/mL)	Área média (n = 3) (mAU.Seg)	Área interpolada	Resíduo
0,02	3,90	4,45	13
0,025	4,83	5,18	7
0,05	8,43	8,86	5
0,1	15,83	16,20	2
0,25	42,63	38,25	12
0,5	78,50	74,98	5
1	138,7	148,5	7
5	743,5	736,2	1
10	1489,3	1470,9	1
20	3017,0	2940,3	3
Dados da Regressão: Área= a+b(concentração)			
Parâmetro	Valor	Erro	
a	1,52	0,88	
b	145,57	2,89	
Correlação	Desvio Padrão	Numero de Pontos	
0,99843	14,79	10	

Tabela 12: Dados obtidos para a construção da curva analítica da Genisteína

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área média (mAU.Seg)	Área interpolada	Resíduo
0,01	1,37	1,46	6
0,02	2,80	2,80	$8,7 \cdot 10^{-6}$
0,025	3,25	3,47	6
0,05	6,93	6,82	2
0,1	13,70	13,52	1
0,25	31,47	33,63	6
0,5	63,70	67,13	5
1	128,2	134,2	4
5	690,8	670,3	3
10	1402,9	1340,4	5
20	2826,1	2680,7	5
Dados da Regressão: Área = a+b (concentração)			
Parâmetro	Valor	Erro	
a	0,12	0,05	
b	134,08	2,34	
Correlação	Desvio Padrão	Numero de Pontos	
0,99863	16,03934	11	

Observa-se (Tabelas 11 e 12) que os resíduos calculados são inferiores a 13% para todo o conjunto de dados, indicando uma ótima concordância entre os dados obtidos experimentalmente e a regressão utilizada para correlacioná-los. Assim, pode-se concluir que o valor atribuído a constante k ($k=4$), foi satisfatório para este conjunto de dados.

Os valores para o coeficiente de correlação foram superiores a 0,99, em concordância com o preconizado pelo INMETRO (2003). A faixa de linearidade apresentou três ordens de grandeza para ambas as substâncias em estudo, cobrindo o intervalo de 0,01 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para GEN e 0,02 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para DAID. As curvas analíticas obtidas estão apresentadas na Figura 29.

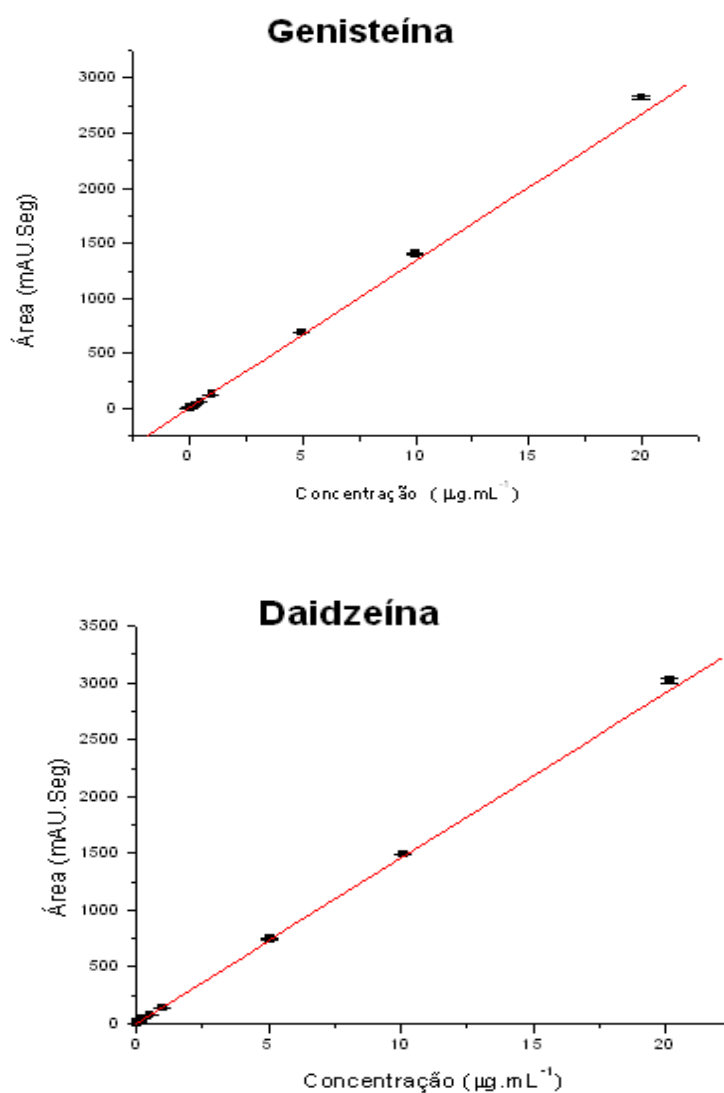


Figura 29. Representação das curvas analíticas obtidas para GEN (a) e DAID (b)

4.2.2. Precisão instrumental

Os dados obtidos pela injeção seqüencial dos padrões de fitoestrógenos estão sumarizados na Tabela 13. A análise dos dados permite observar ótima precisão instrumental do sistema utilizado, cujos coeficientes de variação de 0,7 e 0,9% para DAID e GEN, respectivamente, encontram-se dentro dos limites preconizados pela literatura (RIBEIRO et al., 2007).

Tabela 13: Dados obtidos pela injeção sequencial de padrão $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos analitos. 1ª. bateria de análises (n = 10)

Parâmetros		Daidzeína	Genisteína
Área	Média	15,2	13,8
	CV(%)	0,7	0,9
Tempo de retenção	Média (min)	11,40	12,42
	CV%	0,11	0,11

Para avaliação da precisão intermediária (interdia), a mesma solução padrão foi analisada (também em 10 replicatas) 30 dias após a primeira bateria de análises. Os dados apresentados na Tabela 14 permitem observar $CV < 1\%$ para as áreas obtidas para ambas as substâncias. Nota-se também que a diferença entre as médias de uma e outra bateria de experimentos foi menor do que 1% , estando dentro do intervalo de confiança

Tabela 14: Dados obtidos pela injeção sequencial de padrão $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos analitos. 2ª. bateria de análises (30 dias após a 1ª.) (n = 10)

Parâmetros		Diferença (%)		Diferença (%)	
		Daidzeína	1ª e 2ª baterias de análise	Genisteína	1ª e 2ª baterias de análise
Área	Média	15,2	0,5	13,9	0,9
	CV(%)	0,8		1	
Tempo de retenção	Média (min)	11,39	0,08	12,41	0,08
	CV%	0,12		0,11	

a diferença percentual entre as médias obtidas na primeira e segunda bateria de análises (intervalo de 30 dias)

4.2.3. Limites Instrumentais

Os limites de quantificação instrumental, definidos segundo os critérios apresentados no tópico 3.1.5.3, foram determinados como 20 e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para DAID e GEN, respectivamente; enquanto os limites de detecção instrumental foram de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (para ambos os analitos).

4.3. Ensaios de recuperação

4.3.1. Água subterrânea

Os resultados obtidos no ensaio de recuperação pelo método proposto na matriz de água subterrânea estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Resultados dos ensaios de recuperação para amostras de água subterrânea fortificada com os analitos (n=3)

Nível de fortificação (ng L ⁻¹)	Recuperação (%)		Recuperação (%)	
	Daidzeína	CV (%)	Genisteína	CV (%)
4,38	65	36	75	13
175	114	6	103	4
1750	106	0,5	107	0,3

Os resultados demonstram uma ótima recuperação para ambas as moléculas no nível intermediário e também para o nível mais alto de fortificação, apresentando ainda baixo coeficiente de variação entre as replicatas, o que é esperado para estes níveis de fortificação. Já para o nível mais baixo estudado, de 4,38 ng L⁻¹, pode-se observar que a recuperação para a DAID ficou abaixo do preconizado (70%), constando um desvio maior que 36%, indicando que o método não possui exatidão e precisão suficiente para este nível de concentração do analito. Para este mesmo nível de fortificação, a GEN obteve um ótimo valor de recuperação (75 %) e desvio padrão relativo satisfatório (13 %).

Assim, realizou-se um novo experimento no intuito de investigar o comportamento do método em dois outros níveis de fortificação, acima e abaixo de 4,38 ng L⁻¹. Estes experimentos foram também realizados em triplicata, e os resultados estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16: Resultados dos ensaios de recuperação para amostras de água subterrânea fortificada com novas concentrações dos analitos (n=3)

Nível de fortificação (ng.L ⁻¹)	Recuperação		Recuperação	
	(%) Daidzeína	CV (%)	(%) Genisteína	CV
6,125	78	13	-	-
2,625	-	-	90	5

- Não avaliado

Na concentração de 6,125 ng/L, a DAID apresentou recuperação satisfatória (>70%) e também desvio padrão relativo aceitável. Já a diminuição do nível de fortificação da GEN, levou a uma recuperação e um coeficiente de variação melhor que o último analisado (4,38 ng L⁻¹), o que não seria o esperado, uma vez que em níveis de concentração menor, espera-se uma maior dispersão dos dados. No entanto, quando comparado aos níveis intermediário e superior de fortificação, apresentou uma diminuição considerável na exatidão e precisão do método.

4.3.2. Água superficial

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 17, enquanto que a Figura 30 mostra um cromatograma representativo das amostras fortificadas.

