

EDUARDO GARBULHO CANAVER

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA
DETERMINAÇÃO DE 17 β -ESTRADIOL, ESTRONA E ESTRIOL EM SOLO
TRATADO COM ESTERCO ANIMAL E LODO DE ETE

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

JANEIRO/2012

FICHA CATALOGRÁFICA

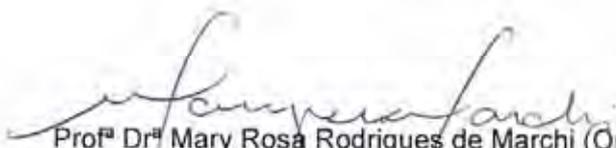
| | |
|-------|---|
| C213o | <p>Canaver, Eduardo Garbulho</p> <p>Otimização e validação de método cromatográfico para determinação de 17β-estradiol, estrona e estriol em solo tratado com esterco animal e lodo de ETE / Eduardo Garbulho Canaver. - Araraquara : [s.n], 2012</p> <p>82 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química</p> <p>Orientador: Mary Rosa Rodrigues de Marchi</p> <p>1. Química analítica. 2. Estrógenos. 3. Solos. 4. HPLC. 5. Alteradores endócrinos I. Título.</p> |
|-------|---|

EDUARDO GARBULHO CANAVER

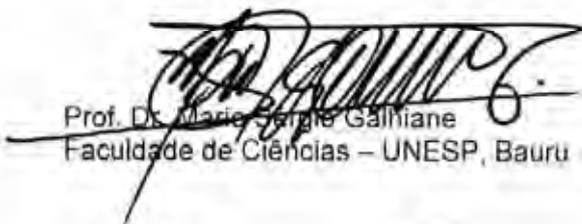
Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química.

Araraquara, 13 de janeiro de 2012.

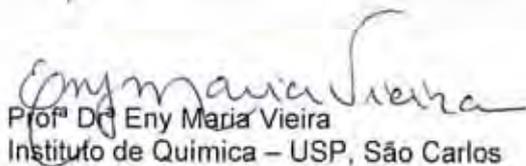
BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Dr. Maria Tereza Galhiane
Faculdade de Ciências – UNESP, Bauru



Prof.ª Dr.ª Eny Maria Vieira
Instituto de Química – USP, São Carlos

Dados Curriculares

Dados Pessoais:

Nome: Eduardo Garbulho Canaver

Nome em citações bibliográficas: CANAVER, E.G.

E-mail: ecanaver@yahoo.com.br

Formação Acadêmica/Titulação:

2009 - 2011 Mestrando em Química Analítica.

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

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

2009 - 2011 Graduando em Química – Bacharelado em Química Tecnológica.

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

2005 - 2008 Graduação em Química – Bacharelado Universidade Estadual
Paulista Julio de Mesquita Filho – Instituto de Química - UNESP Campus
Araraquara – SP.

Trabalhos Publicados em anais de Congressos

BARRETO, S. R. G, CANAVER, E. G.

"Disponibilidade de Fe e Mn nos solos e sedimentos da represa de Capivara,
PR". In: XLIV Congresso Brasileiro de Química-CBQ, 2004.

"Disponibilidade de Fe e Mn nos solos e sedimentos da represa de Capivara,
PR". , 2004. v. QA322. p. 322 - 322.

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para esse trabalho, mesmo que apenas por pequenos gestos, palavras de apoio, torcendo para que esse momento chegasse.

A todo pessoal do grupo de pesquisas, em especial ao Guilherme Zocolo, Flávio (adorei!), a amiga incentivadora Nathalie, a minha irmãzinha mais nova Débora, aos grandes amigos Douglas, Dayana, Lilian e Paulo pela amizade, ensinamentos, atenção e apoio. Também aos amigos Seiti, Pedro, Tanabi, William, Pipoca, Dona Marilei, Mariana, Moleza, Gisele, Kellrye, Gildo, Ovídio, Stephane, Zé, Cláudias, Lucy, Léo, Sarinha, Daniela e Denise, que foram muito importantes para meu crescimento como pesquisador e como pessoa. Obrigado!

A professora Mary Rosa por todos os ensinamentos, pelos conselhos e amizade nesses anos.

Ao professor Luis Vitor, disponibilizando seus equipamentos para as análises. Aos professores que compuseram a banca, prof^o Mário Galhiani e prof^a Eny Vieira, pelas sugestões e pela simpatia. Ao grande amigo Beto, professor de Química da UNESP de Bauru-SP.

A todo o pessoal que trabalha na graduação e pós-graduação. Ao pessoal da Biblioteca. Aos funcionários do instituto, em especial aos amigos Gaspar, Kelton, Ricardo e Jair.

A meus tios Tata, Nézio, Nil e ao vô Antonio, pessoas especiais, a prima Nati e ao vô Vitório (*in memoriam*), esse grande homem de sabedoria que infelizmente não pode presenciar a conclusão desse trabalho. Ao Cláudio, que praticamente já é da família. A Elaine que adoro muito. A minha mamãe Norma, que tanto amo!

A todos os professores do instituto de química. A minha querida professora de espanhol Rosita.

Aos meus grandes amigos Pica-Pau, Gú, Diogo, Madrugão, Rafa, Mitinho, Yuri, Lester, Leonardo, Porcão, Boi, Fer&Fer, Carlão, Bisonho, Déia, Ruivo, Cabral, Tai, Sidarta, Fabricião, Liana e ao Zé Antonio pela companhia e pelas risadas.

RESUMO

A crescente preocupação com o possível impacto ambiental provocado por micropoluentes orgânicos com o potencial de causar efeitos adversos à saúde em humanos e animais selvagens tem levado a comunidade científica a pesquisar e desenvolver métodos analíticos na determinação destas substâncias, em especial alteradores endócrinos presentes em matrizes ambientais, tais como águas superficiais e subterrâneas e efluentes de ETEs. Porém, poucos estudos em solo têm sido feitos. No presente trabalho, pretende-se otimizar e validar método para determinação de estrógenos em solos tratados com esterco bovino e lodo de ETE, utilizando-se a extração sólido-líquido por banho de ultrassom seguido de extração em fase sólida (SPE) e a dispersão de matriz em fase sólida (MSPD), no intuito de avaliar os principais fatores que influenciam esse processo e identificar as melhores condições de recuperação. Os parâmetros mais utilizados no processo de validação analítica incluem os limites de detecção e quantificação, seletividade, linearidade ou faixa de trabalho, precisão e exatidão. Foram analisadas matrizes de solo da cidade de Araraquara-SP e lodo biológico proveniente da Estação de Tratamento de Esgoto de Jaú-SP, fortificadas com hormônios 17 β -estradiol (E2), estrona (E1) e estriol (E3), sendo a determinação analítica feita por HPLC/UV/Fluorescência. O método foi validado de acordo com os seguintes parâmetros: faixa de trabalho, obtida a partir de curvas analíticas entre (0,8 a 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para (E1) e (E3) e 32,0 a 400,0(ng mL^{-1}) para o (E2); seletividade (ausência de interferentes nas amostras); exatidão (recuperação: 46-94%); precisão (CV: 1-15%); e limites de quantificação (0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ para (E2) e 2,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ para (E1) e (E3)) para os estrógenos estudados. O método proposto permitiu análise simultânea dos estrógenos em um tempo relativamente curto quando comparado aos descritos na literatura, viabilizando sua aplicação em estudos que envolvam essas matrizes sólidas.

Palavras-Chave: 17 β -estradiol (E2). Estrona (E1). Estriol (E3). Alteradores endócrinos. HPLC/UV/Fluorescência.

ABSTRACT

The growing concern about possible environmental impacts caused by organic micropollutants with the potential to cause adverse health effects in humans and wildlife has led the scientific community to research and develop analytical methods in determining these substances, especially endocrine disruptors present in environmental matrices such as surface and groundwaters and effluent from sewage treatment plants. However, few studies have been done in soil. In this paper, we intend to optimize and validate the method for determination of estrogens in soils treated with manure and sludge STS, using the solid-liquid extraction ultrasonic bath extraction followed by solid phase extraction (SPE) and the matrix solid phase dispersion (MSPD), in order to evaluate the main factors influencing this process and better recovery. The parameters commonly used in the validation process include the analytical limits of detection and quantification, selectivity, linearity and working range, precision and accuracy. Matrices of soil were analyzed from the city of Araraquara-SP and biological sludge from the Sewage Treatment Station Jau-SP, fortified with hormones 17 β -estradiol (E2), estrone (E1) and estriol (E3), and analytical determination made HPLC/UV/Fluorescence. The method was validated according to the following parameters: working range, obtained from analytical curves between (0,8 and 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for (E1) and (E3), and 32,0 and 400,0 (ng mL $^{-1}$) to (E2), selectivity (no interferences in the samples); accuracy (recovery: 46-94%), precision (CV: 1-15%) and limits of quantification (0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ for (E2) and 2,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ for (E1) and (E3)) for the estrogens studied. The proposed method allows simultaneous analysis of estrogens in a relatively short time compared to the literature, allowing its application in studies involving these solid matrices.

Keywords: 17 β -estradiol (E2). Estrone (E1). Estriol (E3). Endocrine disruptors. HPLC/UV/fluorescence.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 1- | Sistema endócrino humano | 19 |
| Figura 2- | Estruturas e rotas metabólicas dos estrógenos 17 β -estradiol, estrona e estriol | 20 |
| Figura 3- | Principal via de entrada dos estrógenos no ambiente. | 24 |
| Figura 4- | Curva TG/DTG/DTA da amostra de lodo de esgoto Estação de Tratamento de Esgoto de Jaú-SP. | 43 |
| Figura 5- | Procedimento para extração de estrógenos de solo e solo com esterco, utilizando banho de ultrassom seguido de extração em fase sólida (SPE) | 45 |
| Figura 6- | Fluxograma do método utilizado para extração dos estrógenos em solo e solo com esterco por SPE. | 46 |
| Figura 7- | Procedimento para extração de estrógenos de solo e solo com esterco de ETE, utilizando dispersão em fase sólida (MSPD). | 48 |
| Figura 8- | Cromatograma (HPLC/FLU) do solvente acetonitrila ilustrando a presença do pico interferente ($t_r=9,00\text{min.}$) nas condições otimizadas da Tabela 5. | 49 |
| Figura 9- | Cromatograma no sistema HPLC/UV (preto) do padrão nas concentrações $5\mu\text{g mL}^{-1}$ para o estriol ($t_r=9,00\text{min.}$) e no sistema HPLC/FLU (vermelho) 150ng mL^{-1} para o estradiol ($t_r=13,10\text{min.}$) e $2,0\mu\text{g mL}^{-1}$ para a estrona ($t_r=15,00\text{min.}$). | 50 |
| Figura 10- | Linearidade obtida no sistema LC-920 para os estrógenos estrona (E1), estriol (E3) e estradiol (E2) em estudo. | 52 |
| Figura 11- | Curvas analíticas obtidas no sistema LC-920 para os estrógenos estrona (E1), estriol (E3) e estradiol (E2) em estudo. | 53 |

- Figura 12- Seletividade do método do banho de ultrassom seguido de extração em fase sólida (SPE) em solo. Comparação das testemunhas no sistema UV (Figura 12a) e FLU (Figura 12b) com extrações na concentração $5\mu\text{g g}^{-1}$ para E3 no sistema UV 200nm (Figura 12c), $5\mu\text{g g}^{-1}$ para E1 e 200ng g^{-1} para E2 no sistema FLU 230nm excitação, 306nm emissão (figura 12d), com padrões nas mesmas concentrações no UV e FLU (Figuras 12e e 12f respectivamente). 59
- Figura 13- Seletividade do método do banho de ultrassom seguido de extração em fase sólida (SPE) em solo com esterco. Comparação das testemunhas no sistema UV (Figura 13a) e FLU (Figura 13b) com extrações na concentração $5\mu\text{g g}^{-1}$ para E3 no sistema UV 200nm (Figura 13c), $5\mu\text{g g}^{-1}$ para E1 e 200ng g^{-1} para E2 no sistema FLU 230nm excitação, 306nm emissão (figura 13d), com padrões nas mesmas concentrações no UV e FLU (Figuras 13e e 13f respectivamente). 60
- Figura 14- Seletividade da MSPD em solo para os estrógenos em estudo. Comparação das extrações nas concentrações $5\mu\text{g g}^{-1}$ para E3 no sistema UV 200nm (Figura 14a), $5\mu\text{g g}^{-1}$ para E1 e 200ng g^{-1} para E2 no sistema FLU 230nm excitação, 306nm emissão (figura 14b) com testemunhas no sistema UV (Figura 14c) e FLU (Figura 14d). 62
- Figura 15- Seletividade da MSPD em solo com esterco para os estrógenos em estudo. Comparação das extrações nas concentrações $5\mu\text{g g}^{-1}$ para E3 no sistema UV 200nm (Figura 15a), $5\mu\text{g g}^{-1}$ para E1 e 200ng g^{-1} para E2 no sistema FLU 230nm excitação, 306nm emissão (figura 15b) com testemunhas no sistema UV (Figura 15c) e FLU (Figura 15d). 63
- Figura 16- Curvas analíticas na matriz solo (em rosa) e no solvente ACN (em preto) para os estrógenos em estudo. 65
- Figura 17- Curvas analíticas na matriz solo com esterco (em rosa) e no solvente ACN (em preto) para os estrógenos em estudo. 66
- Figura 18- Comparação entre cromatogramas da MSPD para a amostra testemunha solo com lodo no sistema HPLC/UV em 200nm sem (figura 18a) e com (figura 18b) a adição de 1g de sílica. 69

- Figura 19- Comparação entre cromatogramas da MSPD para a amostra testemunha solo com lodo no sistema HPLC/Fluorescência em excitação 230nm emissão 306nm sem (figura 19a) e com (figura 19b) a adição de 1g de sílica. 70
- Figura 20- Seletividade da MSPD em solo com lodo para os estrógenos em estudo. Comparação entre cromatogramas da amostra testemunha (Figura 20a) com extrações na concentração $5\mu\text{g g}^{-1}$ para E3 no sistema UV 200nm (Figura 20b). 71
- Figura 21- Seletividade da MSPD em solo com lodo para os estrógenos em estudo. Comparação entre cromatogramas da amostra testemunha (Figura 21a) com extrações na concentração $5\mu\text{g g}^{-1}$ para E1 e 200ng g^{-1} para E2 (Figura 21b) no sistema FLU 230nm excitação, 306nm emissão. 71
- Figura 22- Curvas analíticas na matriz solo com lodo (em vermelho) e no solvente (em preto) para os estrógenos em estudo. 73