Tabela 17: Resultados dos ensaios de recuperação para amostras de água superficial fortificada com os analitos (n=3)

Nível de fortificação (ng L ⁻¹)	Recuperação (%)		Recuperação(%)	
	Daidzeína	CV(%)	Genisteína	CV(%)
6,13	46	>30	43	>30
17,5	50	>25	80	12
26,4	71	6	-	-
175	73	14	76	12
1750	108	0,5	99	1

-- não incluído no estudo

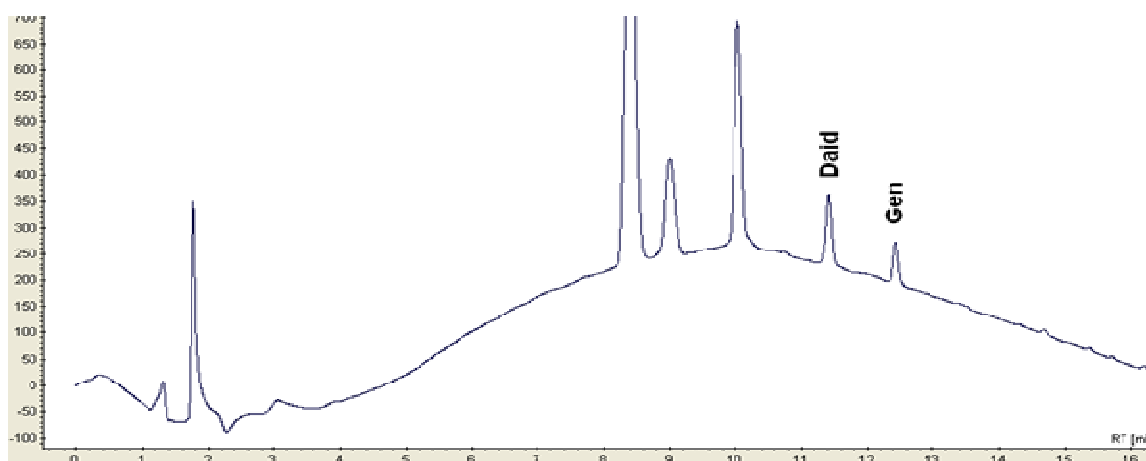


Figura 30:. Cromatograma (HPLC-UV) do extrato de água de rio com fortificação de 875 ng L⁻¹ (2L, Strata-X 500mg)

Para o nível de fortificação mais baixo ($6,13 \text{ ng L}^{-1}$) não foi possível a obtenção de recuperação satisfatória com o método proposto. Entretanto, para as demais concentrações, das amostras fortificadas, a recuperação foi maior que 71% com $\text{CV} < 14\%$ (Tabela 17).

4.3.3. Água potável

Esta matriz fortificada não apresentou recuperação para os fitoestrógenos estudados em nenhum dos níveis estudados. Provavelmente, o cloro residual pode ser responsável pela degradação dos fitoestrógenos, cuja concentração encontrada foi sensivelmente menor que a adicionada ($<20\%$) (LOPES, 2007).

A Figura 31 mostra claramente a degradação nos analitos na presença desta matriz. Comparando-se os mesmos níveis de fortificação nas amostras de água subterrânea e água potável, é evidente a diminuição da intensidade dos sinais nos cromatogramas.

Dessa forma, o método proposto não pode ser aplicado a esta matriz, uma vez que não é possível avaliar a exatidão e também a precisão para as amostras de água potável. Assim, a quantificação de DAID e GEN em matriz de água potável não foi utilizada na sequência deste trabalho.

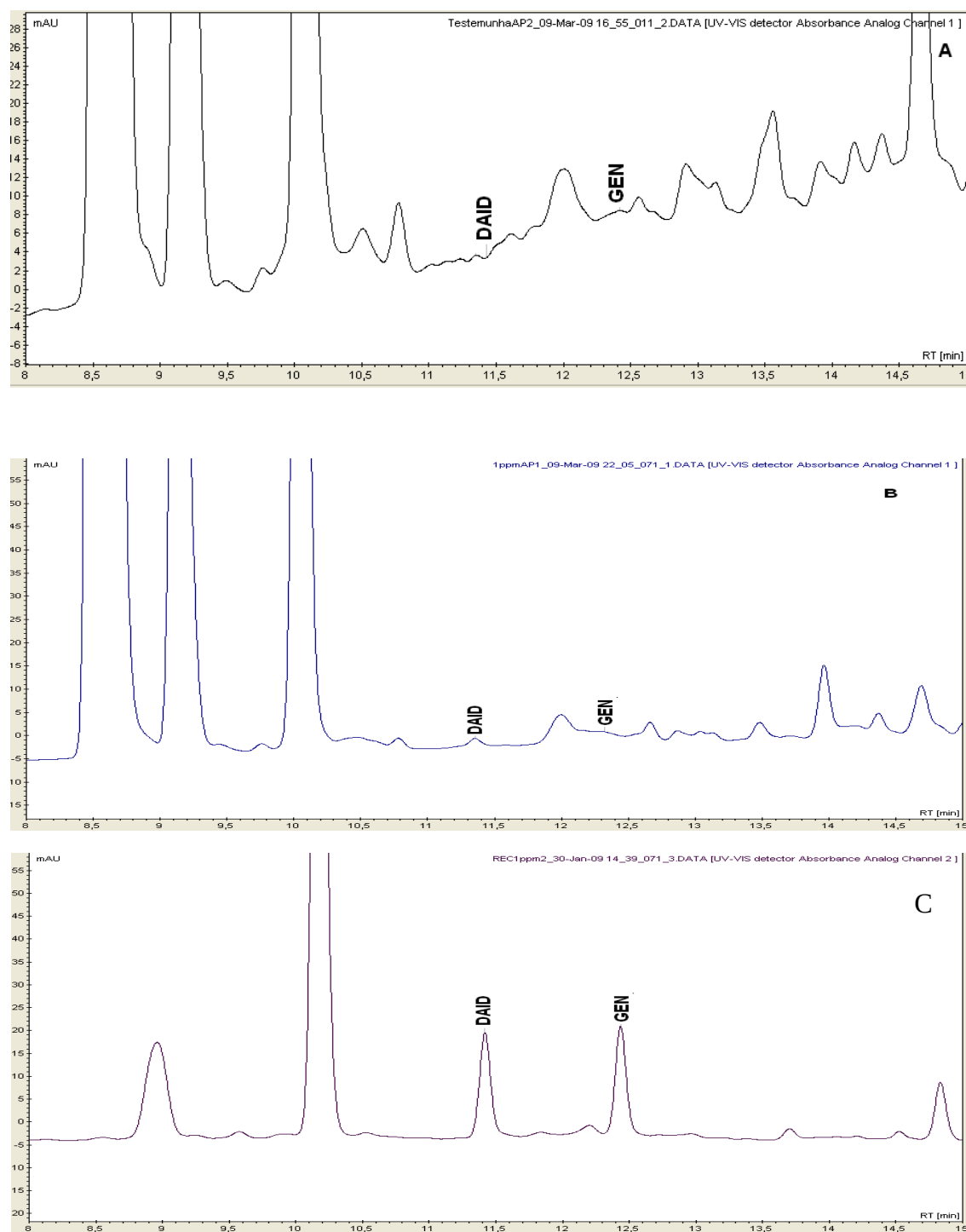


Figura: 31: Cromatograma (HPLC-UV) da matriz de água potável submetido a SPE (2L; Strata-X, 500 mg) (A) Amostra testemunha de água potável; (B) Amostra de água potável com fortificação de 175 ng L^{-1} de cada fitoestrógeno e (c) Água subterrânea com fortificação de 175 ng L^{-1} de cada fitoestrógeno. Intensidade dos picos no cromatograma (B) revela a degradação dos fitoestrógenos em água potável.

4.3.4. Efluente de ETE

Os resultados para os ensaios de recuperação para efluente de ETE estão sumarizados na Tabela 18, enquanto que a Figura 32 apresenta um cromatograma típico para efluente de ETE fortificado com os analitos.

Tabela 18 Resultados dos ensaios de recuperação para amostras de efluentes de ETE fortificada com os analitos (n=3)

Nível de fortificação (ng L ⁻¹)	Recuperação (%) Daidzeína	CV(%)	Recuperação(%) Genisteína	CV(%)
186,5	75	14	85	7
1166,7	105	11	108	7
2333,3	106	8	110	10

Estudos preliminares indicaram baixa recuperação dos analitos para concentrações abaixo dos valores indicados na Tabela 18. No entanto, os valores encontrados estão dentro da faixa de concentração esperada, uma vez que a análise da amostra testemunha de efluente de ETE (Figura 32) já apresenta os fitoestrógenos em concentrações da ordem de centenas de nanogramas por litro e, portanto, os níveis de recuperação encontrados estão dentro do escopo deste trabalho.

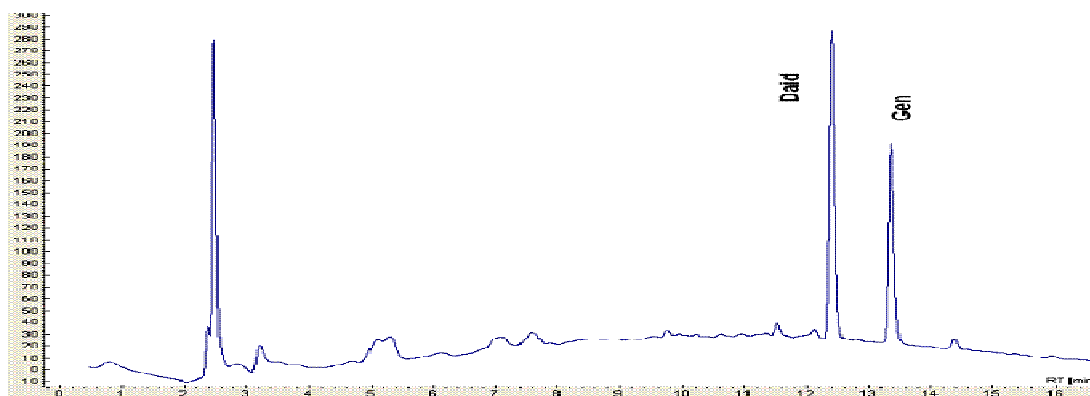


Figura 32: Cromatograma (HPLC-UV) do extrato efluente de ETE com fortificação de 1,16 µg L⁻¹ de cada fitoestrógeno (1,5L; Strata-X 500mg).

4.4. Avaliação da seletividade :

4.4.1. Água subterrânea e superficial

Os cromatogramas da amostra testemunha de água subterrânea e superficial, indicadas na Figura 33 e 34, respectivamente, não apresenta picos nos tempos de retenção dos fitoestrógenos DAID e GEN. Portanto, o método proposto é seletivo para determinação destes fitoestrógenos em águas subterrânea e superficiais

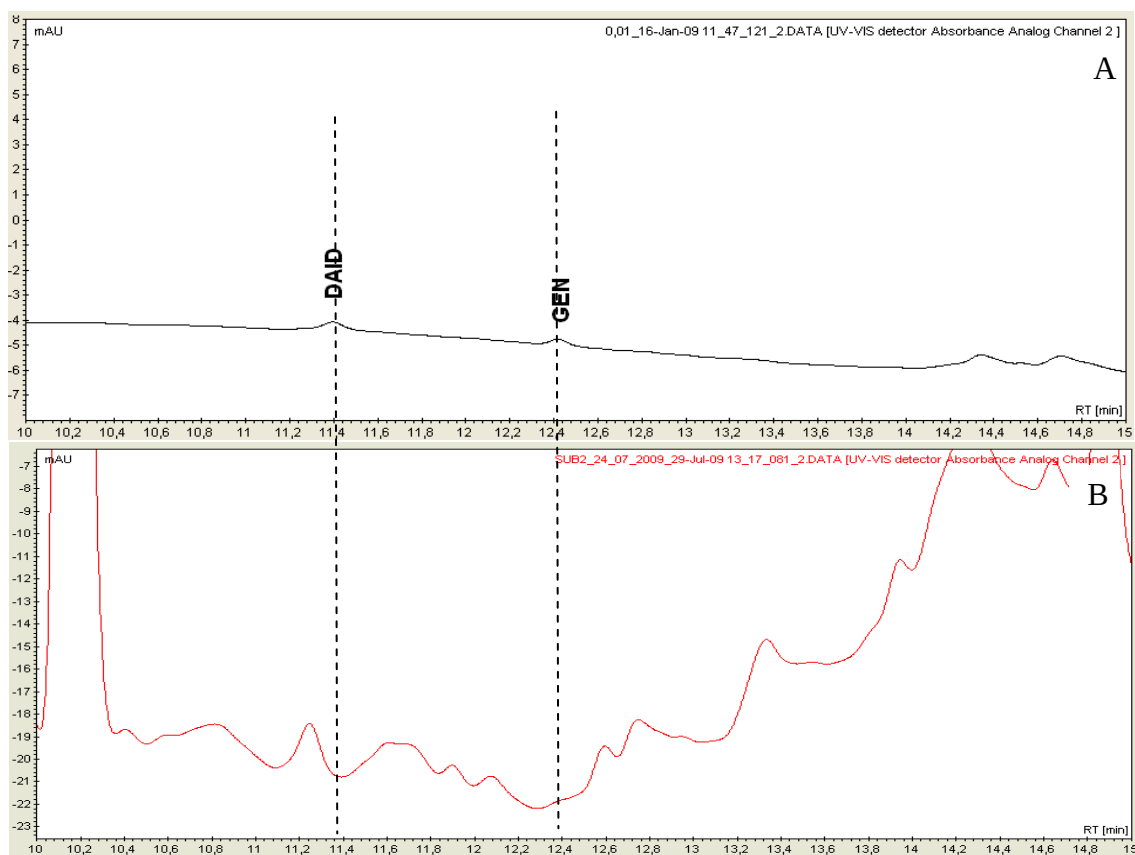


Figura 33: Comparação entre os cromatogramas do padrão na menor concentração estudada ($0,01\mu\text{g mL}^{-1}$) (A) e da amostra testemunha de água subterrânea (B).

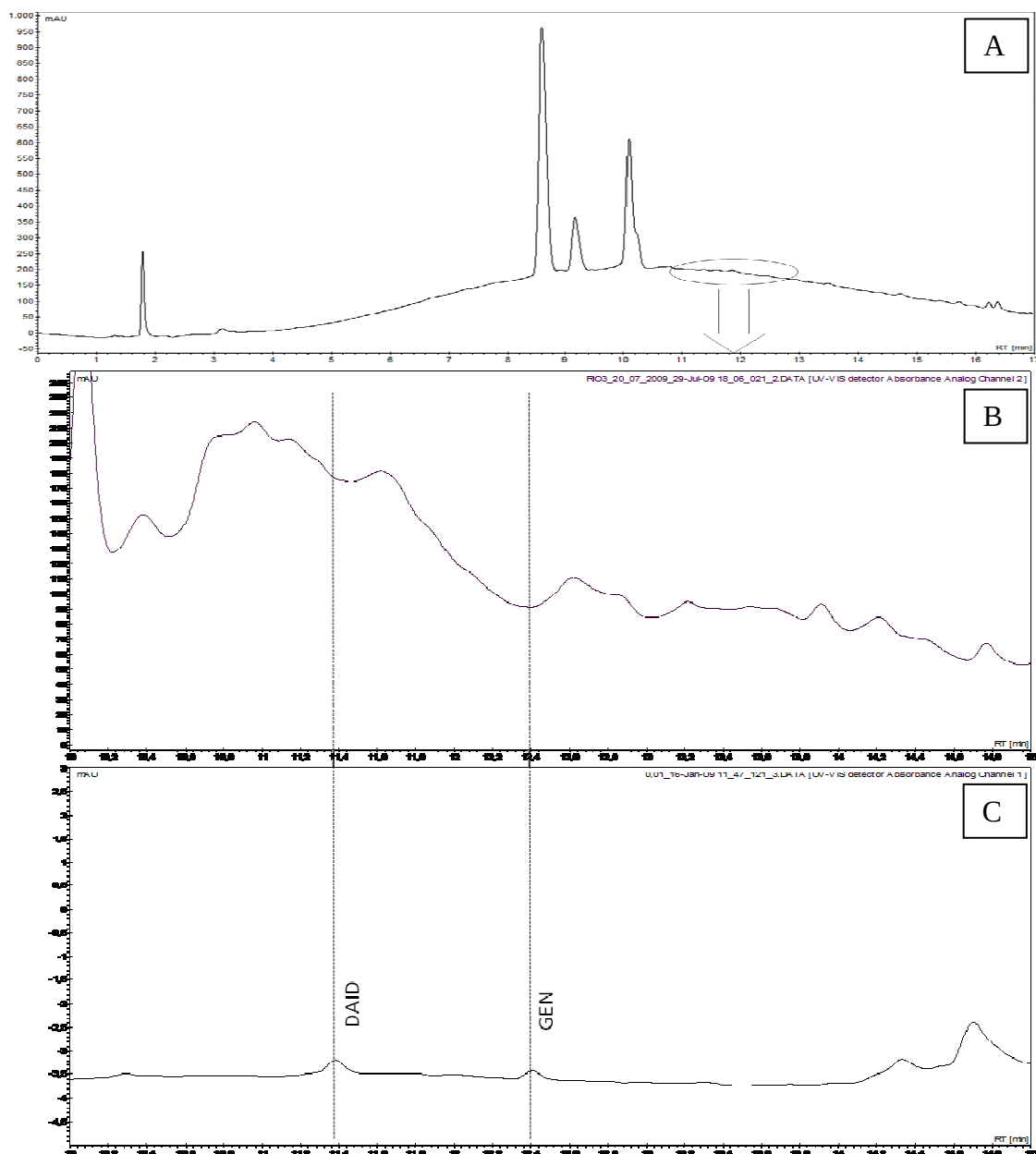


Figura 34: Cromatograma completo da amostra testemunha de água superficial (A), ampliação da região de interesse (B) e comparação com o padrão na menor concentração estudada ($0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$) (C)

Observando-se as figuras acima, constata-se a ausência de picos nos mesmos tempos de retenção dos fitoestrógenos DAID e GEN nas matrizes de água subterrânea e superficial. Portanto, o método proposto é seletivo para determinação destes fitoestrógenos nestas matrizes (RIBANI et al., 2004).

4.4.2.-Efluente de ETE

Uma vez que a amostra testemunha de efluente de ETE, (Figura 35) revela a presença de picos correspondentes a GEN e DAID, a avaliação da seletividade nesta matriz foi realizada recorrendo-se à técnica de adição de padrão, cujos resultados encontram-se dispostos na Tabela 19.



Figura 35: Cromatograma da amostra testemunha de efluente de ETE

Tabela 19: Dados da regressão da curva analítica efetuada na amostra de Efluente de ETE e em solvente

Parâmetro	Daidzeína		Genisteína	
	Matriz	Solvente	Matriz	Solvente
Coefficiente linear (A)	-42,45	1,52	-9,39	-57,24
Coefficiente angular (B)	156,28	145,57	138,28	143,68
Coefficiente de correlação (R^2)	0,9988	0,99843	0,9996	0,9943
Numero de pontos (N)	6	10	6	6

Comparando-se as curvas obtidas com a adição de padrão e pelo método de padronização externa, pode-se observar o paralelismo entre estas curvas e, assim, ficando demonstrado que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse. Portanto, o referido método é seletivo para determinação de fitoestrógenos em efluentes de ETE.

4.5. Avaliação do efeito de matriz em água subterrânea e superficial

Os dados referentes à regressão linear efetuada nas amostras de água subterrânea e superficial foram agrupados e encontram-se dispostas na Tabela 20.

Tabela 20: Parâmetros das curvas analíticas obtidas com os padrões em solvente e nas matrizes de água subterrânea e superficial.

Matrizes de água subterrânea e superficial.					
Parâmetro		Daidzeína		Genisteína	
		Matriz	Solvente	Matriz	Solvente
Água Subterrânea	Coefficiente linear (A)	1,38	1,52	- 4,4	0,12
	Coefficiente angular (B)	153,12	145,57	143,55	134,08
	Coefficiente de correlação (R^2)	0,99996	0,99843	0,99996	0,99863
	Numero de pontos (N)	6	10	6	11
Água Superficial	Coefficiente linear (A)	17,65	1,52	-9,39	0,12
	Coefficiente angular (B)	144,36	145,57	138,28	134,08
	Coefficiente de correlação (R^2)	0,9997	0,99843	0,9996	0,99863
	Numero de pontos (N)	6	10	6	11

Os resultados mostram que há uma concordância entre os coeficientes angulares realizados na matriz com aqueles realizados através do método de calibração externa, havendo diferença não superior a 7% para ambos os analitos nas matrizes de água superficial e subterrânea.