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 1- | Substâncias químicas classificadas como alteradores endócrinos, com destaque para os estrógenos naturais. | 23 |
| Tabela 2- | Propriedades físico-químicas dos principais estrógenos naturais e sintéticos. | 29 |
| Tabela 3- | Alguns métodos utilizados para determinação de estrógenos em amostras sólidas. | 31 |
| Tabela 4- | Especificação dos solventes empregados no processo de condicionamento e eluição dos métodos de extração | 38 |
| Tabela 5- | Condições cromatográficas empregadas nas análises dos estrógenos | 40 |
| Tabela 6- | Limites de detecção para o sistema HPLC/FLU/UV, $V_{inj} = 20\mu\text{L}$ e nas condições cromatográficas otimizadas (Tabela 5) | 54 |
| Tabela 7- | Resultados do estudo preliminar de recuperação para determinação de E1, E2 e EE2 em solo enriquecido com solução padrão ($2,0\mu\text{g g}^{-1}$ para E1, $0,3\mu\text{g g}^{-1}$ para E2, $0,1\mu\text{g g}^{-1}$ para EE2). Em destaque a condição de melhor recuperação. | 56 |
| Tabela 8- | Recuperação e CV em três níveis de fortificação para a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), em solo enriquecido com solução padrão ($n=3$). | 57 |
| Tabela 9- | Recuperação e CV em três níveis de fortificação para a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), em solo com esterco enriquecido com solução padrão ($n =3$). | 57 |
| Tabela 10- | Equações das curvas analíticas dos estrógenos em acetonitrila, solo e solo com esterco com respectivos coeficientes de correlação (HPLC UV/FLU, Varian 920). | 64 |
| Tabela 11- | Limites de detecção para o método da dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) na extração solo e solo com esterco | 67 |
| Tabela 12- | Equações das curvas analíticas dos estrógenos em acetonitrila e na matriz solo com lodo com os respectivos coeficiente de correlação | 72 |
| Tabela 13- | Recuperação e CV para dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), em solo com lodo enriquecido com solução padrão ($n=3$). | 74 |

Tabela 14- Limites de detecção para o método da dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) na extração solo com lodo

75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN Acetonitrila.

AE Alterador Endócrino.

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Aging – interação entre a matriz e o analito.

Clean-up retirada de impurezas.

CV Coeficiente de Variação.

C₁₈ Sílica gel de fase reversa tipo octadecil silano.

DTG Termogravimetria derivada.

E1 Estrona.

E2 Estradiol.

EE2 Etinilestradiol.

E3 Estriol.

ETA Estação de tratamento de água.

ETE Estação de tratamento de esgoto.

FLU Fluorescência

GC Cromatografia Gasosa.

GPC Cromatografia de permeação em gel

HPLC/UV Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector ultra violeta.

HPLC/FLU Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Fluorescência.

INMETRO Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia.

MeOH Metanol.

P.a. Grau Analítico.

SPE Solid-phase extraction - Extração em fase sólida.

TG Termogravimetria.

M.O Matéria Orgânica.

PFHP Produtos de higiene pessoal

UV Ultravioleta

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1 | Hormônios Endócrinos | 18 |
| 1.2 | Estrógenos Naturais e Sintéticos | 19 |
| 1.3 | Os Alteradores Endócrinos | 21 |
| 1.4 | Mecanismo de ação e efeitos observados sobre o organismo | 25 |
| 1.5 | O uso de resíduos na agricultura | 26 |
| 1.5.1 | O manejo do esterco bovino | 26 |
| 1.5.2 | Lodos de esgoto: destino e problemas | 27 |
| 1.6 | Métodos analíticos para determinar estrógenos no ambiente | 30 |
| 1.7 | Validação de métodos analíticos | 33 |
| 2 | OBJETIVOS | 36 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 36 |
| 3.1 | Lavagem da Vidraria | 36 |
| 3.2 | Materiais e reagentes | 36 |
| 3.3 | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) | 38 |
| 3.4 | Preparação das soluções-estoque | 39 |
| 3.5 | Condições cromatográficas | 39 |
| 3.6 | Preparo das amostras de solo, esterco e lodo de esgoto. | 41 |
| 3.6.1 | Coleta das amostras de solo e esterco e preparo do solo e da mistura solo com esterco. | 41 |
| 3.6.2 | Coleta das amostras de lodo e preparo da mistura solo com lodo | 42 |
| 3.7 | Métodos analíticos para determinação de estrógenos nas matrizes solo, solo com esterco. | 44 |
| 3.7.1 | Método I – banho de ultrassom seguido de extração em fase sólida (SPE) | 44 |
| 3.7.2 | Método II - dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) | 47 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 49 |
| 4.1 | Linearidade da resposta do detector | 49 |
| 4.2 | Determinação dos limites de detecção (LD_e) e de quantificação (LQ_e) do equipamento | 53 |
| 4.3 | Avaliação do desempenho dos métodos de extração para determinação dos estrógenos em solo e solo com esterco. | 54 |
| 4.4 | Planejamento fatorial do método da dispersão de matriz em fase sólida para determinação de estrógenos. | 55 |
| 4.4.1 | Avaliação da precisão e exatidão do método da dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) na extração solo e solo com esterco. | 56 |
| 4.4.2 | Avaliação da Precisão e Exatidão do método do banho de ultrassom seguido de extração em fase sólida (SPE) na extração solo e solo com esterco. | 58 |
| 4.4.3 | Avaliação da seletividade e do efeito de matriz para a dispersão de matriz em fase sólida na extração solo e solo com esterco. | 61 |
| 4.4.4 | Determinação dos limites de detecção (LD_m) do método da dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) na extração solo e solo com esterco. | 66 |
| 4.5 | Aplicação do método proposto na extração solo com lodo de esgoto. | 68 |
| 4.5.1 | Avaliação preliminar da dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) na extração solo com lodo de esgoto. | 68 |
| 4.5.2 | Avaliação da seletividade e do efeito de matriz ao método da dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) na extração solo com lodo de esgoto. | 70 |
| 4.5.3 | Avaliação da Precisão e Exatidão do método da dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) na extração solo com lodo de esgoto. | 73 |
| 4.5.4 | Determinação dos limites de detecção (LD_m) do método da dispersão de matriz em fase sólida na extração para solo com lodo. | 74 |
| 5 | CONCLUSÃO | 75 |

| | | |
|----------|------------------------|-----------|
| 6 | ESTUDOS FUTUROS | 76 |
| | REFERÊNCIAS | 77 |

Apresentação e Justificativa do Estudo

O crescimento da população global resultou em um aumento significativo de resíduos gerados dispostos inadequadamente no meio ambiente, aumentando cada vez mais o número de áreas contaminadas, havendo assim a necessidade de criação de políticas públicas ambientais mais restritivas para o tratamento desses resíduos.

Porém, o foco desse tratamento ainda possui uma visão macro desses poluentes, centrada nas consequências que são visíveis, as quais muitas vezes não são as principais responsáveis por acarretar os maiores problemas ao ambiente.

Micropoluentes como os estrógenos são excretados por animais através da urina e fezes. A contaminação do solo através da aplicação do esterco bovino e lodo das estações de tratamento utilizados na agricultura podem ser uma das principais formas de contaminação do ambiente, uma vez que a contaminação do solo pode ocasionar graves consequências a biota aquática.

Torna-se então necessário o monitoramento das concentrações desses micropoluentes presentes no solo, para que não venham a ocasionar tais malefícios.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hormônios Endócrinos

Em quase todos os animais multicelulares complexos, existem dois principais sistemas de controle e coordenação dos processos bioquímicos:

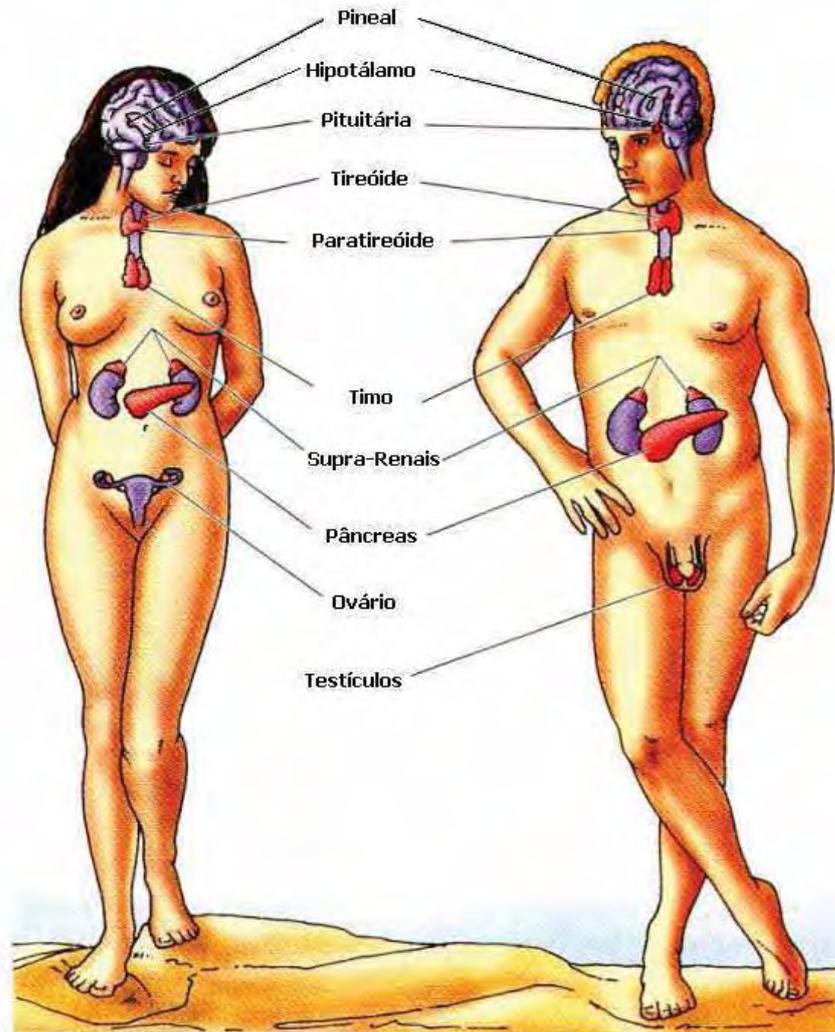
- o sistema nervoso, que exerce um controle de ponto a ponto rápido, transmitido via impulsos elétricos para determinados órgãos ou tecidos;
- o sistema endócrino, que é um sistema mais lento com base em mensageiros químicos podendo atingir todas as partes do corpo.

Ambos agem em conjunto para controlar todas as funções corporais e os processos.

Conforme a ECE (EUROPEAN COMMISSION ENVIRONMENT, 2011), o sistema endócrino “é uma complexa rede de glândulas, hormônios e receptores que fornece a chave de comunicação e elo de controle entre o sistema nervoso e as funções corporais, tais como reprodução, imunidade, metabolismo e comportamento”. Ele realiza suas funções por meio de hormônios, que são substâncias químicas secretadas por glândulas localizadas em todo o corpo. Sua função é transferir informações e instruções entre as células presentes em mamíferos, aves, peixes e outros organismos vivos. Esses mensageiros químicos são liberados na corrente sanguínea, onde estruturas em vários órgãos e tecidos os reconhecem através de receptores de hormônio que são estruturas protéicas especializadas. Quando não há tal receptor, o hormônio não faz efeito. Uma vez estando ligadas, uma série de reações bioquímicas ocorrem, levando a respostas biológicas específicas no indivíduo, regulando assim seu crescimento, desenvolvimento, controlando as funções de muitos tecidos, auxiliando as funções reprodutivas e outras.

O sistema endócrino (Figura 1) é constituído por um conjunto de glândulas localizadas no corpo, como a tireóide, as gônadas e as glândulas supra-renais, e pelos hormônios por elas sintetizados, tais como a tiroxina, os estrógenos e progestagênios, a testosterona e a adrenalina (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Figura 1- Sistema endócrino humano



Fonte: (FARABEE, 2001; apud SODRÉ et al. 2007).

1.2 Estrógenos Naturais e Sintéticos

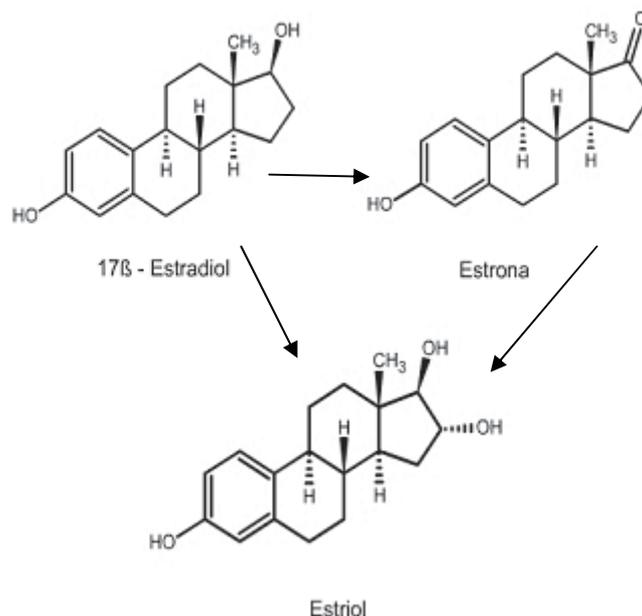
Os estrógenos naturais compõem um dos três grupos de hormônios esteróides sexuais, classificados como estrogênicos, androgênicos e progestênicos. Apresentam em comum 18 átomos de carbono derivados da molécula de colesterol (GABET et al. 2007) e exercem sua ação pela passagem através da membrana plasmática, ligando-se a receptores intracelulares (YING et al., 2002). São produzidos no organismo feminino principalmente pelos ovários sob o comando de hormônios proteínóides liberados pela pituitária na corrente sangüínea. No homem, embora em número muito menor, também há produção de alguns dos estrógenos

pelos testículos através da transformação metabólica da testosterona em estradiol, com auxílio da enzima aromatase, e posterior excreção para o meio ambiente.