Dessa forma, pode-se concluir que a resposta do detector UV não é afetada pela matriz de água subterrânea e superficial nas condições analíticas utilizadas e, portanto, qualquer efeito de matriz pode também ser desprezado nestas amostras.

4.6. Avaliação da precisão instrumental na matriz de água subterrânea, superficial e efluente de ETE.

A precisão instrumental é também um importante parâmetro de ser avaliado na presença das matrizes estudadas em todos os métodos analíticos desenvolvidos. Desta forma, está compilado na Tabela 21 os resultados deste estudo para as matrizes de água subterrânea, superficial e também de efluente de ETE.

Tabela 21: Resultados do estudo da precisão instrumental para amostras de água subterrânea e superficial fortificados com 875 ng mL⁻¹ dos analitos e efluente de ETE, fortificado com 1,1 µg L⁻¹ (n = 7)

Matriz \ Parâmetro	Daidzeína			Genisteína		
	Área média	Desvio padrão	CV(%)	Área média	Desvio padrão	CV(%)
Água Subterrânea	787	7	0,9	707	6	0,9
Água Superficial	804	11	2	671	7	1
Efluente de ETE	798	7	0,9	746	8	1

Observando-se a Tabela 21, notam-se baixos coeficientes de variação para injeções sucessivas destas amostras, com valores próximos a 1%. Apenas as injeções de DAID em amostras de água superficial apresentaram coeficiente de variação na casa dos 2%. Dessa forma, tendo-se em vista o alto grau de complexidade das matrizes estudadas, podemos concluir que o método apresenta precisão aceitável para o escopo deste trabalho, cuja precisão instrumental ($CV \leq 2\%$) é compatível com os dados apresentados na literatura nas matrizes em questão (KANG; PRICE; HICK, 2006; ERBS et. al., 2007).

4.7. Limite de detecção e quantificação para as matrizes estudadas

Os resultados obtidos no estudo de recuperação do método, o LD e o LQ para água subterrânea, superficial e efluente de ETE estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22: Limites de Detecção e Quantificação do método para a matriz de água subterrânea, superficial e efluente de ETE

Analito	Daidzeína		Genisteína	
	LD (ng L ⁻¹)	LQ (ng L ⁻¹)	LD (ng L ⁻¹)	LQ (ng L ⁻¹)
Água Subterrânea	1,40	6,13	0,98	2,62
Água Superficial	1,73	26,5	1,22	17,5
Efluente de ETE	2,3	188,4	2,0	186,6

Os limites de quantificação do método proposto para amostras de água subterrânea e superficial utilizando-se o método estatístico são compatíveis com os limites descritos na literatura para métodos cromatográficos que utilizam detecção UV-Vis, como o desenvolvido por Ribeiro e colaboradores (2007). Os limites de detecção também mostraram-se apropriados para os níveis detectados nesta matriz.

Os limites de detecção e de quantificação são mais altos para a matriz de efluente de ETE quando comparada às demais, fato que já era previsto devido à complexidade da matriz de esgoto tratado. Apesar disto, os limites estão dentro da faixa esperada dos analitos nesta matriz, cerca de centenas de nanogramas por litro de efluente.

4.8. Análise de fitoestrógenos em amostras de Araraquara

As amostras de água subterrânea, superficial e efluente de ETE foram coletadas no período de junho a dezembro de 2009. Os dados referentes a estas análises estão dispostos na Tabela 23. Observou-se concentrações abaixo do limite de detecção para estes fitoestrógenos em amostras de água subterrânea e superficial nos pontos de amostragem escolhidos no período

amostrado. Já para a amostra de efluente de ETE, os fitoestrógenos foram detectados em todas as amostragens realizadas

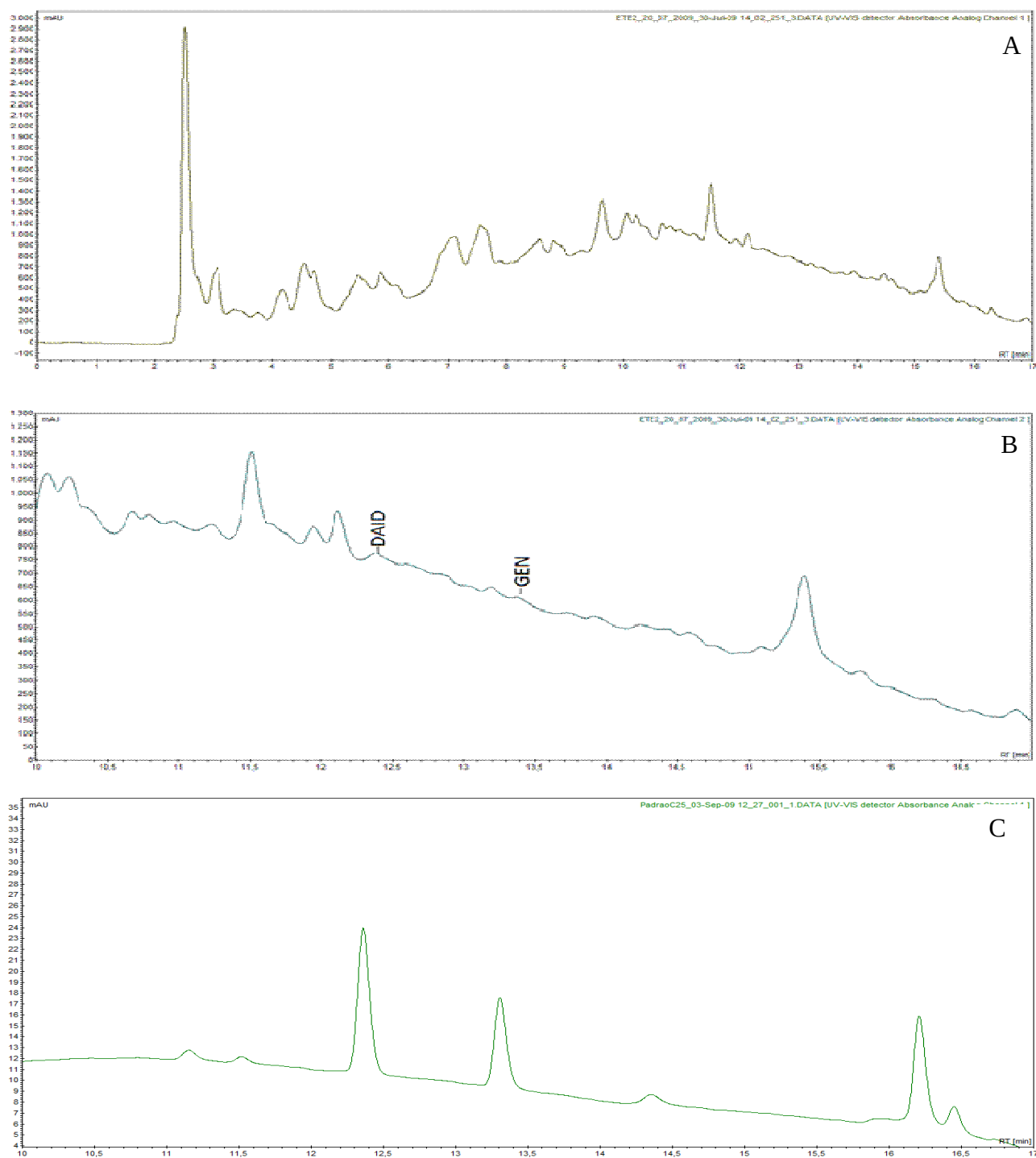


Figura 36: Cromatograma completo de efluente de ETE (A). Ampliação da região de interesse (B). Cromatograma do padrão dos fitoestrógenos na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (C)

Tabela 23. Concentrações de DAID e GEN encontradas nas amostras ambientais analisada neste trabalho

Analito	Matriz	Junho		Julho		Agosto		Setembro		Outrubro		Novembro	
		Média (ng L ⁻¹)	CV (%)	Média (ng L ⁻¹)	CV (%)	Média (ng L ⁻¹)	CV (%)	Média (ng L ⁻¹)	CV (%)	Média (ng L ⁻¹)	CV (%)	Média (ng L ⁻¹)	CV (%)
DAID	Água subterrânea	<1,40	-	<1,40	-	<1,40	-	<1,40	-	<1,40	-	<1,40	-
	Água de rio	<1,73	-	<1,73	-	<1,73	-	<1,73	-	<1,73	-	<1,73	-
	Efluente de ETE	249	11	76 ^a	22	233	18	213	7	217	15	288	4
GEN	Água subterrânea	<0,98	-	<0,98	-	<0,98	-	<0,98	-	<0,98	-	<0,98	-
	Água de rio	<1,22	-	<1,22	-	<1,22	-	<1,22	-	<1,22	-	<1,22	-
	Efluente de ETE	60 ^a	10	187	9	86 ^a	16	226	14	100 ^a	16	306	16

- Não avaliado.

^a estimativa da concentração, uma vez que este valor encontra-se abaixo do LQ para esta matriz.

Com relação ao Ribeirão das Cruzes, apesar da indicação de que este manancial sofre a ação antropogênica, as amostragens realizadas entre junho e novembro de 2009 revelam concentrações abaixo do limite de detecção destas moléculas. As concentrações destes fitoestrógenos também ficaram abaixo do limite de detecção dos para amostras de água subterrânea no ponto de captação de água para abastecimento da cidade de Araraquara.

Já as amostras de efluente de ETE de Araraquara mostraram concentrações preocupantes destes fitoestrógenos despejados no curso d'água do Ribeirão das Cruzes. O período amostrado demonstra concentrações na faixa de 60 a 306 ng L⁻¹ para GEN e 76 a 288 ng L⁻¹ para DAID nos efluentes de de ETE

Cabe ressaltar que o ponto de coleta no Ribeirão das Cruzes abordado neste trabalho é a montante do lançamento de efluentes da Estação de Tratamento de Esgoto de Araraquara. Assim, os resultados gerados indicam a ausência de GEN e DAID oriundas de fontes naturais neste corpo d'água, como lavagem da superfície de vegetais contendo tais substâncias e lixiviação de esterco animal, além de outras fontes, como despejos de água de irrigação e de esgotos clandestinos no corpo deste rio (LAGANÀ et al., 2004).

Por outro lado, a análise dos efluentes de ETE revela uma grande quantidade destes contaminantes despejados continuamente no Ribeirão das Cruzes.

Estes dados corroboram o fato de que as estações de tratamento de esgoto não conseguem eliminar por completo os fitoestrógenos presentes nesta matriz. Apesar da baixa estrogenicidade associada aos fitoestrógenos de soja, as altas concentrações lançadas no Ribeirão das Cruzes reveladas neste trabalho pode representar impacto aos organismos aquáticos, mesmo que pontualmente nas redondezas do despejo.

As concentrações de fitoestrógenos quantificadas neste trabalho revelam-se muito superiores àquelas encontradas em ETE na maior parte do mundo. De modo geral, as concentrações encontradas destes fitoestrógenos em efluente de ETE nos países europeus não ultrapassam a centena de nanogramas por litro destes AE, ao passo que no efluente analisado a média de despejo alcança níveis de 150 e 200 ng L⁻¹ de DAID e GEN respectivamente.

As diferentes dinâmicas de transporte e degradação das substâncias, resultantes das variáveis físico-químicas dos corpos d'água, como pH, demanda química e biológica de oxigênio e matéria orgânica total, além da diversidade de microorganismos existentes em cada região podem tornar complexa e até mesmo impraticável a análise e comparação direta dos dados demonstrados neste trabalho com os resultados publicados nos demais países do mundo.

Sabe-se, por exemplo, que as múltiplas tecnologias empregadas no tratamento de esgoto, o tamanho do emissário considerado (MOURA, 2009) e também as diferentes características populacionais que compõem um determinado local de estudo caracteriza-se como um fator crítico que deve ser considerado para análise dos níveis quantificados destes contaminantes. Outro fator muito importante é a diferença climática entre as regiões consideradas, uma vez que a temperatura parece afetar as concentrações destes contaminantes no meio ambiente, como demonstrado pelo trabalho de Ribeiro e colaboradores (2008). Neste trabalho, concentrações de até 160 ng L^{-1} dos fitoestrógenos foram quantificadas no verão português, enquanto no inverno frio estes mesmos AE não foram detectados.

Neste estudo, os dados meteorológicos para Araraquara, apresentados na Tabela 24, indicam que a temperatura e o aumento da pluviosidade tem efeito positivo no aumento da concentração de fitoestrógenos no efluente de ETE. Isto pode ser explicado de duas maneiras. Uma delas é que a atividade microbiológica aumenta com o aumento da temperatura, favorecendo a hidrólise enzimática dos fitoestrogenos glicosilados (daidzina e genistina) originando os não glicosilados (DAID e GEN). Por outro lado, o aumento da pluviosidade no período e, principalmente, nas 24 horas que antecedeu as coletas, podem aumentar a turbulência nas lagoas de aeração, favorecendo a aeração e também a atividade microbiana. O gráfico apresentado na Figura 36 ilustra esta correlação entre os valores de concentração de fitoestrógenos encontrados e os dados meteorológicos no período amostrado (Junho a Novembro de 2009).

Tabela 24: Dados meteorológicos para Araraquara, no período de julho a novembro/2009

	Temperatura média (°C)	Precipitação ¹			
		número de dias com chuva	Total acumulado (mm)	Precipitação* nas últimas 24 horas (mm)	Média climatológica** (mm)
Junho	20,5	5	49,8	0	55,7
Julho	25,3	7	60,1	0	20,5
Agosto	26,2	6	156,6	0	23,7
Setembro	27,7	14	130,3	7,7	59,9
Outubro	29,1	12	98,5	19,3	131,6
Novembro	30,7	22	207	26,3	151,6

¹Fonte: Coordenadoria de Defesa Civil do Estado de São Paulo (<http://www.defesacivil.sp.gov.br>)

*Média corresponde a chuva acumulada entre às 09:00h do dia e às 09:00h do dia anterior.

**Média climatológica é a média prevista para esta época do ano

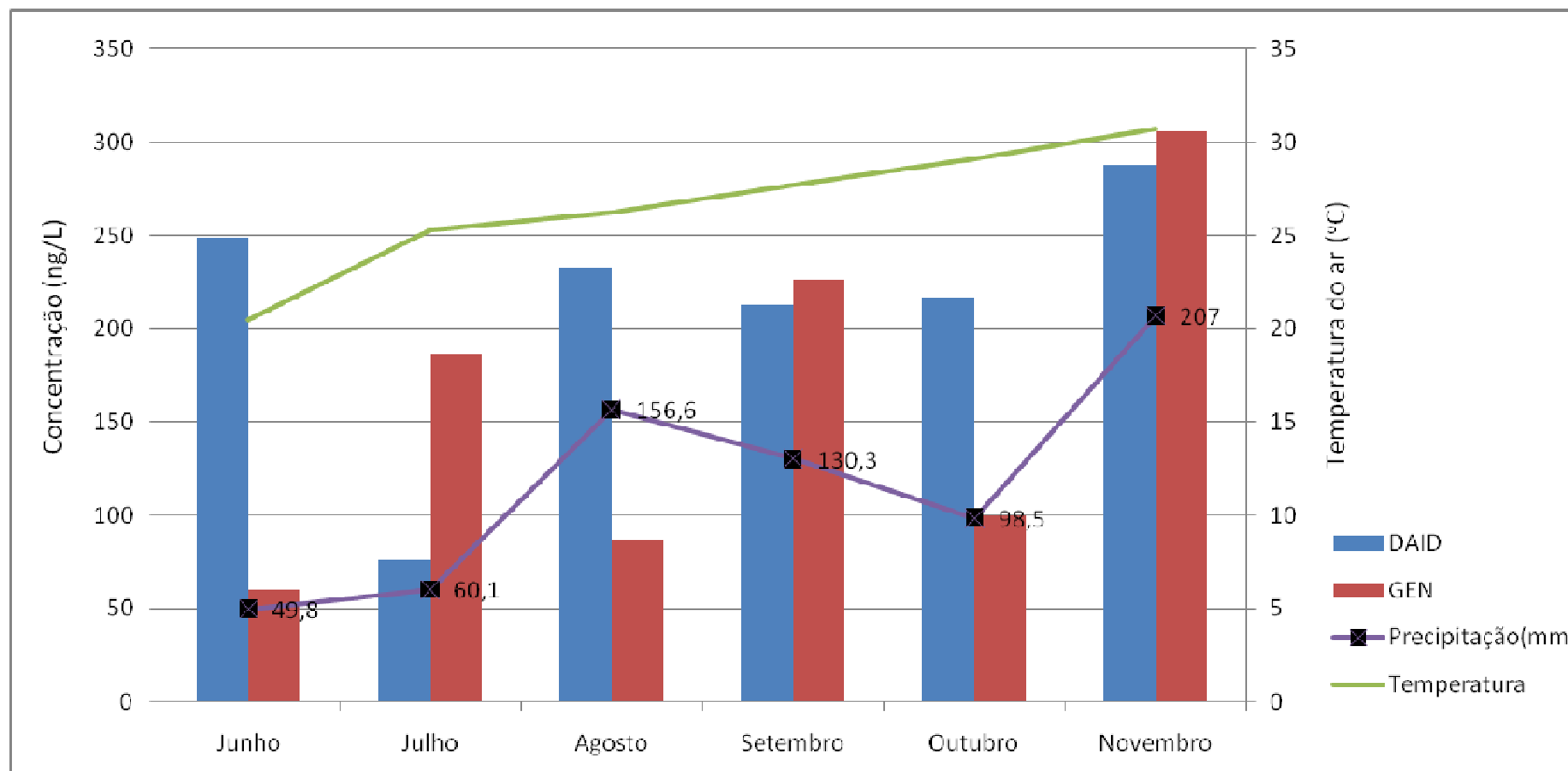


Figura 37: Disposição gráfica dos dados de concentração obtidos para DAID e GEN em efluente da ETE-Araraquara e os dados meteorológicos para o município no período de amostragem (junho a novembro/2009)

5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Do ponto de vista analítico, uma das contribuições desta dissertação foi a proposta de um método cromatográfico (HPLC/UV) que emprega MeOH/água sendo uma alternativa ao uso de acetonitrila que, além de mais tóxica e ambientalmente impactante que o metanol, também tem seu fornecimento mundial centralizado em poucos fabricantes, o que pode ocasionar problemas com a abastecimento deste solvente, como a escassez e extrema elevação de preços ocorrida em 2009.

Ainda do ponto de vista analítico, este trabalho apresenta um detalhado estudo de validação de método para determinação de daidzeína e genisteína em matrizes de água subterrânea, água de rio e efluente de ETE. São apresentados os limites de detecção e de quantificação do método, parâmetros que não são fornecidos em trabalhos já publicados na literatura. Os limites de quantificação atingidos pelo método proposto são adequados ao tipo de estudo abordado neste trabalho. Para daidzeína os limites de quantificação para as matrizes de água subterrânea, superficial e efluente de ETE foram, respectivamente, 6, 26 e 188 ng L⁻¹. Para genisteína estes valores foram 2, 17 e 187 ng L⁻¹, respectivamente.

Para as amostras de água subterrânea e do Ribeirão das Cruzes, no ponto de captação para abastecimento do município de Araraquara, situado a montante do lançamento de efluentes da ETE, as concentrações de daidzeína e genisteína situaram-se abaixo dos limites de detecção. Já para as amostras de efluente de ETE, os fitoestrógenos estudados foram identificados em todas as amostras coletadas, sendo que as concentrações situaram-se entre 60 e 306 ng L⁻¹ para genisteína e de 76 a 288 ng L⁻¹ para daidzeína.