Os estrógenos são responsáveis principalmente pelo desenvolvimento de características femininas no início da puberdade (indução da primeira fase do ciclo menstrual, desenvolvimento dos ductos mamários) e pelo aumento das glândulas mamárias durante a gravidez. Além dessas funções, também assumem importante papel na diferenciação sexual. Esse processo ocorre particularmente na camada gordurosa, ossos, sistema nervoso central e próstata.

Conforme apresentado na Figura 2, esses hormônios têm em comum uma estrutura constituída de três anéis hexagonais e um anel pentagonal.

Figura 2 - Estruturas e rotas metabólicas dos estrógenos 17 β -estradiol, estrona e estriol



Fonte: (REIS-FILHO, 2006).

Como principais causas de sua deficiência cita-se:

- Osteoporose: o estrógeno fixa o cálcio nos ossos. Devido à diminuição da produção desse hormônio a partir da menopausa, as mulheres têm uma perda anual de 2 a 4 % da massa óssea, e estão mais expostas a ter fraturas;

- Doenças vasculares: a diminuição de estrógenos produz um aumento do chamado mau colesterol (LDL) e uma diminuição do chamado bom colesterol, favorecendo incidência das doenças cardiovasculares após a menopausa;

- Depressão, fadiga, ondas de calor, suores noturnos, palpitações, cefaléias, irritabilidade e perda de libido.

Na medicina humana, os estrógenos naturais 17β -estradiol (E2) (principal estrógeno secretado pelo ovário), estriol (E3) e estrona (E1) e o sintético 17α -etinilestradiol (EE2) são indicados no tratamento da reposição hormonal, na terapia de substituição fisiológica em estados de deficiência hormonal, no tratamento de câncer de mama em mulheres pós-menopausa, no câncer de próstata e em métodos de contracepção (aplicação médica dessas substâncias ocorre desde 1960). No organismo, o catabolismo dos estrógenos ocorre no fígado, onde são conjugados a sulfatos, glicuronídeo ou sulfoglucuronide. Conforme Sandor e Mehdi (1979), “estas substituições aumentam sua solubilidade e facilitam a eliminação através da urina, no entanto, uma fração dos estrógenos é eliminada via fezes em suas formas não conjugada ou livre”.

1.3 Os Alteradores Endócrinos

De acordo com Fontenele et al. (2010), atualmente são conhecidas em todo mundo cerca de onze milhões de substâncias químicas, das quais três mil são produzidas em larga escala. Numerosos compostos químicos de uso industrial, agrícola e doméstico possuem comprovada atividade hormonal. Esses agentes, em sua grande maioria estando presentes nos efluentes industriais, residenciais e das estações de tratamento de água e esgoto, passam a representar uma fonte importante de contaminação ambiental.

O interesse da comunidade acadêmica, embora os primeiros efeitos relacionados a contaminação por alteradores endócrinos tenham sido observados na década de 40 em humanos expostos ao DDT (WARING; HARRIS, 2005; apud FERREIRA, 2008), ganhou força a partir da década de 70, culminando com o aumento no número de pesquisas envolvendo monitoramento dos compostos definidos como xenobióticos, em diversos compartimentos ambientais. Observa-se

atualmente que organizações governamentais e não-governamentais têm debatido em grande escala esses problemas, estabelecendo normas e condutas a serem seguidas e discutindo a importância das práticas de minimização e remediação de resíduos e substâncias químicas potencialmente poluentes (RAIMUNDO, 2007).

Inúmeras pesquisas evidenciaram que certas substâncias químicas poderiam alterar o sistema endócrino dos seres humanos e animais selvagens. Os estudos em laboratório confirmaram que sistemas endócrinos de certos peixes e animais selvagens tinham sido afetados por essas substâncias químicas, mesmo quando expostos a baixas concentrações (da ordem de ng L^{-1}), resultando em alterações de comportamento.

De acordo com Raimundo (2007), essa classe de substâncias não é definida pela sua natureza química, mas pelo seu efeito biológico e têm sido denominadas de alteradores endócrinos.

Um alterador endócrino pode ser produto de higiene pessoal (PFHP), pesticidas, alquilfenóis, hormônios naturais estrógenos dentre outros como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Substâncias químicas classificadas como alteradores endócrinos, com destaque para os estrógenos naturais.

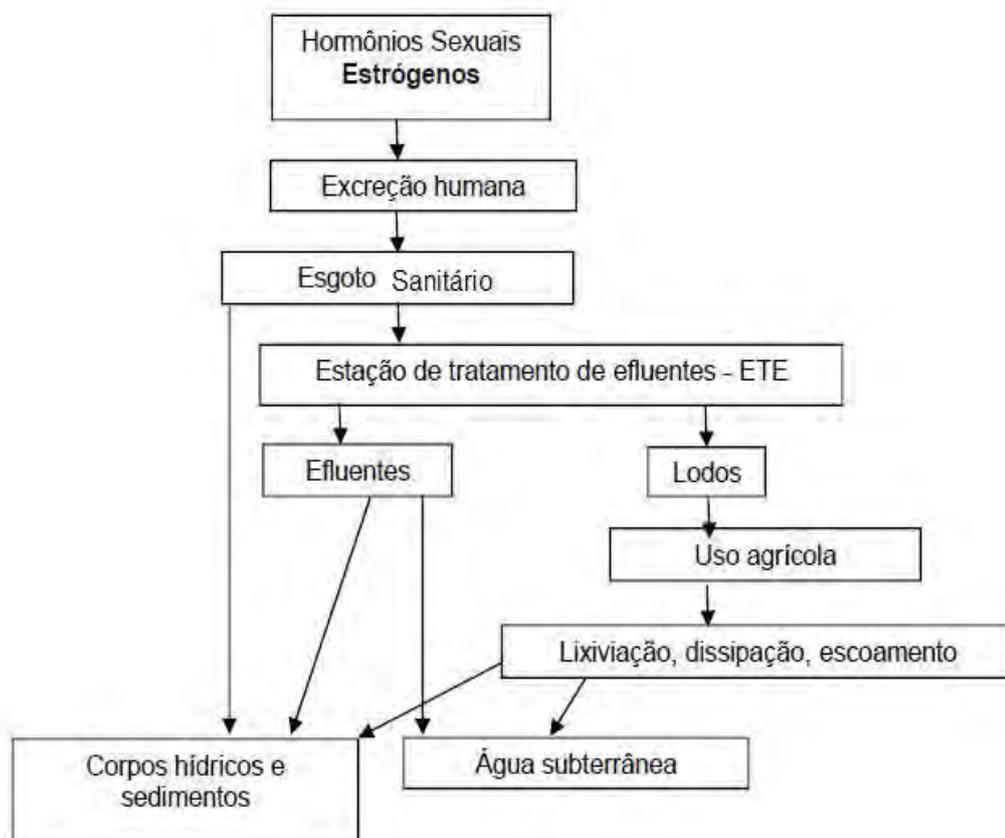
| Ftalatos | | Pesticidas | | | |
|--|--|--|---|---|--|
| Dimetil ftalato (DMP) | | <i>Inseticidas:</i> DDT (2,2 bis-p-clorofenil-1,1,1-tricloroetano) DDE (2,2 bis-p-clorofenil-1,1-dicloroetileno) Deltametrin Carbofurano | <i>Fungicidas:</i> Vinclozolina Carbendazime Penconazol Procloraz Propiconazol Epoxiconazol Procimidona Tridemorfos | | |
| dietil ftalato (DEP) | | | | | |
| di-iso-butil ftalato (DIBP) | | | | | |
| di-n-butil ftalato (DBP) | | | | | |
| butilbenzil ftalato (BBP) | | | | | |
| dodiclohexilo ftalato (DCHP) | | | | | |
| di-(2-etil-exil) ftalato (DEHP) | | | | | |
| di-n-octil ftalato (DOP) | | | | | |
| di-isoocetil ftalato (DIOP) | | | | | |
| di-iso-nonil ftalato (DINP) | | | | | |
| di-iso-decil ftalato (DIDP) | | <i>Herbicidas:</i> Atrazina Limuron | | | |
| Alquilfenóis | | | | <i>Pesticidas organoclorados:</i> | |
| Nonilfenol | | | | Lindane (1,2,3,4,5,6-hexacloroetano) | |
| Nonilfenol etoxilado | | | | Compostos orgânicos de estanho | |
| Octilfenol | | | | Tributilestanho (TBT) e trifenilestanho (TPT) | |
| Octilfenoletoxilado | | | | | |
| Organoclorados | | | | Policlorados de bifenilas | |
| Dibenzo-p-dioxina | | | | 2,4,4'-triclorobifenil | |
| TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina) | | | | 2,2',5,5'-tetraclorobifenil | |
| TCDF (2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano) | | | | 2,2',4,5,5'-pentaclorobifenil | |
| Bisfenol | | 2,3',4,4',5-pentaclorobifenil | | | |
| Bisfenol A | | 2,2',3,4,4',5'-hexaclorobifenil | | | |
| Parabenos | | 2,2',4,4',5,5'-hexaclorobifenil | | | |
| Benzilparabeno | | 2,2',3,4,4',5,5'-heptaclorobifenil | | | |
| Isobutilparabeno | | Retardante de chama bromado | | | |
| Butilparabeno | | Polibromobifenila (PBB) | | | |
| n-propilparabeno | | 2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter (BDE 47) | | | |
| etilparabeno | | 2,2',4,4',5-pentabromodifenil éter (BDE 99) | | | |
| metilparabeno | | 2,2',4,4',6-pentabromodifenil éter (BDE 100) | | | |
| Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos | | 2,2',4,4',5,5'-hexabromodifenil éter (BDE 153) | | | |
| Naftalina | | 2,2',4,4',5,6'-hexabromodifenil éter (BDE 154) | | | |
| Acenaftileno | | 2,2',3,4,4',5',6-heptabromodifenil éter | | | |
| Acenafteno | | Octabromodifenil éter (BDE octa) | | | |
| Fluoreno | | Decabromodifenil éter (BDE 209) | | | |
| Fenantreno | | Hexabromociclododecano (HBCD) | | | |
| Antraceno | | Tetrabromobisfenol A (TBBA) | | | |
| Fluoranteno | | Fitoestrogênicos | | | |
| Pireno | | <i>Isoflavona:</i> daidzeina e genisteina. | | | |
| | | <i>Liganas:</i> metaresinol, enterodiol, enterolactona | | | |
| | | Estrógenos naturais | | | |
| | | Estrona (E ₁) | | | |
| | | 17β-estradiol (E ₂) | | | |
| | | Estríol (E ₃) | | | |

Fonte: Bila, (2005).

Os estrógenos, ao serem eliminados acabam invariavelmente em afluentes e efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs), lodo biológico das ETE, em

sedimentos marinhos, solos e nas águas superficiais, subterrâneas e potáveis, e devido à ineficiência de sua remoção do ambiente, podem ser reincorporadas como agentes exógenos, como se observa na Figura 3, produzindo respostas biológicas qualitativamente similares àsquelas produzidas pelos hormônios naturais endógenos (DASTON et al., 1997).

Figura 3 - Principal via de entrada dos estrógenos no ambiente.



Fonte: Reis-Filho et al. (2006).

Existem muitas nomenclaturas utilizadas para denominar os alteradores endócrinos. Segundo a ECE (EUROPEAN COMMISSION ENVIRONMENT, 2011), alteradores endócrinos “são substâncias exógenas ou misturas delas, que alteram as funções do sistema endócrino e que conseqüentemente causam efeitos adversos num organismo intacto, ou em sub-populações e em seus descendentes”.

Já para a EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY), um alterador endócrino é definido como “um agente exógeno que interfere com a síntese,

secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônio natural no corpo que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos”.

Há que ressaltar que algumas dessas substâncias ainda não foram incluídas em legislações ambientais, embora vários trabalhos tenham relatado seus efeitos em seres vivos.

1.4 Mecanismo de ação e efeitos observados sobre o organismo

Conforme a ECE (EUROPEAN COMMISSION ENVIRONMENT, 2011), os alteradores endócrinos podem exercer seus efeitos através de diferentes mecanismos:

- Imitando a atividade biológica de um hormônio, ligando-se a um receptor celular, levando a uma resposta injustificada e iniciando a resposta normal da célula para o hormônio que ocorre naturalmente na hora errada ou a uma extensão excessiva (efeito agonístico).

- Se ligando ao receptor, mas não o ativando. A presença da substância química no receptor irá impedir a ligação do hormônio natural (efeito antagonista).

- Se ligando às proteínas de transporte no sangue, alterando assim as quantidades de hormônios naturais que estão presentes na circulação.

- Interferindo com os processos metabólicos no organismo, afetando a síntese ou as taxas de degradação dos hormônios naturais.

Os efeitos desencadeados pelos alteradores endócrinos dispostos no ambiente atingem desde microinvertebrados até grandes vertebrados.

Alguns efeitos, tais como a diminuição na eclosão de ovos de pássaros, peixes e tartarugas; feminização de peixes machos; problemas no sistema reprodutivo em peixes, répteis, pássaros, mamíferos e alterações no sistema imunológico de mamíferos marinhos, têm sido associados à exposição de espécies de animais aos alteradores endócrinos (BILA; DEZOTTI, 2007). Na literatura, estudos relataram desde algumas anomalias no comportamento reprodutivo de jacarés contaminados com DDT (GUILLETTE et al., 1996), até colapsos das

populações de peixes existentes em lagos experimentais no Canadá (PELLEY, 2003; apud REIS-FILHO, 2006).

No homem estão relacionadas doenças como ovários policísticos, redução da fertilidade masculina (queda sensível na quantidade e mobilidade dos espermatozoides) e o câncer de mama, testicular e de próstata. Ghiselli e Jardim (2007), também relataram efeitos como: deformidades dos órgãos reprodutivos, disfunção da tireóide e alterações relacionadas com o sistema neurológico.

A fase da vida em que ocorre a exposição a estas substâncias (sozinhas ou em combinação a outras substâncias alteradoras do sistema endócrino) 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 em qual período do desenvolvimento essa exposição ocorre (KAVLOCK et al., 1996).

1.5 O uso de resíduos na agricultura

1.5.1 O manejo do esterco bovino

A criação de animais representa uma importante fonte de esteróides no ambiente. O intenso mercado de produção animal, particularmente nos últimos 30 anos, tem resultado em problemas na qualidade da água e do solo associadas ao aumento dos resíduos gerados por esse tipo de produção. Estrógenos são naturalmente produzidos e excretados por animais como também administrados como promotores de crescimento (CASEY et al., 2003). Cerca de 80 toneladas de estrógenos são produzidos anualmente pelo gado na União Européia e EUA (LANGE et al. 2002).