Os dados ambientais obtidos neste trabalho são os primeiros já reportados para o estado de São Paulo para DAID e GEN nas matrizes estudadas e indicam remota possibilidade de exposição humana a estes fitoestrógenos por água potável em Araraquara. Por outro lado, apontam para a necessidade de estudos mais detalhados sobre a dispersão de DAID e GEN a partir do ponto de lançamento dos efluentes da ETE. Também são necessários estudos que avaliem o risco potencial à biota aquática que a ocorrência destes fitoestrógenos no Ribeirão das Cruzes pode significar.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, B. D.; McCAULEY, L. Breast cancer, estrogen, soy genistein, and other dietary factors: towards an understanding of their mechanistic interactions. **Nutrition & Food Science**, v. 35, n. 1, p. 35-42, 2005.
- ADLERCREUTZ, H. Phyto-oestrogens and cancer. **Oncology**, v. 3, n. 6, p. 364-373, 2002.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Aprova o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 jun. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 6 jun. 2010.
- AGUIAR, L. C.; BAPTISTA, A. S.; ALENCAR, S. M.; HADDAD, R. ; EBERLIN, M. N. Analysis of isoflavonoids from leguminous plant extracts by RPHPLC/DAD and electrospray ionization mass spectrometry. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 58, n. 2, p. 116-124, 2007.
- ALBERTAZZI, P.; PURDIE, D. W. The nature and utility of the phytoestrogens: a review of the evidence. **Maturitas**, v. 42, n. 3, p.173-185, 2002.
- AMERICAN CHEMISTRY CONCIL. **Chemicals in the environment and the endocrine system**. Disponível em: <http://www.americanchemistry.com/s_phthalate/sec.asp?CID=2014&DID=8697>. Acesso em: 14 jun. 2010.
- ARARAQUARA. Departamento Autônomo de Água e Esgoto. **Estações de tratamento água-ETAs**. Disponível em: <<http://www.daaearaquara.com.br/>>. Acesso em: 10 jun. 2010a.
- ARARAQUARA. Departamento Autônomo de Água e Esgoto. **Estações de tratamento de esgotos**. Disponível em: <<http://www.daaearaquara.com.br/>>. Acesso em: 10 jun. 2010b.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE MEDICINA BIOMOLECULAR. **Hormônios femininos: estrógenos e progesterona**. São Paulo, 2008. Disponível em: <<http://www.medicinacomplementar.com.br/tema4nov08.asp>>. Acesso em: 24 abr. 2010.
- AURIOL, M.; FILALI-MEKNASSI, Y.; TYAGI, R. D.; ADAMS, C. D.; SURAMPALLI, R. Y. Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 525-539, 2006.
- BACALONI, A.; CAVALIERE, C.; FABERI, A.; FOGLIA, P.; SAMPERI, R.; LAGANÀ, A. Determination of isoflavones and coumestrol in river water and domestic wastewater sewage treatment plants. **Analytica Chimica Acta**, v. 531, n. 2, p. 229-237, 2005.

BARBOSA, A. C. L.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Teores de isoflavonas e capacidade antioxidante da soja e produtos derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 921-926, 2006.

BARROS, C. B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 175-177, 2002.

BICCHI, C.; SCHILIRÒ, T.; PIGNATA, C.; FEA, E.; CORDERO, C.; CANALE, F.; GILLI, G. Analysis of environmental endocrine disrupting chemicals using the E-screen method and stir bar sorptive extraction in wastewater treatment plant effluents. **The Science of the Total Environment**, v. 407, n. 6, p. 1842-51, 2009.

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

BLOM, M. J.; WASSINK, M. G.; KLOOSTERBOER, H. J.; EDERVEEN, A. G. H.; LAMBERT, J. G. D.; GOOS, H. J. T. H. Metabolism of estradiol, ethynilestradiol, and moxestrol in rat uterus, vagina, and aorta: influence of sex steroid treatment. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 29, n. 1, p. 76-81, 2001.

BOHM, G. M. B.; GENOVESE, M. I.; PIGOSSO, G.; TRICHEZ, D.; ROMBALDI, C. V. Resíduos de glifosato e ácido aminometilfosfônico e teores de isoflavonas em soja BRS 244 RR e BRS 154. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 192-197, 2008.

BRITO, N.; M.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BULUN, S. E.; ZEITOUN, K. M.; TAKAYAMA, K.; SASANO, H. Estrogen biosynthesis in endometriosis: molecular basis and clinical relevance. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 1, p. 35-42, 2000.

CAMPBELL, C. G.; BORGLIN, S. E.; GREE, F. B.; GRAYSON, A.; WOZEI, E.; STRINGFELLOW, W. T. Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: a review. **Chemosphere**, v. 65, n. 8, p. 1265-1280, 2006.

CARSON, R. **Silent spring**. Boston: Boston University Press, 1962.

CLAPAUCH, R.; MEIRELLES, R. M. R.; JULIÃO, M. A. S. G.; LOUREIRO, C. K. C.; GIARODOLI, P. B.; PINHEIRO, S. A.; HARRIGAN, A. R.; SPRITZER, P. M.; PARDINI, D. P.; WEISS, R. V.; ATHAYDE, A.; RUSSO, L. A.; PÓVOA, L. C. Fitoestrogênios: posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). **Arquivos Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 6, p. 679-695, 2002.

CLARKE, L. H.; CHO, E.; ONOJAFE, I.; RAYGADA, M.; CLARKE, R. Maternal exposure to genistein during pregnancy increases carcinogen-induced mammary tumorigenesis in female rat offspring. **Oncology Reports**, v. 6, n. 5, p. 1089-1095, 1999.

CLOTFELTER, E. D.; RODRIGUEZ, A. C. Behavioral changes in fish exposed to phytoestrogens. **Environmental Pollution**, v. 144, n. 3, p. 833-839, 2006.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Água: os comitês que cuidam da sua conservação em São Paulo. **Diário Oficial do Estado**, São Paulo, v. 113, n. 51, p. 83, 2003.

COOPERATIVA DE SERVIÇOS, PESQUISAS TECNOLÓGICAS E INDUSTRIAIS. **Elaboração da revisão do plano de bacia da unidade de gerenciamento de recursos hídricos do Tietê/Jacaré (UGRHI 13)**. São Paulo, 2008. Relatório Técnico, 402.

COS, P.; BRUYNE, T. D.; APERS, S.; BERGHE, D. V.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Phytoestrogen: recent developments. **Planta Medica**, v. 69, n. 7, p. 589-599, 2003.

DELCLOS, K. B.; WEIS, C. C.; BUCCI, T. J.; OLSON, G.; MELLICK, P.; SADOVOVA, N.; LATENDRESSE, J. R.; THORN, B.; NEWBOLD, R. R. Overlapping but distinct effects of genistein and ethinyl estradiol (EE2) in female Sprague-Dawley rats in multigenerational reproductive and chronic toxicity studies. **Reproductive Toxicology**, v. 27, n. 2, p. 117-132, 2009.

DIXON, R. A.; FERREIRA, D. Genistein. **Phytochemistry**, v. 60, n. 3, p. 205-211, 2002.

DUARTE, P. A. F. **Novos poluentes. Principais impactes de compostos desreguladores endócrinos na saúde pública**. 2008. 115 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2008.

DUFTY, A. M. Jr.; CLOBERT, J.; MØLLER, A. P. Hormones, developmental plasticity and adaptation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 17, n. 4, p. 190-196, 2002.

EMANUELE, N.; EMANUELE, M. A. The endocrine system. Alcohol alters critical hormonal balance. **Alcohol Health & Research World**, v. 21, n 1, p. 53-64, 1997.

ENOKIZONO, J.; KUSUHARA, H.; OSE, A.; SCHINKEL, A. H.; SUGIYAMA, Y. Quantitative investigation of the role of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting brain and testis penetration of xenobiotic compounds. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, n. 6, p. 995-102, 2008.

ERBS, M.; HOERGER, C. C.; HARTMANN, N.; BUCHELI, T. D. Quantification of six phytoestrogens at the nanogram per liter level in aqueous environmental samples using 13 C3-labeled internal standards. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 21, p. 8339-8345, 2007.

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/pdf/valid.pdf>>. Acesso em: 14 jun. 2010.

EUROPEAN UNION. **Community strategy for endocrine disrupters**: range of substances suspected of interfering with the hormone system of humans and wildlife. Bruxelas: Commission of the European Communities, 1999.

FARRÉ, M.; GROS, M.; HERNÁNDEZ, B.; PETROVIC, M.; HANCOCK, P. BARCELÓ, D. Analysis of biologically active compounds in water by ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 1, p. 41-51, 2008.

FERNANDES, J. D. Os benefícios das isoflavonas de soja na alimentação actual. **Nutricias**, n. 6, p. 54-59, maio 2006.

FERNANDES, J. S.; FORTUNATO, J. M. S.; PINTO, J. C. **Fisiologia do sistema reprodutor feminino**. Disponível em: <www.uff.br/WebQuest/downloads/FisiolApRepFem.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2010.

FERREIRA, M. G. M. **Remoção da atividade estrogênica de 17 β -estradiol e de 17 α -etinilestradiol pelos processos de ozonização e O₃/H₂O₂**. 2008. 173 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

FLORÊNCIO, L.; BASTOS, F. K. X.; AISSE, M. M. (Coord.). **Tratamento e utilização de esgotos sanitários**. Rio de Janeiro: FINEP/PROSAB, 2006. 427 p.

FRIEDRICH, K. **Alteração da expressão do receptor de estrogênio subtipo α relacionada a abertura de vagina em ratas Sprague-Dawley**. 2008. 100 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

FUNDAÇÃO SISTEMA ESTADUAL DE ANÁLISE DE DADOS. **Perfil municipal**. Disponível em: <<http://www.seade.gov.br/produtos/perfil/perfil.php>>. Acesso em: 10 jun. 2010.