A contaminação do solo por estrógenos ocorre principalmente através da utilização do esterco na agricultura em substituição aos fertilizantes químicos (EMMERIK et al., 2003). A agricultura orgânica (nome dado à prática que se baseia na reutilização do lodo de esgoto e esterco) tem crescido, pois se acredita que a utilização de recursos naturais em substituição aos fertilizantes químicos reduziria o impacto ambiental ao solo e os riscos à população, devido ao manejo orgânico considerado agroecológico. Porém, são ainda muito restritos os estudos sobre o impacto ambiental desses resíduos usados como aditivos agrícolas e, devido a essa

utilização agrícola ser ainda recente, eles se concentram principalmente na investigação do impacto causado por metais potencialmente tóxicos e organismos patogênicos presentes nesses resíduos (FERREIRA, 2008).

O esterco animal aplicado no solo tem afetado a qualidade das águas superficiais e de subsolo. Em ruminantes, estrógenos são excretados principalmente via fezes (50-70% em bovinos) enquanto que em suínos e aves são excretados principalmente na urina (90-96% e 69%, respectivamente).

As concentrações dos estrógenos observados em unidades de armazenagem de resíduos sólidos variam muito, desde muito altas (podendo chegar a 2.104mg kg^{-1} (peso seco) até valores abaixo do limite de detecção, (resultantes como, por exemplo, de diferenças no tipo de gado, tamanho da fazenda, idade relativa dos resíduos e a época de amostragem envolvida), o que não inviabiliza a preocupação com o comportamento desses micropoluentes nessa matriz (RAMAN et al.,2004; apud COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET, 2010).

1.5.2 Lodos de esgoto: destino e problemas

No sistema de tratamento de resíduos sanitários, o processo biológico consiste na remoção da matéria orgânica biodegradável presente no esgoto. Existem basicamente três formas para esse tratamento. A lagoa de aeração, a lagoa de lodo e o tratamento por membrana, ainda inexistente no Brasil.

O lodo de esgoto produzido (parte sólida do esgoto rico em matéria orgânica) tem sua disposição final por meio de alguns processos como: incineração (exclusiva ou co-incineração com resíduos sólidos urbanos); disposição em aterro sanitário (aterro exclusivo e co-disposição com resíduos sólidos urbanos); conversão em óleo combustível; reuso industrial (produção de agregado leve, fabricação de tijolos, cerâmica e produção de cimento); recuperação dos solos (recuperação de áreas degradadas e de mineralização); “landfarming” e uso agrícola e florestal (aplicação direta no solo, compostagem, fertilizante e solo sintético) (BETTIOL; CAMARGO, 2005). No Brasil, embora normalmente ainda seja destinada aos aterros sanitários, a preferência é pela disposição na agricultura, pois como vantagem dispensa a adição de nitrogênio no solo, reduz o uso de fósforo e ainda aumenta o rendimento da produção.

Por outro lado, o lodo apresenta características extremamente variáveis, dependendo de sua origem, época do ano e processo de tratamento. Um lodo típico apresenta cerca de 40% de matéria orgânica, 4% de nitrogênio, 2% de fósforo, os demais macro e micro nutrientes (zinco, cobre, ferro, manganês e molibdênio), além de elementos potencialmente tóxicos como metais pesados (tais como cádmio, cobre, zinco, níquel, cromo e chumbo) (BETTIOL; CAMARGO, 2005).

A legislação brasileira se atenta somente para a concentração de patógenos e metais nocivos. Não existem normas que regulamentem a presença de produtos farmacêuticos, hormônios esteróides sexuais, produtos de cuidado pessoal e outros alteradores que apresentem tendência de acumular no lodo de esgoto, até porque se trata de uma matriz extremamente complexa.

A presença de estrógenos na fração sólida do esgoto (lodo) tem recebido pouca atenção em comparação à dada a análise hormonal em efluentes líquidos. Kuster et al. (2004) relataram as dificuldades de se analisar estes compostos em matrizes sólidas. Portanto, há a necessidade de se identificar e avaliar também o impacto dos micropoluentes orgânicos no meio ambiente. O que se sabe é que os alteradores endócrinos excretados, (em sua maioria na forma conjugada nas estações de tratamento de esgoto), apresentam baixa atividade estrogênica em comparação com as formas livres (não conjugadas). Entretanto, essas substâncias conjugadas são desconjugadas pelos microorganismos presentes nessas estações, produzindo formas não ligadas e com poder estrogênico novamente ativo (DRAY et al. 1972). Estudos relataram concentrações surpreendentemente altas de E1 (5-20mg kg⁻¹) e E3 (272-406mg kg⁻¹) em peso seco e sulfato conjugado com as formas de E2 e E1 (0,64-7mg kg⁻¹) em peso seco detectados nos lodos de duas ETEs na Espanha (NIETO et al. 2008).

O destino dos estrógenos no ambiente depende muito de suas características físicas e químicas, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas dos principais estrógenos naturais.

| Estrógeno | pKa | Kow | Koc | ½ vida no solo (dias) |
|------------------|------------|-------------------------|------------|------------------------------|
| E1 | 10,40 | $7,4131 \times 10^{-4}$ | 4882 | 2 – 3 |
| E2 | 10,23 | $9,7724 \times 10^{-4}$ | 3300 | 0,92 |
| E3 | 10,40 | $3,5481 \times 10^{-3}$ | 1944 | 1 – 2 |

Kow: coeficiente de partição octanol/água; Koc: constante de sorção em matéria orgânica.

Fonte: Ra et al. (2008) e Beck et al. (2007).

Os estrógenos apresentam caráter hidrofóbico, moderadamente solúveis em água e que preferencialmente adsorvem em sedimentos/partículas sólidas. Portanto, é de se esperar que a adsorção no solo, sedimento ou lodo biológico seja um significativo fator da redução da concentração dessas substâncias nos recursos hídricos (LAI et al., 2000; URASE; KIKUTA, 2005; apud FERREIRA, 2008).

Contudo, não é descartada a possibilidade de que as águas subterrâneas, fonte de águas potáveis, possam ser contaminadas pela infiltração de substâncias químicas através do solo. As águas subterrâneas normalmente recebem menos tratamentos na ETA, geralmente restrita apenas à cloração para a desinfecção de microorganismos patogênicos. Conseqüentemente, há um grande risco de que os estrógenos possam estar presentes nessas águas.

A presença de estrógenos naturais e sintéticos nas estações de tratamento de esgoto demonstra que é necessária uma avaliação dos processos de tratamento envolvidos com respeito à eficiência de remoção dessas substâncias. Processos tecnológicos como oxidação por ozônio, sorção em carbono ativado e osmose reversa são algumas das técnicas mais promissoras para a remoção de estrógenos, entretanto são pouco aplicadas, devido ao alto custo.

A disposição final adequada é uma etapa problemática no processo operacional de uma estação de tratamento de esgoto. Portanto, é de extrema necessidade uma segura destinação final desses resíduos em termos de saúde pública e ambientalmente aceitável.

A quantidade necessária, bem como o comportamento dessas substâncias químicas, para que apresentem perigo para os animais ainda são desconhecidas. Torna-se necessário monitorar esses contaminantes e seus produtos de degradação no solo, a fim de avaliar seu possível impacto no meio ambiente, principalmente nas águas superficiais e subterrâneas. Portanto, esta pesquisa pretende iniciar esse estudo, para análise dos estrógenos de interesse em solo tratado com e sem esterco bovino e lodo de ETE.

1.6 Métodos analíticos para determinar estrógenos no ambiente

Os níveis de contaminação na ordem de ng L^{-1} e a alta complexidade das matrizes ambientais exigem o uso de métodos com alta detectabilidade e seletividade para a análise dos resíduos de estrógenos (WANG et al., 2008). Para tanto, uma amostra necessita de um pré-tratamento antes de sua análise cromatográfica, como por exemplo, a extração em fase sólida (SPE), muito utilizada em matrizes líquidas.

A Tabela 3 ilustra alguns métodos para análise de estrógenos e as concentrações encontradas para estrógenos em matrizes ambientais.

Tabela 3 - Alguns métodos utilizados para determinação de estrógenos em amostras sólidas.

| Referência | Matriz | Análitos | Tratamento da amostra | Técnica analítica | LD (ng g ⁻¹) | LQ (ng g ⁻¹) |
|----------------------------|----------------|------------|--|-------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| ZHANG et al., 2010. | Solo | E1, E2, E3 | 1) Extração por PLE 2) <i>Clean-up</i> com sílica | GC/MS | E1 0,06 E2 0,05 E3 0,19 | E1 0,21 E2 0,16 E3 0,64 |
| GOMES et al., 2004. | Lodo de esgoto | E1, E2, E3 | 1) Agitador rotativo com solventes 2) Centrifugação 3) <i>Clean-up</i> por GPC seguido SPE-C ₁₈ | LC/MS ou GC/MS | .. | .. |
| KJÆR et al., 2007. | Esterco | E1, E2 | 1) Extração com solventes por PLE 2) Ultrassom 3) SPE-C ₁₈ , 4) <i>Clean-up</i> com sílica-gel | GC/MS/MS | .. | .. |
| STANFORD & WEINBERG, 2007. | Solo | E1, E2, E3 | 1) Extração com solventes e ultrassom 2) Centrifugação 3) SPE - Stracta X. | GC/MS e GC/MS/MS | .. | .. |
| STEINER et al., 2010. | Solo | E1, E2 | 1) Extração com solventes 2) Ultrassom 3) SPE (OASIS) 4) <i>Clean-up</i> com sílica gel e GPC | GC/MS | .. | E1 0,1 E2 0,1 |
| XU et al., 2008. | Solo | E1 | 1) Extração com solventes e ultrassom 2) Centrifugação 3) SPE C ₁₈ | GC/MS | .. | E1 1,2 |
| BECK et al., 2007. | Solo | E1, E2, E3 | 1) Extração por PLE 2) SPE e <i>Clean-up</i> com C ₁₈ | GC/MS | 0,05*** | .. |
| WEBER et al., 2004. | Lodo de esgoto | E1, E2, E3 | 1) Filtração de 1mL da fração líquida em filtro de 0,2µm | HPLC-DAD/FLD | .. | E1 10000* E2 5000* E3 5000* |
| TSO et al., 2011. | Solo | E1, E2, E3 | 1) Extração Acelerada com solventes (ASE) 2) SPE (OASIS) 3) Centrifugação | LC/MS/MS | 0,01 a 0,10*** | 0,06 a 0,70*** |

E1 = estrona; E2 = 17-β estradiol, E3 = estriol ***não especificado o analito ** não mencionado *ng mL⁻¹

Fonte: Elaborado pelo autor.

Como se observa na Tabela 3, nas análises de matrizes sólidas geralmente são utilizados métodos de extração por solventes, seguido de banho de ultrassom. Porém, técnicas como a extração por líquido pressurizado (PLE) também têm sido utilizadas, mas todos esses métodos estabelecidos exigem extensos procedimentos de extração e limpeza, para remover compostos interferentes na matriz (ZHANG et al. 2010).

Essas matrizes, devido a sua complexidade, necessitam de etapas de *clean-up*. A grande maioria dos métodos analíticos usados nesse processo se baseia na extração em fase sólida (SPE, solid phase extraction), por ser um método adequado e com elevada seletividade. Conforme Collins e Silva (2011), a extração em fase sólida é atualmente a técnica mais empregada para amostras líquidas, como matrizes de águas superficiais e efluentes, tendo os cartuchos adsorvente Oasis HLB como o sorbente mais comumente utilizados. A escolha da fase estacionária (C₁₈) é largamente utilizada e se deve a natureza dessas substâncias, que apresenta como característica uma baixa polaridade, favorecendo a cromatografia em fase reversa. Em alguns estudos, sílica gel foi aplicada como uma segunda etapa no *clean-up*.

Não há um único trabalho citado na literatura que descreva o tratamento da amostra pelo método da dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) para análise estrógenos. Por se tratar de um método de simples execução e eficiente, vem sendo cada vez mais utilizado em uma variedade de matrizes, principalmente sólidas e semissólidas, como material biológico (tecidos) e alimentos. (COLLINS; SILVA, 2011). O método por MSPD consiste basicamente em introduzir a amostra em um recipiente contendo um suporte sólido (adsorvente), misturar até homogeneização, transferir o material (matriz e adsorvente) para a coluna e eluir com solvente apropriado. A coluna MSPD consiste, portanto, da matriz dispersa no adsorvente (DÓREA; LOPES, 2004).

Quanto ao emprego de equipamentos utilizados nas análises, a cromatografia a gás tem sido amplamente utilizada por oferecer maior capacidade de separação combinado com boa identificação em relação à cromatografia líquida (STRECK, 2009). Entretanto, a desvantagem do primeiro se deve a necessidade de uma etapa de derivação preliminar, dadas as características físicas e químicas dos estrógenos como a alta massa molecular e as baixas pressões de vapor, que tornam uma dificuldade a análise desses compostos diretamente por cromatografia gasosa e

acarretam muitas vezes eventuais baixos percentuais de recuperação nas análises. A cromatografia líquida é sempre realizada em fase reversa nesses casos. Como fases móveis em cromatografia líquida mais utilizadas estão acetonitrila:água e metanol:água.

Em relação a detectores, na grande maioria das publicações é utilizado o espectrômetro de massas (GC/MS e HPLC/MS), acoplado em alguns casos (tandem). O uso destes detectores consegue atingir limites de detecção da ordem de pg g^{-1} , melhores em relação a detectores como o UV, por exemplo, que apresenta valores na faixa de $\mu\text{g g}^{-1}$ a ng g^{-1} .

Vários trabalhos citados não especificam quais métodos estatísticos foram abordados na obtenção dos limites de quantificação e detecção, sendo que em alguns desses não chegam a descrever tais resultados. A maioria dos trabalhos também não menciona a avaliação do efeito de matriz, que comumente influenciam nos dados analíticos quantitativos da amostra (THOMPSON, ELLISON e WOOD 2002; apud TOLEDO NETTO, 2009), principalmente quando se utilizam detectores de massas (efeito batocrômico).

1.7 Validação de métodos analíticos

A etapa da validação é essencial para que se possa avaliar objetivamente o grau de confiabilidade dos resultados que serão obtidos na aplicação de métodos analíticos. Diferentes normas, por vários órgãos nacionais ou internacionais, estabelecem definições para o termo. Dentre algumas, as principais estão a seguir:

Validação analítica: “Validação é o conjunto de ações procedidas de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem a capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer.” (EURACHEM WORKING GROUP, 1998);

“A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.” (ANVISA, 2003);

“É a demonstração que um método de ensaio químico, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para obtenção de resultados com a qualidade exigida” (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL INMETRO, 2003).

Para se realizar a validação de um método analítico, diversos critérios discutidos na literatura devem ser obedecidos. Os principais critérios são definidos a seguir:

- Linearidade: é a capacidade de um método gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma faixa específica de concentrações. Está normalmente relacionada com a variação da inclinação da linha de regressão e é determinada através da curva analítica da substância (VIEIRA, 2004).

- Intervalo de trabalho: é a faixa que se estende do menor ao maior nível de concentração que possa ser determinado com precisão e exatidão usando a linearidade do método (BRITO et al., 2003).

- Seletividade: É a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies bem como outros compostos de propriedades similares que possam estar, porventura, presentes (RIBANI et al., 2004).

- Sensibilidade: é a capacidade de um método discriminar, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. A sensibilidade é definida como o coeficiente angular da curva analítica. No caso de uma reta, quanto maior o ângulo de inclinação da reta, mais sensível (LANÇAS, 2004).

- Limite de Quantificação (LQ): menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitável (BRITO et al., 2003).

- Limite de Detecção (LD): menor valor de concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado

procedimento experimental (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL INMETRO, 2003).

- Precisão: A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições definidas (RIBANI et al., 2004). Usualmente ela é expressa pelo coeficiente de variação (CV):

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

onde:

\bar{x} - média das determinações

s - desvio padrão absoluto calculado por

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

n - número de medições

x_i - valor individual de uma medição

- Recuperação: É o valor obtido em relação ao valor adicionado do analito de interesse. A quantificação do analito durante os estudos de recuperação pode ser realizada através do método do padrão externo ou do padrão interno (LANÇAS, 2004).

$$\text{Recuperação}(\%) = \frac{\text{Valor Obtido}}{\text{Valor Adicionado}} \times 100$$

Em geral, os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos estão entre 70 e 120%, com precisão < 20% (THIER; ZEUMER, 1987). Entretanto, dependendo da complexidade analítica e da amostra, o valor pode ser considerado aceitável entre 50 a 120%, com precisão < 20% (RIBANI et al., 2004).

Os parâmetros exatidão e precisão constituem a chave para o processo de validação. Para a análise quantitativa de elementos traços é necessário validar os limites de detecção e de quantificação (BRITO et al., 2003).

2 OBJETIVOS

Otimizar e validar método analítico para determinação de estrógenos em solo tratados com esterco e lodo de ETE, comparando-se a extração por banho de ultrassom seguido de extração em fase sólida (SPE) e a dispersão de matriz em fase sólida (MSPD).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Lavagem da Vidraria

Durante todo o desenvolvimento do trabalho a vidraria utilizada foi deixada imersa em solução de detergente alcalino Extran, MERCK, por um período de cerca de 10 horas, sendo enxaguado em água corrente exaustivamente e, em seguida, em água deionizada e por fim no solvente acetona, proveniente do Laboratório de Apoio Técnico do IQ/UNESP. A secagem da vidraria se deu em estufa à temperatura de 90°C, a exceção da vidraria volumétrica, seca em temperatura ambiente.

3.2 Materiais e reagentes

Neste trabalho foram utilizados os seguintes materiais e reagentes:

- Cartuchos para extração em fase sólida Sampliq C₁₈ Agilent Technologies (Octadecilsilano), em prolipropileno com 500mg de sorvente e capacidade de 6mL de reservatório;
- Manifold SPE de 19 pontos - Waters;
- Detergente alcalino Extran (MERCK);
- Água Deionizada obtida do sistema Milli-Q plus (MILLIPORE);
- Sílicagel C₁₈, 50m, 70-230 mesh, 60Å, PHENOMENEX;
- Ponteiras Eppendorf;
- HPLC modelo LC-920 VARIAN com detector de Fluorescência VARIAN;

- Conjunto de Filtração;
- Membrana Filtrante Esterelizada 0,45 μ , Φ 47 \pm 0,5mm – Schleicher & Schuell;
- Micropipetas 20-200mL/100 -1000mL, TEDIA/EPPENDORF;
- Ponteiras Eppendorf;
- Estrona pureza \geq 97,0% – Sigma Aldrich;
- Estriol pureza \geq 97,0% – Sigma Aldrich;
- 17- β -Estradiol pureza \geq 97,0% – Sigma Aldrich;
- Colunas Phenomenex C18 (250mm x 4,6 mm x 5 μ m);
- Lã de Vidro, fibra média, marca Isofar;
- Seringa de injeção de polietileno comum (encontradas em farmácias);
- Almofariz de Porcelana;
- Banho de Ultrassom - Thornton-40kHz;
- Balança Analítica, marca Tecnal, modelo Marck 500.

Os solventes empregados para o condicionamento e eluição das colunas em ambos os métodos são descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Especificação dos solventes empregados no processo de condicionamento e eluição dos métodos de extração

| <i>Solvente</i> | <i>Fórmula</i> | <i>Grau de pureza</i> | <i>Marca</i> |
|-----------------|-----------------------------------|-----------------------|--------------|
| Metanol | CH ₃ OH | HPLC | J.T. Baker |
| Acetona | CH ₃ COCH ₃ | HPLC | Mallinckrodt |
| Acetonitrila | CH ₃ CN | HPLC | J.T. Baker |
| Hexano | C ₆ H ₁₄ | HPLC | Mallinckrodt |

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Técnica de análise de substâncias em uma mistura, em que a separação cromatográfica é obtida a partir de interações diferenciais entre os analitos componentes da mistura, a fase estacionária e a fase móvel. Refere-se a qualquer procedimento cromatográfico em que a fase móvel é um líquido.

Constitui uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação, que foi primeiramente empregada em 1906, mas que foi redescoberta e desenvolvida somente na década de 30. A partir daí, muitos avanços foram alcançados, como por exemplo, o advento de fases estacionárias com micropartículas esféricas com tamanhos cada vez menores ($\leq 2\mu\text{m}$) como material de recheio das colunas cromatográficas, permitindo assim uma ampla variedade de interações e garantindo muitas possibilidades de separação. Essas, por serem muito pouco permeáveis, tornaram necessária a utilização de bombas para a eluição da fase móvel.

Sua instrumentação necessária basicamente é composta por um sistema de bombeamento, medidor de pressão, injetor, detector e registrador.

Como requisitos para a fase móvel são necessários solventes com alto grau de pureza, compatibilidade com o sistema de detecção e polaridade adequada. Exemplos de fase móvel utilizadas são: água, metanol, acetonitrila e hexano. Já as bombas têm por finalidade gerar altas pressões, enviando um fluxo contínuo de fase móvel para o sistema cromatográfico.

As fases estacionárias mais utilizadas em HPLC, atualmente, são as do tipo fase reversa (HPLC-RP), onde a fase estacionária apresenta polaridade menor que

a fase móvel. Separações com colunas de fase reversa em HPLC utilizam fases móveis feitas com misturas de metanol:água ou acetonitrila:água.

Os detectores são responsáveis por gerar o sinal quando a substância é eluída da coluna. Detectores seletivos como o de fluorescência apresenta alta detectabilidade, sendo possíveis detecções em quantidades da ordem de picograma (10^{-12} g).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido a técnica analítica mais desenvolvida, difundida e empregada em laboratórios de análise de indústrias químicas e farmacêuticas, em áreas médicas, em muitos outros campos da ciência e até em órgãos governamentais, estando associada a bom desempenho, reprodutibilidade e análises rápidas sem perda de eficiência e de resolução.

3.4 Preparação das soluções-estoque

Foram preparadas soluções-estoque de concentração nominal $100\mu\text{g mL}^{-1}$ (massa do padrão por volume de acetonitrila para HPLC/FLU) para cada um dos analitos de interesse. A partir das soluções-estoque, foram preparadas soluções de trabalho mistas (utilizadas para a avaliação do desempenho do sistema e para a construção das curvas analíticas) com diferentes concentrações diluídas, de modo a adequar-se à resposta do sistema cromatográfico avaliado.

3.5 Condições cromatográficas

A mistura de solventes mais utilizados para a análise por cromatografia líquida desses compostos, citado na literatura, é acetonitrila com água (BARONTI et al. 2000; D'ASCENZO et al. 2003), numa vazão de 1 mL min^{-1} . As condições cromatográficas utilizadas neste trabalho foram anteriormente otimizadas neste grupo de pesquisa para análise em água de rio e água sub-superficial (ZOCOLO, 2009) para o sistema HPLC/FLU e estão sumarizadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Condições cromatográficas empregadas nas análises dos estrógenos

| | |
|-------------------|---|
| Equipamento | Cromatógrafo líquido Varian VARIAN LC920, com detector de fluorescência e ultravioleta. |
| Coluna | C18 (Phenomenex, 4,6 mm de diâmetro, 250 mm de comprimento e tamanho de partículas de 5 µm) Temperatura de 30°C. |
| Fase Móvel | modo gradiente Água/Acetonitrila 0,1%Ác.Acético 50:50 até 5min., 40:60 até 15min., 0:100 até 17min. vazão 1 mL min ⁻¹ |
| Volume de injeção | 20 µL (injeção automática) |
| Detecção | 230 nm (excitação) e 306 nm (emissão)/FLU 200nm /UV |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Utilizou-se a cromatografia de fase reversa, visto que os hormônios estrógenos apresentam baixa polaridade, ou seja, eles possuem estruturas de cadeia carbônica longas, sendo que quanto maior o número de substituintes, maior será sua polaridade, diminuindo a retenção devido à fase estacionária ser não polar (C₁₈), interagindo menos com os analitos e as fases móveis polares (água e acetonitrila), retendo-os. A detecção por fluorescência foi empregada devido a essas moléculas apresentarem anéis aromáticos policíclicos que fluorescem, ou seja, contém duplas ligações conjugadas múltiplas que pela passagem da luz de comprimento de onda adequado através da cela de amostra, são por ela excitadas. No retorno ao estado fundamental, a molécula excitada emite luz de comprimento de onda maior, que é detectada a um ângulo reto da radiação incidente. (SHELLY; WARNER et al. 1983).

3.6 Preparo das amostras de solo, esterco e lodo de esgoto.

3.6.1 Coleta das amostras de solo e esterco e preparo do solo e da mistura solo com esterco.

O solo utilizado no processo de otimização e validação do método para a análise dos estrógenos foi obtido no município de Araraquara-SP, sendo proveniente de uma área não cultivada do Horto de Plantas Tóxicas e Medicinais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (FCF da Unesp, campus de Araraquara-SP). Já o esterco bovino, embora também tenha sido coletado no Horto de Plantas Tóxicas e Medicinais da Faculdade, é proveniente do frigorífico Paraíso Verde localizado na região de Araraquara-SP.

Coletaram-se as amostras de solo e esterco manualmente com auxílio de uma pá, a uma profundidade de aproximadamente 10 cm, procurando estas serem representativas do ambiente amostral. Após a coleta das amostras de campo e homogeneização, realizou-se um quarteamento (processo de mistura em que a amostra bruta é dividida em quatro partes iguais, sendo tomadas duas partes opostas entre si para consistir uma nova amostra, descartando-se as duas partes restantes, repetindo-se o processo até volume desejado para obter uma maior confiabilidade na amostragem).

Ambas as amostras foram acondicionadas em recipientes metálicos (marmitas de alumínio) e secas em estufa de aeração forçada à temperatura ambiente ($T < 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 2 a 3 dias. Após a secagem, foram transportadas até o laboratório de pesquisa do Instituto de Química da UNESP de Araraquara-SP, onde foram destorroadas, trituradas em almofariz de porcelana e peneiradas (tamiz de inox, 250 μm abertura, malha mesh 60 e tamiz de inox, 106 μm abertura, malha mesh 140).

A mistura solo com esterco foi preparada, acondicionada em vasilhames e deixada em “incubação” por 15 dias na proporção equivalente a 60 Mg/ha ($10^6\text{ g Hectare}^{-1}$). Isso se faz necessário, pois, como a interação dos estrógenos e solo ocorre através da M.O, pode-se afirmar desse modo que, quanto maior for a superfície de contato, maior será essa interação. Após esse período, foram encaminhadas para análise completa no Laboratório de Análise de Solos do IQ/UNESP de Araraquara-SP, para sua caracterização. As análises resultaram em

33g MO/dm³ de material orgânico, para o solo sem adição de esterco, e 45 g MO/dm³, de material orgânico, para o solo enriquecido com esterco.