FUNDAÇÃO SISTEMA ESTADUAL DE ANÁLISE DE DADOS. **Anuário estatístico do estado de São Paulo**. 2003. Disponível em: <https://www.seade.gov.br/produtos/anuario/2003/mam/mam2003_m01.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2010.

GAGLIARDINO, J. G. Endocrinologia: princípios gerais. In : HOUSSAY, A. B.; CINGOLANI, H. E. **Fisiologia humana de Houssay**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 538.

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

GLAZIER, M. G.; BOWMAN, M. A. A review of evidence for use of phytoestrogens as a replacement for traditional estrogen replacement therapy. **Archives of Internal Medicine**, v. 161, n. 9, p. 1161-1172, 2001.

GOETTLICH, P. **What are endocrine disruptors?** 2001. Disponível em: <<http://www.mindfully.org/Pesticide/EDs-PWG-16jun01.htm>>. Acesso em: 20 mar. 2010.

GRUBER, C. J.; TSCHUGGUEL, W.; SCHENEEBERGER, C.; HUBER, J. C. Production and actions of estrogens. **The New England Journal of Medicine**. v. 346, n. 5, p. 340-352, 2002.

GUILLETTE, L. J. J.; PICKFORD, D. B.; CRAIN, D. A.; ROONEY, A. A.; PERCIVAL, H. F. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. **General and Comparative Endocrinology**, v. 101, n. 1, p. 32-42, Jan. 1996.

GUTENDORF, B.; WESTENDORF, J. Comparison of an array of *in vitro* assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens. **Toxicology**, v. 166, n.1-2, p. 79-89, 2001.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Os hormônios adrenocorticais**: tratado de fisiologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 786-799.

HAN, K. K.; SOARES JÚNIOR, J. M.; HAIDAR, M. A.; GIRÃO, M. J. B. C.; NUNES, M. G.; LIMA, G. R.; BARACAT, E. C. Efeitos dos fitoestrogênios sobre alguns parâmetros clínicos e laboratoriais no climatério. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 24, n. 8, p. 547-552, 2002.

HENDRICH, S. Bioavailability of isoflavones. **Journal of Chromatography B**, v. 777, n. 1-2, p. 203-210, 2002.

HIRATA, R.; SUHOGUSOFF, A.; FERNANDES, A. Groundwater resources in the State of São Paulo (Brazil): the application of indicators. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 1, p. 141-152, 2007.

THE HORMONE FOUNDATION. **The endocrine system**: diseases, types of hormones & more. Disponível em: <<http://www.hormone.org/endo101/>>. Acesso em: 24 abr. 2010.

INGHAM, R. R.; GESUALDI, D. A.; TOTH, C. R.; CLOTFELTER, E. D. Effects of genistein on growth and development of aquatic vertebrates. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 72, n. 3, p. 625-631, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGCRE-008**: orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro, 2003.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **ICH harmonised tripartite. Guideline**: validation of analytical procedures: text and methodology, q2

(r1) (CPMP/ICH/381/95). 1995. Disponível em:
<<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2010.

INTERNATION UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Compendium of chemical terminology**. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/M03759.html>>. Acesso em: 16 de jun. 2010.

JEFFERSON, W. N.; COUSE, J. F.; BANKS, E. P.; KORACH, K. S.; NEWBOLD, R. R. Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER) α expression and multioocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ER β -mediated and nonestrogenic actions. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 4, p. 1285-1296, 2002.

KANG, K.; PRICE, W. E.; HICK, L. A. Simultaneous determination of isoflavones and lignans at trace levels in natural waters and wastewater samples using liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 16, p. 2411-2418, 2006.

KAVLOCK, R. J.; DASTON, J. P. DEROSA, C.; CRISP, P. F.; GRAY, L. E.; KAATTARI, S.; LUCIER, G.; LUSTER, M.; MAC, M. J.; MacZKA, C; MILLER, R.; MOORE, J.; ROLLAND, R.; SCOTT, G.; SHEEHAN, D. M.; SINKS, T.; TILSON, H. A. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors:a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. **Environmental Health Perspectives**, v.104, p.715-740, 1996. Supplement 4.

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

KING, R. A.; BURSILL, D. B. Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, n. 5 p. 867-72, 1998.

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

KULLING, S. E.; HONIG, D. M.; SIMAT, T. J.; METZLER, M. Oxidative *in vitro* metabolism of the soy phytoestrogens daidzein and genistein. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 48, n. 10, p. 4963-4972, 2000.

KURZER, M. S.; XU, X. Dietary phytoestrogens. **Annual Review of Nutrition**, v. 17, p. 353-81, 1997.

KUSTER, M.; AZEVEDO, D. A.; ALDA, M. J. L.; AQUINO NETO, F. R.; BARCELÓ, D. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters

from Rio de Janeiro (Brazil). **Environment International**, v. 35, n. 7, p. 997-1003, 2009.

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

LIGGINS, J.; BLUCK, L. J. C.; RUNSWICK, S.; ATKINSON, C.; COWARD, W. A.; BINGHAM, S. A. Daidzein and genistein contents of fruits and nuts. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, n.6, p. 326-331, 2000a.

LIGGINS, J.; BLUCK, L. J. C.; RUNSWICK, S.; ATKINSON, C.; COWARD, W. A.; BINGHAM, S. A. Daidzein and genistein contents of vegetables. **British Journal of Nutrition**, v. 84, n. 5, p. 717-725, 2000b.

LIPSEN, S. F.; ELLISON, P. T. Comparasion of salivary steroid profiles in naturally occurring conception and non-conception cycles. **Human Reproduction**, v. 11, n. 10, p. 2090-2096, 1996.

LOPES, L. G. **Estudo sobre a ocorrência de estrógenos em águas naturais e tratadas da região de Jotocabal-SP**. 2007. 121 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

LOT, A. **Caracterização da qualidade da água do Ribeirão das Cruzes – Araraquara (SP) através das variáveis físicas e químicas e dos macroinvertebrados bentônicos**. 2006. 47 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente)-Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Centro Universitário de Araraquara, Araraquara, 2006.

LOURENCETTI, C.; MARCHI, M. R. R.; RIBEIRO, M. L. Determination of sugar cane herbicides in soil and soil treated with sugar cane vinasse by solid-phase extraction and HPLC-UV. **Talanta**, v. 77, n. 2, p. 701-709, 2008.

MACEDO, M. F. **Avaliação do sistema de monitoramento de recursos hídricos e da viabilidade técnica, legal e econômica da aplicação da resolução CONAMA 357/2005 para a sub-bacia do Ribeirão das Cruzes (Araraquara-SP)**. 2007. 96 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente)-Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Centro Universitário de Araraquara, Araraquara, 2007.

MACEDO, M. F.; TEIXEIRA, D.; RIOS, L. Análise da influência do ambiente urbano na qualidade das águas do Ribeirão das Cruzes no município de Araraquara - SP. In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE INGENIERÍA SANITARIA Y AMBIENTAL, 31., 2008, Santiago. **Anais...** Santiago: [s.n.], 2008.

MENDONÇA, J. V.; FARACHE FILHO, A.; LOMBARDI, R.; OLIVEIRA, S. C.; SANTOS, M. F.; SCALIZE, P. S Autodepuração do Ribeirão das Cruzes após receber efluente da estação de tratamento de esgotos do município de Araraquara.

In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 7., 2005, Caxambu. **Anais...** Caxambu: [s.n.], 2005. Disponível em: <<http://www.seb-ecologia.org.br/viiceb/resumos/319a.pdf>>. Acesso em: 4 jun. 2010.

MOURA, J. A. **Estudo da eficiência de estações de tratamento de esgoto - ETE e estações de tratamento de água – ETA na eliminação de resíduos de estrógenos naturais e sintéticos na UGRHI-13 (Tietê - Jacaré)**. 2009. 189 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

MURKIES, A. L.; WILCOX, G.; DAVIS, S. R. Phytoestrogen. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, n. 2, p 297-303, 1998.

OLSSON, L. C.; VEIT, M.; WEISSENBOCK, G.; BORNMAN, J. F. Differential flavonoid response to enhanced UV-B radiation in *brassica napus*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 3, p.1021-1028, 1998.

OSIGUWA, S. A. A.; MARKOULAKI, S.; POCOCK, V.; MILLIGANM, S. R.; FRASER, L. R. 17b-Estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function. **Human Reproduction**, v. 18, n. 1, p. 100-107, 2003.

PADUA, V. L. (Coord.). **Remoção de micro-organismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano**. Rio de Janeiro: ABES, 2009.

PELISSERO, C. B.; LATONNELLE, K.; SÉQUEIRA, A.; LAMOTHE, V. Phytoestrogens, endocrine disrupters from food. **Analisis**, v. 28, n 9, p. 763-775, 2000.

PHENOMENEX COMPANY. **High pressure liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC)**. Disponível em: <http://www.phenomenex.com/products/brands/view2.aspx?id=10317&ekmense=10_submenu_75_link_22#x>. Acesso em: 1 jul. 2009.

PIRES, A. L. **Estudo do perfil salivar e séricos em gestantes e não gestantes**. 2008. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)– Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

POOLE, C. F.; GUNATILLEKA, D. A.; SETHURAMAN, R. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 885, n. 1-2, p. 17-39, 2000.

REINLI, K.; BLOCK, G. Phytoestrogen content of foods-a compendium of literature values. **Nutrition and Cancer**, v. 26, n. 2, p. 123-148, 1996.

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

RIBEIRO, C.; PARDAL, M. A.; TIRITAN, M. E.; ROCHA, E.; MARGALHO, R. M.; ROCHA, M. J. Spatial distribution and quantification of endocrine-disrupting chemicals in Sado River estuary, Portugal. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 159, n. 1-4, p. 415-427, 2009.

RIBEIRO, C.; TIRITAN, M. E.; ROCHA, E.; ROCHA, M. J. Development and validation of a HPLC-DAD method for determination of several endocrine disrupting compounds in estuarine water. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, n. 18, p. 2729-2746, 2007.

ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Solid-phase extraction of soy isoflavones. **Journal of Chromatography A**, v. 1076, n.1-2, p. 110-117, 2005.

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

ROZEMA, J.; VAN DE STAAIJ, J.; BJORN, L. O.; CALDWELL, M. UV-B as environment factor in plant life: stress and regulation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 12, n. 1, p. 22-28, 1997.

RUSHTON, L. **The endocrine system: the human body-how its work**. New York: Chelsea House, 2009. p. 15-16.

SÃO PAULO. (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Comitê da Bacia Hidrográfica do Tietê-Jacaré. **Relatório zero: diagnóstico da situação atual dos recursos hídricos e estabelecimento de diretrizes técnicas para a elaboração do plano da bacia hidrográfica do Tietê-Jacaré**. 2000. Relatório Final. Disponível em: <http://www.sigrh.sp.gov.br/cgi-bin/sigrh_home_colegiado.exe?TEMA=RELATORIO&COLEGIADO=CRH/CBH-TJ&lwgactw=879423>. Acesso em: 10 jun. 2010.

SÃO PAULO. (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Comitê da Bacia Hidrográfica do Tietê-Jacaré. **Relatório de situação dos recursos hídricos na bacia hidrográfica Tietê-Jacaré**. 2009. Disponível em: <<http://www.sigrh.sp.gov.br/sigrh/ARQS/RELATORIO/CRH/CBH-TJ/1323/relatorio%20de%20situacao%202009.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2010.

SÃO PAULO. (Estado). Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo**. 2008. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/publicacoes.asp>>. Acesso em: 15 de jun. 2010.

SÃO PAULO. (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Sistema Integrado de Gerenciamento de Recursos Hídricos de São Paulo. **Plano Estadual de Recursos Hídricos 2004 /2007**. Disponível em: <http://www.sigrh.sp.gov.br/sigrh/ARQS/RELATORIO/CRH/1063/ugrhi_12_14.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2010a.

SÃO PAULO. (Estado). Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo. **Pactos das águas**: metas e programas municipais. Disponível em: <http://www.ambiente.sp.gov.br/pactodasaguas/pacto2/visual.php?cod_ibge=350320>. Acesso em: 12 abr. 2010b.

SCALIZE, P. S.; LEITE, W. C. A.; SITA, W.; SCOGNAMIGLIO, J. B. Aspectos construtivos e operacionais da estação de tratamento de esgotos de Araraquara – SP. In: EXPOSIÇÃO DE EXPERIÊNCIAS MUNICIPAIS EM SANEAMENTO, 7., 2003, Santo André. **Anais eletrônicos**...2003. Disponível em <http://www.semasa.sp.gov.br/Documentos/ASSEMAE/Trab_115.pdf>. Acesso em: 20 maio 2010.

SCALIZE, P. S.; LEITE, W. C. A.; RODRIGUES, J. M.; CORREA, M. S.; VENUZO, S. B.; LOMBARDI, R.; OLIVEIRA, S. C.; SANTOS, M. F. Avaliação da autodepuração do Ribeirão das Cruzes através da depressão do oxigênio dissolvido após receber efluente da ETE-Araraquara. In: ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS SERVIÇOS MUNICIPAIS DE SANEAMENTO. **Saneamento ambiental**: a hora da solução. 2004. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=REPIDISCA&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=20823&indexSearch=ID>>. Acesso em: 12 abr. 2010.

SCHOLZ, S.; KORDES, C.; HAMANN, J.; GUTZEIT, H. O. Induction of vitellogenin *in vivo* and *in vitro* in the model teleost medaka (*Oryzias latipes*): comparison of gene expression and protein levels. **Marine Environmental Research**, v. 57, n. 3, p. 235-244, 2004.

SERRANO, N. O.; FERNÁNDEZ, M. F. C.; OLMEDO, P. M. Disruptores endócrinos. el caso particular de los xenobioticos estrogenicos I. Estrogenos naturales. **Revista de Salud Ambiental**, v. 1, n.1, p. 6-11, 2001.

SHELNUTT, S. R.; CIMINO, C. O.; WIGGINS, P. A.; RONIS, M. J. J.; BADGER, T. M. Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 3, p. 588-594, 2002.

SILVA, A. C. M. **Efeitos do fitoestrogeno *Trifolium pratense* sobre a função tireóidea de ratas ovariectomizadas**. 2005. 69 f. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia)- Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

SIRTORI, C. R.; LOVATI, M. R. Soy proteins and cardiovascular disease. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 3, n. 1, p. 47-53, 2001.

SKOOG, A. D.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, A. T. **Principles of instrumental analysis**. Philadelphia: Sunders College, 1998.

SNYDER, R. L.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. New York: Wiley, 1997.

SODRÉ, F. F.; LOCATTELI, M. A. F.; MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. Origem e destino de interferentes endócrinos em águas naturais. **Caderno Temático**, v. 6, 2007. Disponível em: <<http://lqa.iqm.unicamp.br/>>. Acesso em: 24 abr. 2010.

SOYFEMME: extrato seco de glycine max (l.) merr. isoflavonas da soja. São Paulo: Laboratórios Aché. Disponível em: <<http://m.bulas.med.br/index.pl?C=A&V=66506F737449443D37343930266163743D73686F7752656164436F6D6D656E7473>>. Acesso em: 15 fev. 2010.

STANCANELLI, R.; MAZZAGLIA, A.; TOMMASINI, S.; CALABRÒ, M. L.; VILLARI, V.; GUARDO, M.; FICARRA, P.; FICARRA, R. The enhancement of isoflavones water solubility by complexation with modified cyclodextrins: a spectroscopic investigation with implications in the pharmaceutical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 4, p. 980-984, 2007.

STOPPER, H.; SCHMITT, E.; KOBRAS, K. Genotoxicity of phytoestrogens. **Mutation Research**, v. 574, n. 1-2, p. 139-155, 2005.

STRAUSS, L.; MAKELA, S.; JOSHI, S.; HUHTANIEMI, I.; SANTTI, R. Genistein exerts estrogen-like effects in male mouse reproductive tract. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 144, n. 1-2 p. 83-93, 1998.

STURMHÖFEL, S. H.; BARTKE, A. The endocrine system: an overview. **Alcohol Health & Research World**, v. 22, n. 3, p. 153-164, 1998.

SUMPTER, J. P. Feminized responses in fish to environmental estrogens. **Toxicology Letters**, v. 82/83, p. 737-742, 1995.

SUMPTER, J. P.; JOBLING, S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. **Environmental Health Perspectives** v. 103, p. 173-178, 1995. Supplement 7.

TALWAR, G. P. **Hormonal regulation of cellular metabolism**. Disponível em: <http://www.new.dli.ernet.in/rawdataupload/upload/insa/INSA_1/20005b73_354.pdf>. Acesso em: 21 maio 2010.

TERPSTRA, A. H.; BEYNEN, A. C. Density profile and cholesterol concentration of serum lipoproteins in experimental animals and human subjects on hypercholesterolaemic diets. **Comparative Biochemistry and Physiology B: Comparative Biochemistry**, v. 77, n. 3, p. 523-528, 1984.

THIGPEN, J. E.; LOCKLEAR, J.; HASEMAN, J. K.; SAUNDERS, H.; GRANT, M. F.; FORSYTHE, D. B. Effects of the dietary phytoestrogens daidzein and genistein on the incidence of vulvar carcinomas in 129/J mice. **Cancer Detection and Prevention**, v. 25, n. 6, p. 527-532, 2001.

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

TOLEDO NETTO, P. **Exposição à mistura de pesticidas em baixas doses:** validação de método e aplicação a tecido adiposo de animais de experimentação (ratos Lewis). 2009. 100 f. Dissertação (Mestrado em Química)–Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

TUNDISI, J. G.; TAKAKO, M. T.; PARESCHI, D. C.; LUZIA, A. P.; VON HAELING, P. H.; FROLLINI, E. H. A bacia hidrográfica do Tietê/Jacaré: estudo de caso em pesquisa e gerenciamento. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 63, p. 159-172, 2008.

TZCHORI, I.; DEGANI, G.; ELISHA, R.; ELIYAHU, R.; HURVITZ, A.; VAYA, J.; MOAV, B. The influence of phytoestrogens and estradiol-17.β. on growth and sex determination in the European eel (*Anguilla anguilla*). **Aquaculture Research**, v. 35, n. 13, p. 1213-1219, 2004.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO. **Tratamento de água**. Disponível em: <http://www.uenf.br/uenf/centros/cct/qambiental/ag_tratagua.html>. Acesso em: 21 maio 2010.

VALENTE, L. P. V.; AUGUSTO, F.; RIEDO, C. R. F. **Análise quantitativa por cromatografia**. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/wp-content/themes/chemkeysbr/articleI.php?u=YW5hbGlzZS1xdWFudGI0YXRpdmEtcG9yLWNyY21hdG9ncmFmaWE>>. Acesso em: 13 abr. 2010.

VANDER; A. J.; SHERMAN, J. H.; LUCIANO, D. S. **Human physiology: the mechanisms of body function**. New York: McgGraw-Hill, 1994. p. 274-276.

WILSON, J. D.; FOSTER, D. W. **Williams textbook of endocrinology**. Philadelphia: Saunders, 1998. p. 4.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Programme on Chemical Safety. **Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors**. 2002. Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/>. Acesso em 12 abr. 2010.

ZHANG, Y.; HENDRICH, S.; MURPHY, P. A. Glucuronides are the main isoflavone metabolites in women human nutrition and metabolism. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 2, p. 399-404, 2003.

ZOCOLO, G. J.; MARCHI, M. R. R. Comparação de HPLC/UV e LC/MS/MS na análise de fitoestrógenos da soja. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32., 2009, Fortaleza. **Resumos...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2009. 1 CD-ROM. Disponível em <<http://sec.sbq.org.br/cdrom/32ra/resumos/T1915-1.pdf>>. Acesso em: 30 jun. 2010.