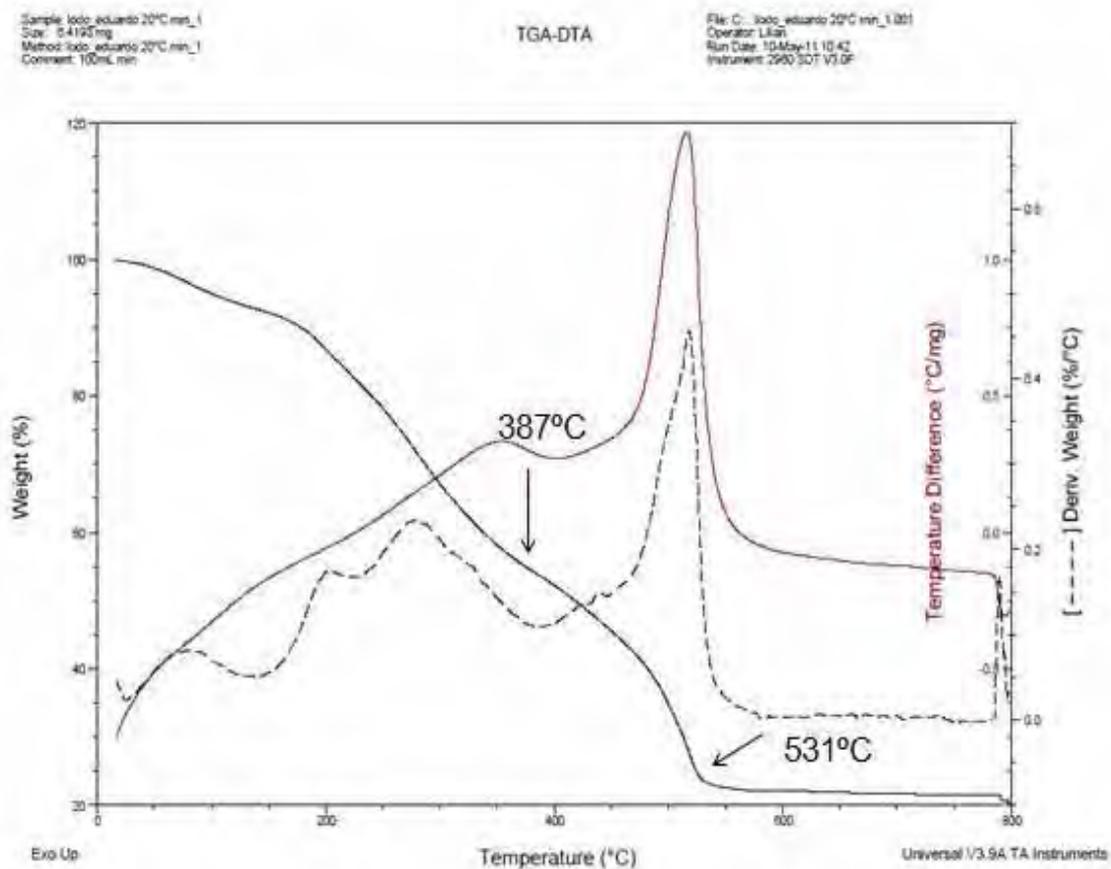
3.6.2 Coleta das amostras de lodo e preparo da mistura solo com lodo

A amostra de lodo foi coletada na cidade de Jaú-SP, que possui uma população atualmente estimada em cerca de 130 mil habitantes, a qual possui sua Estação de Tratamento de Esgoto que é controlada pela empresa SANEJ, Saneamento de Jaú Ltda, possuindo um sistema de tratamento por batelada com lodo ativado. A amostragem de cerca de 5kg ocorreu no dia 21 de maio de 2010. A amostra foi preservada sob refrigeração em uma caixa isotérmica com gelo durante o transporte até o laboratório do Instituto de Química da UNESP de Araraquara-SP. No laboratório, o lodo em contato com o plástico foi descartado (é sabido que plásticos contêm polímeros a base de ftalatos, por exemplo, o ftalato de polietileno, que possuem certo rendimento quântico (Φ) e sinal no detector de fluorescência, sendo que estas substâncias poderiam migrar para a amostra e interferir nas análises) e o restante foi separado em frascos de vidro e congelado em freezer da marca Cônsul. A amostra de lodo foi seca em estufa de aeração forçada à temperatura ($T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$) por 3 dias. Após a secagem, foi transportada até o laboratório de pesquisa do IQ/UNESP, onde se realizou quarteamentos sucessivos até obter-se cerca de 1 kg da amostra, triturada em almofariz de porcelana e peneirada, conforme descrito previamente no item 3.6.1 para solo e esterco. A mistura solo com lodo foi preparada na proporção equivalente a 60 Mg/ha ($10^6 \text{ g Hectare}^{-1}$), sendo posteriormente acondicionada em uma marmita.

Por apresentar características extremamente variáveis, dependendo de sua origem, época do ano, dia e processo de tratamento, uma amostra do lodo foi caracterizada separadamente por análise termogravimétrica (TG/DTG/DTA). A termogravimetria (TG) é uma técnica na qual a variação de massa de uma substância (Δ_m) é medida quando esta é submetida a uma programação controlada de temperatura. A termogravimetria derivada (DTG) é um recurso matemático que fornece a derivada primeira da curva TG (WENDLANDT, 1986). A DTA é a técnica pela qual a diferença de temperatura (ΔT) entre a substância e o material de referência (termicamente estável) é medida em função da temperatura, enquanto

ambos são submetidos a uma programação controlada de temperatura (OLIVEIRA, 2011). A Figura 4 refere-se às curvas TG/DTG/DTA obtidas em atmosfera dinâmica de ar sintético, com vazão do gás de 100 mL min⁻¹ e razão de aquecimento de 20°C min⁻¹, em cadinhos de alumina e as massas de amostras em torno de 10 mg. As temperaturas iniciais e finais foram, respectivamente, de 30 a 800 °C, a fim de se determinar sua porcentagem em massa de matéria orgânica presente nessa amostra.

Figura 4 – Curva TG/DTG/DTA da amostra de lodo de esgoto Estação de Tratamento de Esgoto de Jaú-SP.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Através da Figura 4, nota-se a volatilização da amostra no estágio entre 387 e 531°C, ocorrendo uma perda de massa, indicando assim que a porcentagem de matéria orgânica na amostra de lodo foi de aproximadamente 30%.

3.7 Métodos analíticos para determinação de estrógenos nas matrizes solo, solo com esterco.

Foram testados dois métodos de extração em solos e solos tratados com esterco bovino no intuito de avaliar as melhores condições de recuperação. São eles a extração por banho de ultrassom seguido de extração em fase sólida (SPE) e a dispersão de matriz em fase sólida (MSPD). Foram estudadas técnicas envolvendo C_{18} como fase estacionária e acetona como eluente, devido à presença dessas características em vários métodos presentes na literatura. Posteriormente, a matriz solo com lodo foi aplicada o método com melhores recuperações (considerado aceitável entre 50 a 120%, com precisão < 20%, dependendo da complexidade analítica e da amostra) (RIBANI et al., 2004). Para avaliar a recuperação dos estrógenos no processo de extração, foram utilizadas amostras de solo e solo com esterco enriquecidas com solução padrão mista contendo os três estrógenos em três níveis de concentração, correspondendo a concentrações próximas ao limite de quantificação do sistema analítico (nível inferior), no ponto médio da curva analítica (nível médio) e próximo a maior concentração da curva analítica (nível superior). O processo de enriquecimento das amostras de solo e solo com esterco foi efetuado pela adição de 1000 μ L da solução padrão a 1,0g das amostras de solo e solo com esterco para o banho de ultrassom seguido de SPE e 1,0g para a MSPD (processo realizado para 3 amostras).

Para a realização do estudo, optou-se por empregar uma pré-homogeneização da matriz com o analito, seguida de repouso por um período de 4 horas de *aging*, para que a interação amostra/analito fosse a mais fidedigna possível, mantendo-as durante esse período sob refrigeração (10°C). Decorrido este período, foram submetidas ao tratamento em estudo. Todo o processo foi acompanhado de uma amostra testemunha (sem a adição do padrão).

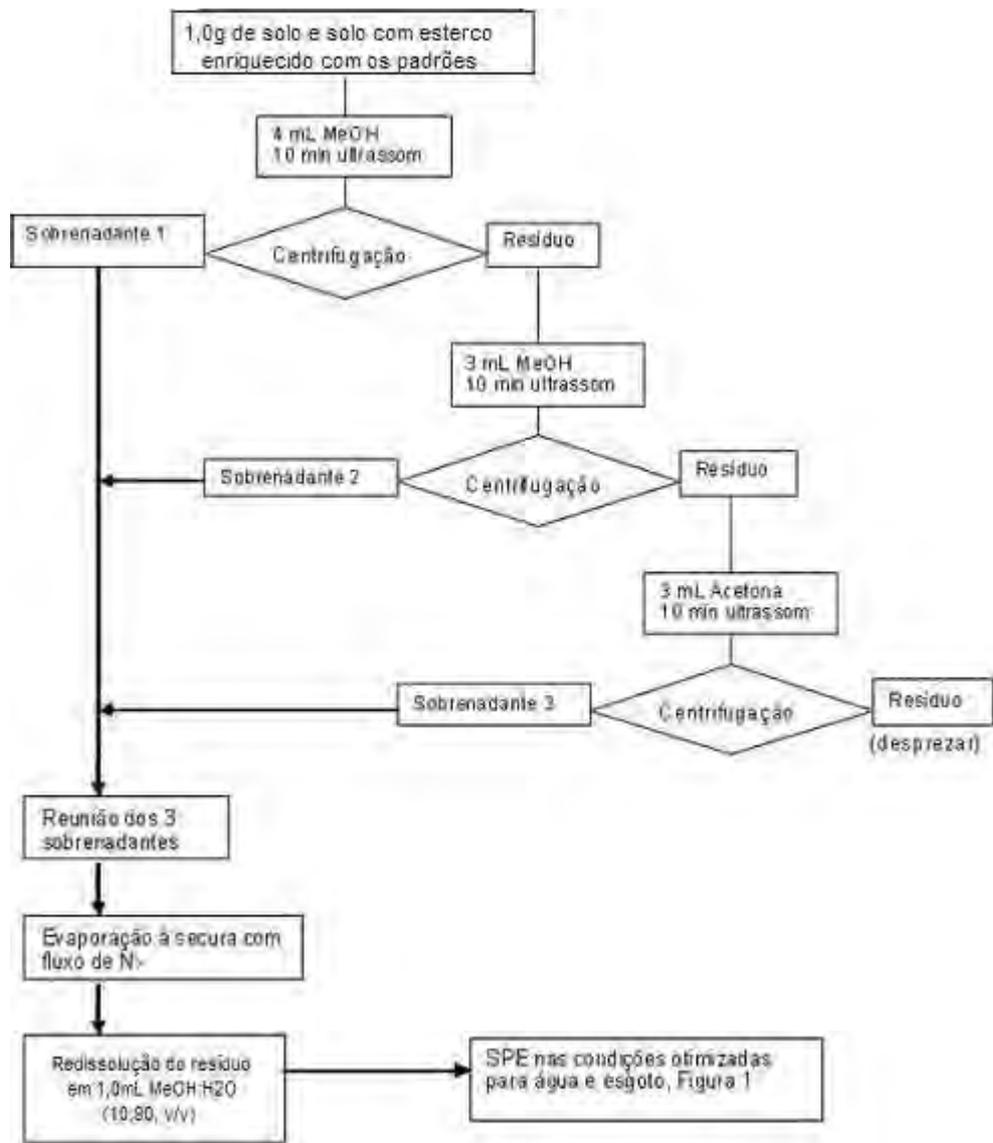
3.7.1 Método I – banho de ultrassom seguido de extração em fase sólida (SPE)

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica baseada na constante de distribuição de espécies químicas em duas fases diferentes.

O método inclui a extração sólido-líquido por solvente em banho de ultrassom (etapa extra inserida devido à matriz ser sólida), seguida do clean-up do extrato

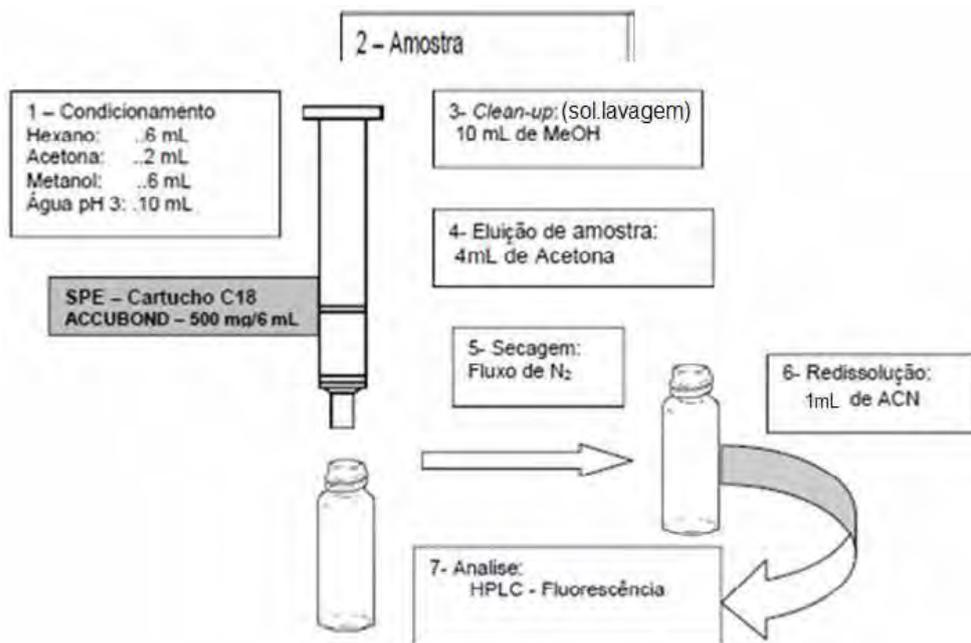
utilizando SPE C₁₈, de acordo com o método proposto por Stanford e Weinberg, (2007) e que se encontra sumarizado na Figura 5. As condições de condicionamento e eluição do cartucho SPE são as mesmas otimizadas por Moura (2009) e estão ilustradas na Figura 6.

Figura 5 - Procedimento para extração de estrógenos em solo e solo com esterco, utilizando banho de ultrassom seguido de extração em fase sólida (SPE).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 - Fluxograma do método utilizado para extração dos estrógenos em solo e solo com esterco por SPE.



Fonte: (MOURA, 2009).

Pesou-se 1g da amostra em triplicata com posterior fortificação com os analitos de interesse, segundo as condições estabelecidas anteriormente no item 3.7. No processo de extração, utilizou-se os solventes metanol e acetona por 10 minutos para o banho de ultrassom. Após a centrifugação, procedeu-se uma secagem total com fluxo brando de nitrogênio (N₂), realizando-se a redissolução com 1mL de metanol/água na proporção (1:9), deixando-se novamente por 10 minutos no ultrassom. As amostras foram transferidas pelo cartucho de C₁₈ condicionado, com o objetivo de pré-concentração e *clean-up* da amostra. Posterior a esse processo, aplicou-se leve pressão com êmbolo de uma seringa para a total secagem destas. Realizou-se a eluição dos cartuchos com 4mL de acetona, levando-se novamente para a secagem com nitrogênio. Terminada esta etapa, foi feita uma redissolução dos analitos com 1mL de acetonitrila e filtragem com filtros millipore para injeção no HPLC/UV/FLU.

3.7.2 Método II - dispersão da matriz em fase sólida (MSPD)

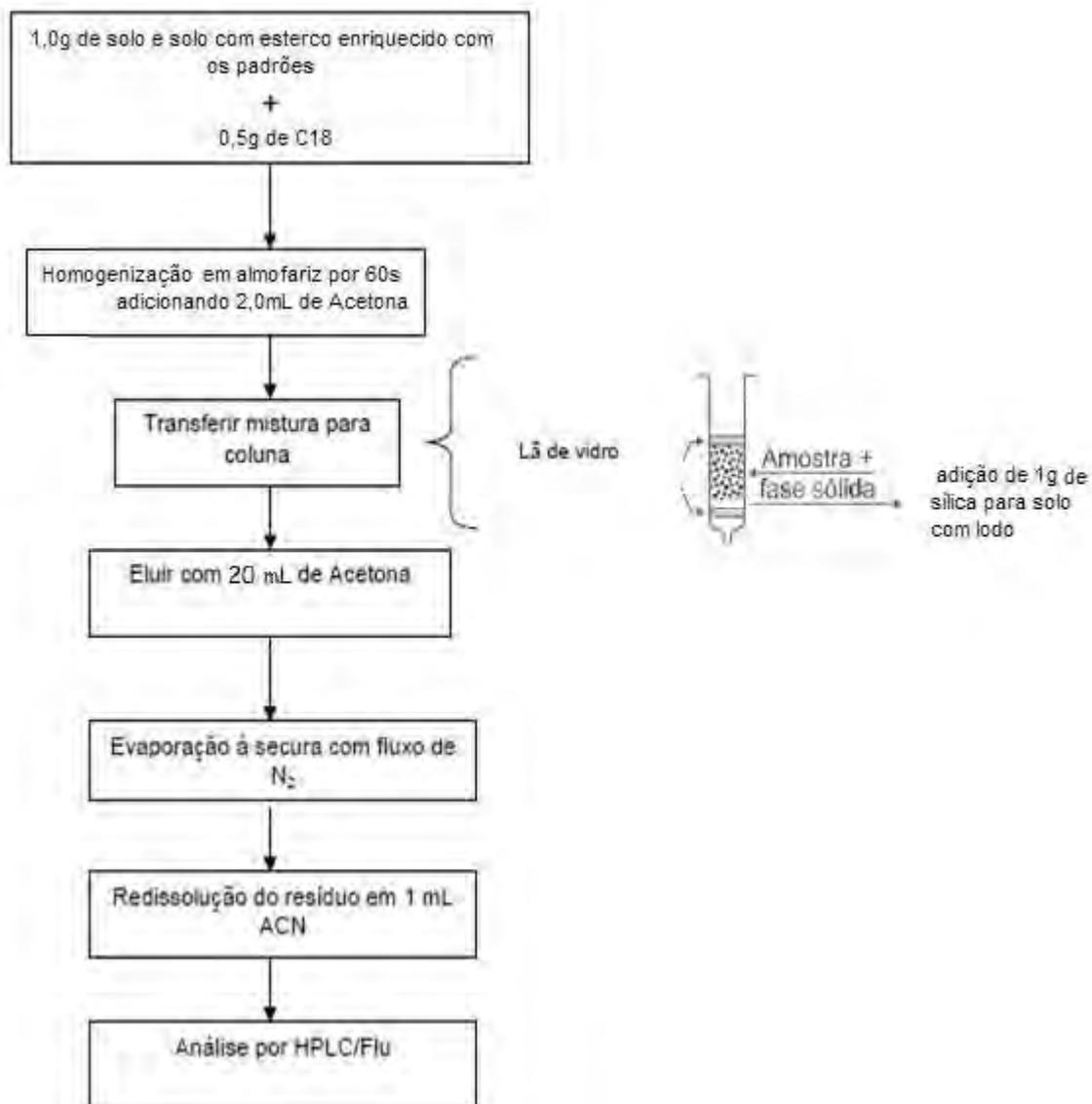
Muitas vezes, análises de rotina no laboratório baseiam-se em grande parte de métodos clássicos para a determinação de traços de poluentes. Normalmente, estes apresentam procedimentos multi-etapas, geralmente baseado na extração exaustiva da matriz, e subsequente remoção de material de co-extraídos por várias etapas de limpeza antes da análise instrumental. Apresentam técnicas de preparo que precisam de uma grande quantidade de amostra e de solventes orgânicos. Estes métodos são de alto custo, devido ao consumo de materiais, e também exaustivos. Um desenvolvimento mais rápido, mais econômico e compatível com o meio ambiente é cada vez mais necessário. É vantajoso, portanto, quando se tem a oportunidade de utilizar métodos que apresentem tais características.

A dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) foi introduzida em 1989 por Barker et al.(1989). O princípio da técnica é baseado na homogeneização da amostra enquanto ela é dispersa em suporte sólido (sílica, florisil, C₈, C₁₈ etc), misturadas até homogeneização, gerando um material cromatográfico que possui um caráter especial para a extração de compostos dispersos na amostra e esse material (matriz e adsorvente), é transferido para uma coluna e eluído com solvente apropriado, como ilustra a Figura 7. A principal diferença entre a MSPD e SPE (um método clássico de extração dos analitos), é que a amostra é dispersa em toda a coluna e não mantida somente no topo.

É um método seletivo, flexível, com possibilidade de promover extração e clean-up concomitante, resultando em um rápido pré-tratamento, usando baixo consumo de solventes e também mais limpo, em consonância com os princípios da química verde.

A MSPD vem sendo indicada para a análise de traços de medicamentos, poluentes orgânicos e compostos de ocorrência natural em amostras ambientais, biológicas e de alimentos. Como limitações da técnica pode-se apontar a análise de alimentos ou biológicos, algumas vezes contendo matrizes gordurosas.

Figura 7 - Procedimento para extração de estrógenos em solo, solo com esterco e solo com lodo de ETE, utilizando dispersão em fase sólida (MSPD).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Pesou-se 1g da amostra em triplicata com posterior fortificação com os analitos de interesse, segundo as condições estabelecidas previamente no item 3.7. Foram homogenizadas em cápsula de porcelana amostra/C₁₈, com adições de aproximadamente 2mL de acetona no total durante a mistura para agregá-las, transferindo-as posteriormente para uma seringa de injeção de polietileno comum (encontradas em farmácias), tendo lã de vidro como base de sustentação para a mistura, que foi posteriormente coberta com uma segunda camada de lã de vidro. A

eluição foi efetuada com 20mL do eluente, sendo feita simples pressão da seringa com o êmbolo para a total secagem destas.

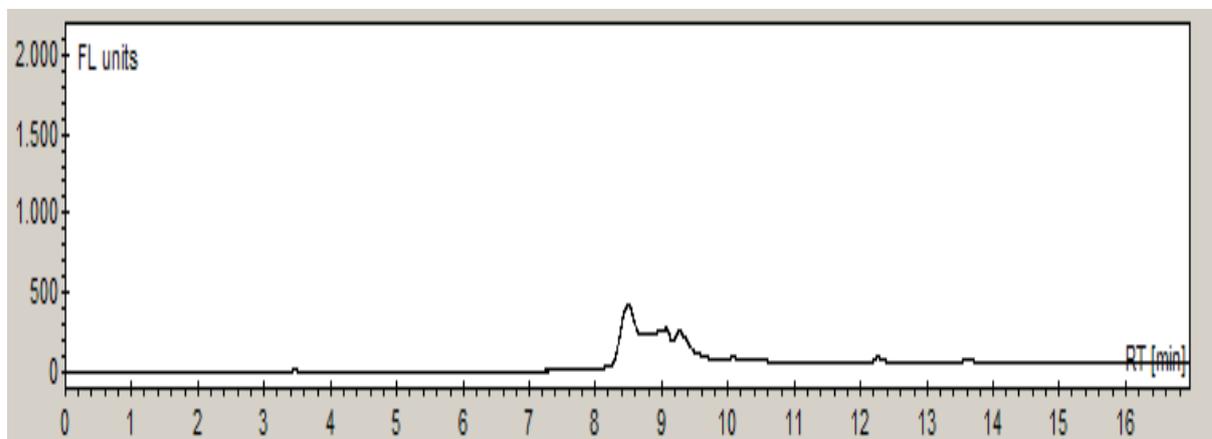
Fez-se a secagem com fluxo brando de nitrogênio. Terminada esta etapa, foi feita uma redissolução dos analitos em 1mL de acetonitrila e filtrado com filtros para injeção no HPLC.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Linearidade da resposta do detector

Durante os dois primeiros meses do estudo a presença de um pico interferente com mesmo tempo de retenção do analito estriol (E3) no sistema fluorescência impossibilitou sua análise. O problema persistia inclusive após corrida cromatográfica com injeção apenas do solvente ACN, como mostra a Figura 8, fato atribuído a prováveis impurezas no solvente que fluoesciam no mesmo comprimento de onda.

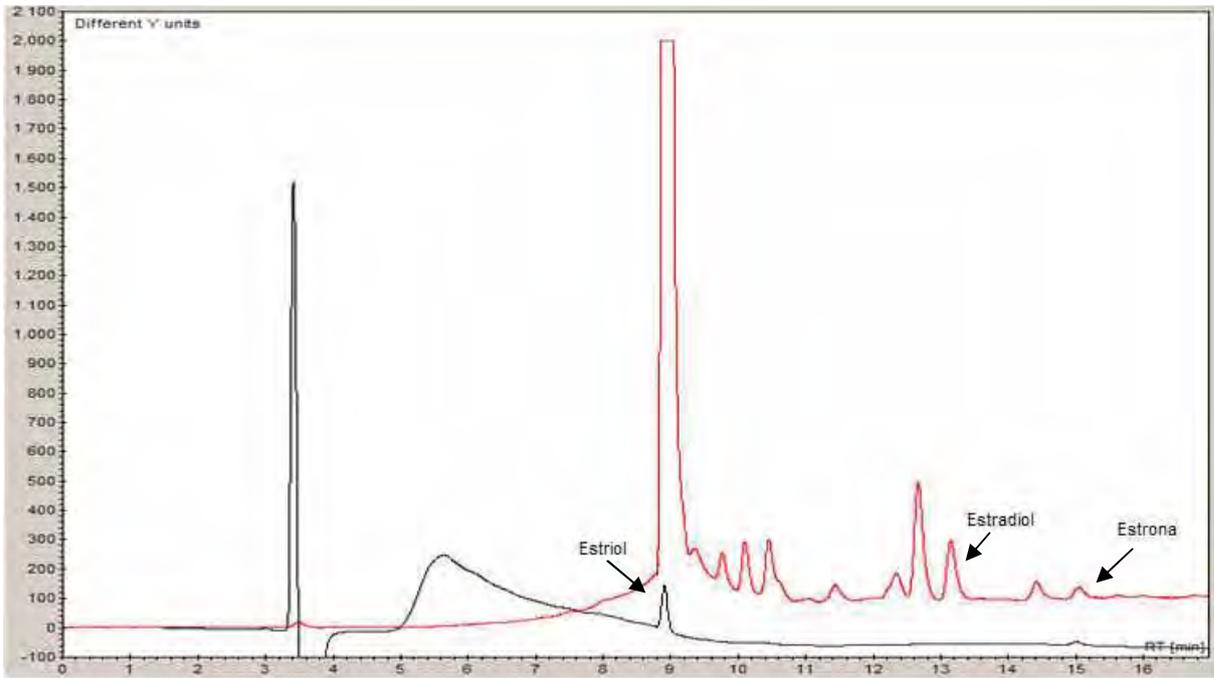
Figura 8 - Cromatograma (HPLC/FLU) do solvente acetonitrila ilustrando a presença do pico interferente ($t_r=9,00\text{min.}$) nas condições otimizadas da Tabela 5.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Como o equipamento Varian LC920 permite as análises simultâneas nos sistemas fluorescência e UV, foram testadas então, alternativamente, as mesmas condições do sistema HPLC/FLU para o HPLC/UV, com a seleção do comprimento de onda da lâmpada de UV para as análises em 200nm, a qual durante a avaliação apresentou o máximo espectro de absorção para o analito na concentração de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em acetonitrila, como se observa na Figura 9.

Figura 9 - Cromatograma no sistema HPLC/UV (preto) do padrão nas concentrações $5\mu\text{g mL}^{-1}$ para o estriol ($t_r=9,00\text{min.}$) e no sistema HPLC/FLU (vermelho) $150,0\text{ng mL}^{-1}$ para o estradiol ($t_r=13,10\text{min.}$) e $2,0\mu\text{g mL}^{-1}$ para a estrona ($t_r=15,00\text{min.}$).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se na Figura 9 que a resolução obtida mostrou-se adequada, ocorrendo a eluição/quantificação para a molécula. A desvantagem apresentada pelo HPLC/UV consistiu na baixa resposta em relação ao sistema HPLC/FLU, permitindo que o restante do desenvolvimento do trabalho nesse sistema tivesse continuidade apenas para o analito estriol.

A obtenção dos gráficos de linearidade e das curvas analíticas avaliou a resposta dos sistemas cromatográficos (HPLC/FLU, HPLC/UV, Varian 920). Para tanto, foram utilizadas 9 soluções padrão contendo os três analitos em concentrações entre $0,8$ e $10,0(\mu\text{g mL}^{-1})$ para a estrona e o estriol e $32,0$ e $400,0(\text{ng mL}^{-1})$ para o estradiol. Cada uma das soluções padrão foi analisada em triplicata.

A Figura 10 apresenta as Curvas de Linearidade obtidas através das médias das áreas sobre a concentração (eixo y), pela concentração (eixo x), para cada um dos hormônios estrona (E1), estriol (E3) e estradiol (E2), respectivamente. Através da aplicação do teste de Huber, considerou-se as médias dos fatores de resposta estabelecendo-se um limite inferior e um superior (retas destacadas nos gráficos). Primeiramente se define o valor central através do cálculo da mediana (md) dos valores das área/concentração obtidos experimentalmente para cada analito. Essa

mediana então obtida é subtraída de cada um dos valores das área/concentração anteriores e para cada um desses valores se obtém uma nova mediana (mad). Os intervalos de confiança são então calculados usando-se as fórmulas:

$$IC = k * mad$$

Onde k é um fator que pode variar entre 2 e 8, (no estudo foi utilizado k igual a 3).

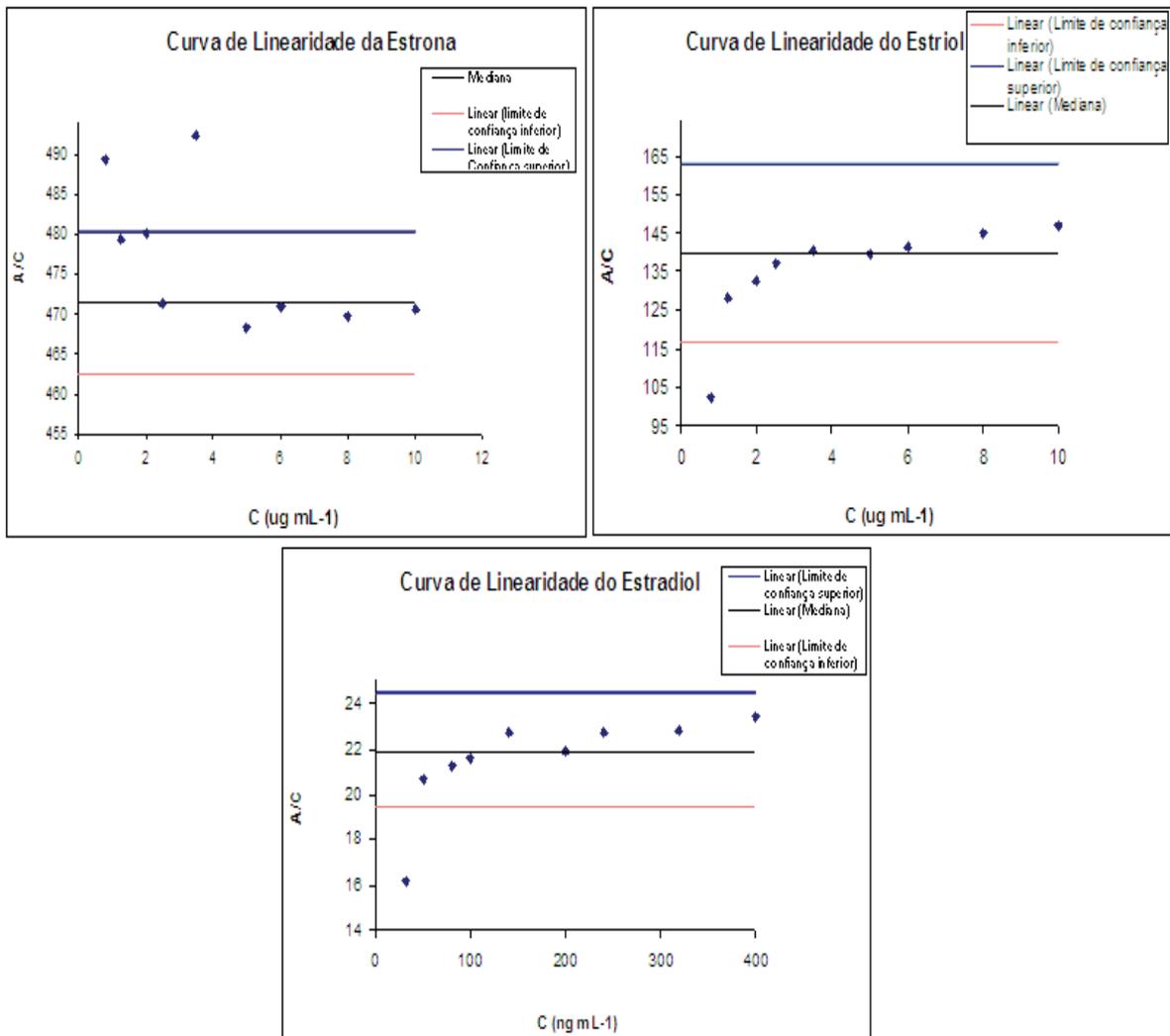
Assim, tem-se o Limite superior (ICs) definido como

$$ICs = md + k * mad$$

e o Limite inferior (ICi) definido como

$$ICi = md - k * mad.$$

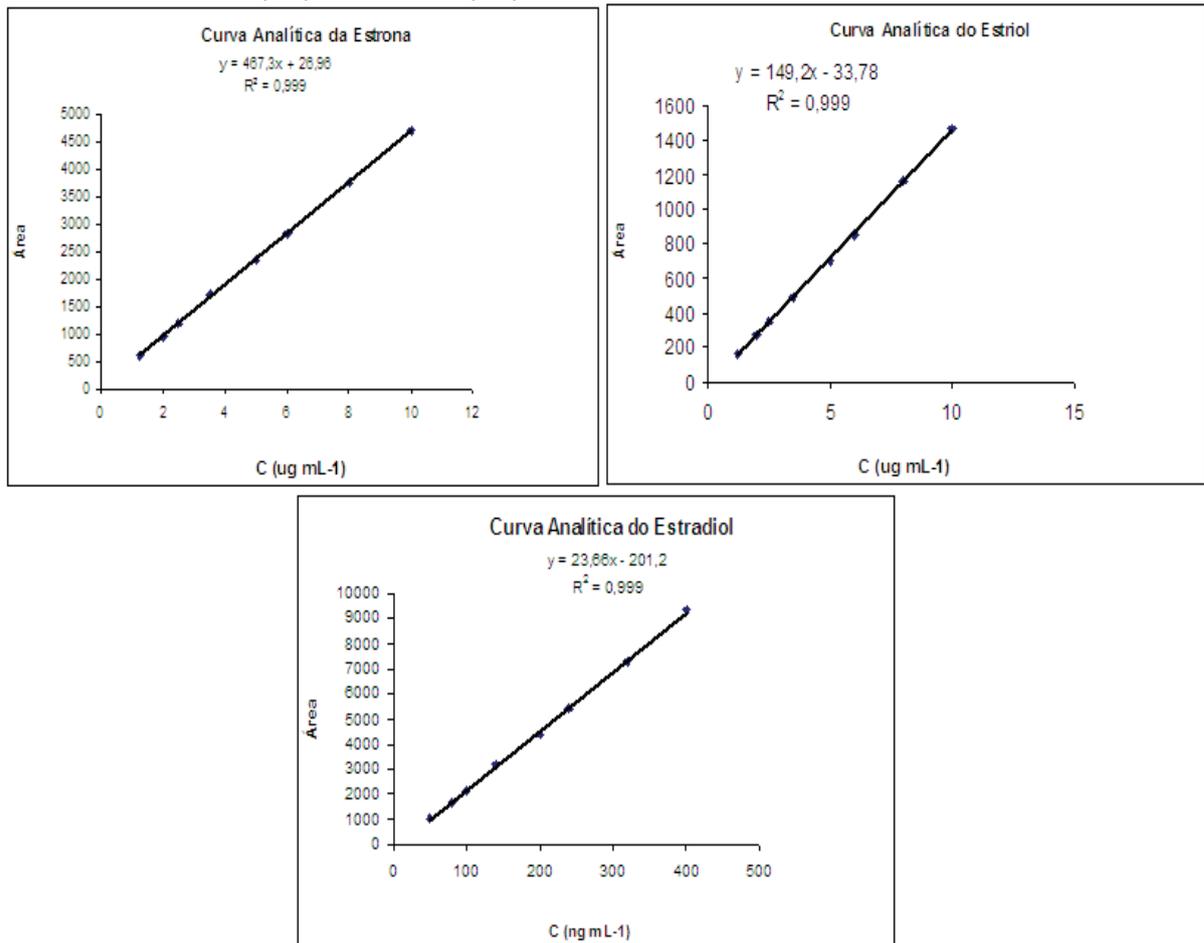
Figura 10 - Linearidade obtida no sistema LC-920 para os estrógenos estrona (E1), estriol (E3) e estradiol (E2) em estudo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os pontos situados entre estes limites pertencem ao intervalo linear dinâmico e devem ser utilizados para a construção da curva analítica. As curvas analíticas para os 3 estrógenos foram construídas utilizando os pontos que efetivamente encontravam-se no intervalo de linearidade. A Figura 11 apresenta as curvas analíticas para cada um dos estrógenos. As injeções de cada ponto da curva no sistema cromatográfico foram realizadas em triplicata. Através destas, pode-se atestar que há linearidade do método cromatográfico devido ao coeficiente de correlação próximo de um, o que, segundo Agência Nacional de Vigilância Sanitária, atende ao valor recomendado de 0,99 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

Figura 11 - Curvas analíticas obtidas no sistema LC-920 para os estrógenos estrona (E1), estriol (E3) e estradiol (E2) em estudo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Determinação dos limites de detecção (LD_e) e de quantificação (LQ_e) do equipamento.

Baseia-se a determinação dos limites de detecção (LD_e) e de quantificação (LQ_q) do equipamento através do teste de Huber. Considera-se como o limite de detecção do equipamento (LD_e) a concentração mais baixa fora do intervalo de linearidade e o limite de quantificação (LQ_q) como o menor valor de concentração do analito que se encontra dentro do intervalo de linearidade na Figura 9 .

A Tabela 6 apresenta os limites de detecção (LD_e) e de quantificação (LQ_q) do equipamento para cada analito estudado.

Tabela 6 - Limites de detecção para o sistema HPLC/FLU/UV, $V_{inj} = 20\mu\text{L}$ e nas condições cromatográficas otimizadas (Tabela 5)

| Hormônio | Intervalo da curva (ng mL^{-1}) | S | R | LD (ng mL^{-1}) | LQ (ng mL^{-1}) |
|----------|--|-------|-------|----------------------------|----------------------------|
| E1/FLU | 800,0 – 10000,0 | 467,3 | 0,999 | 800,0 | 1250,0 |
| E3/UV | 800,0 – 10000,0 | 149,2 | 0,999 | 800,0 | 1250,0 |
| E2/FLU | 32,0 – 400,0 | 23,66 | 0,999 | 32,0 | 50,0 |

S = coeficiente angular; R = coeficiente de correlação

Fonte: Elaborado pelo autor.

A disparidade entre os valores de LD e LQ para a estrona em relação ao 17β -estradiol, ambos obtidos pelo mesmo detector, refere-se a diferente intensidade de fluorescência desse hormônio (ressonância da dupla ligação do átomo de oxigênio ligado ao anel da estrona).

4.3 Avaliação do desempenho dos métodos de extração para determinação dos estrógenos em solo e solo com esterco.

Nas análises de micropoluentes orgânicos em matrizes ambientais, a validação do método analítico é realizada, rotineiramente, por meio de ensaios de recuperação, pois através deles originam-se informações necessárias como a exatidão e a precisão para a avaliação do procedimento. Esses dois itens correspondem respectivamente aos valores de porcentagem de recuperação e coeficiente de variação do método (TOLEDO-NETTO, 2009).

Nesse sentido, os resultados obtidos para os dois métodos de extração estão explicitados a seguir.

4.4 Planejamento fatorial do método da dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) para determinação de estrógenos.

Em estudo efetuado anteriormente no trabalho de conclusão de curso do autor desta dissertação, estudou-se a dispersão de matriz em fase sólida para a extração de estrona (E1), 17β -estradiol (E2) e 17α -etinilestradiol (EE2) de solo. Neste trabalho inicial, utilizou-se o planejamento fatorial 2^n experimentos (n é o número de variáveis envolvidas). A variação dos parâmetros fundamentais na otimização empregados foram: massa da amostra (0,5g/1,0g), massa do sorbente C_{18} (0,5g/1,0g), e volume do solvente orgânico acetona, (10,0mL/20,0mL), onde foram combinados, determinando-se, com um número pequeno de experimentos (8 experimentos no total), o efeito individual de cada parâmetro, obtendo-se assim as melhores condições para extrair todos os analitos de interesse.

Usando como critério a obtenção da precisão e exatidão nos intervalos propostos por Ribani et al. (2004), ou seja, recuperações entre 50-120% com $CV < 20$, as melhores condições foram obtidas empregando-se 1,0g de massa da amostra, 0,5g de massa de sorbente e 20,0mL de volume de eluente, como pode ser visto pelos dados apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados do estudo preliminar de recuperação para determinação de E1, E2 e EE2 em solo (CANAVAR, 2008) enriquecido com solução padrão ($2,0\mu\text{g g}^{-1}$ para E1, $0,3\mu\text{g g}^{-1}$ para E2, $0,1\mu\text{g g}^{-1}$ para EE2). Em destaque a condição de melhor recuperação.

| Massa da amostra (g) | Massa de C18 (g) | Volume de acetona (eluyente)(mL) | Recuperação média (%) | | CV (%) |
|----------------------|------------------|----------------------------------|-----------------------|-----|--------|
| 0,5 | 0,5 | 10 | E1 | 53 | 22 |
| | | | E2 | 122 | 5 |
| | | | EE2 | 60 | 46 |
| 0,5 | 1,0 | 20 | E1 | 40 | 13 |
| | | | E2* | - | - |
| | | | EE2 | 65 | 10 |
| 0,5 | 0,5 | 20 | E1 | 50 | 20 |
| | | | E2 | 34 | 44 |
| | | | EE2 | - | - |
| 1,0 | 1,0 | 20 | E1 | 78 | 15 |
| | | | E2* | - | - |
| | | | EE2 | 82 | 2 |
| 1,0 | 0,5 | 10 | E1 | 41 | 1 |
| | | | E2 | 88 | 46 |
| | | | EE2 | 82 | 10 |
| 1,0 | 0,5 | 20 | E1 | 58 | 27 |
| | | | E2 | 82 | 3 |
| | | | EE2 | 90 | 7 |
| 1,0 | 1,0 | 10 | E1 | 40 | 1 |
| | | | E2* | - | - |
| | | | EE2 | 109 | 3 |
| 0,5 | 1,0 | 10 | E1 | 15 | 22 |
| | | | E2 | 116 | 50 |
| | | | EE2 | 67 | 13 |

*não recuperado

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.1 Avaliação da precisão e exatidão do método da dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) na extração solo e solo com esterco.

O método da dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) foi submetido à avaliação da precisão e exatidão, em três níveis de concentrações distintos da faixa linear do intervalo de trabalho. Para cada nível, foram efetuadas três repetições acompanhadas de uma amostra testemunha, sob as melhores condições de extração anteriormente sumarizadas no item 4.4. Os resultados para as matrizes solo e solo com esterco estão apresentados nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Recuperação e CV em três níveis de fortificação para a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), em solo enriquecido com solução padrão (n=3).

| Hormônio | Nível 1 ($\mu\text{g g}^{-1}$) | Rec média (%) | CV (%) | Nível 2 ($\mu\text{g g}^{-1}$) | Rec média (%) | CV (%) | Nível 3 ($\mu\text{g g}^{-1}$) | Rec média (%) | CV (%) |
|----------|-------------------------------------|---------------------|-----------|-------------------------------------|---------------------|-----------|-------------------------------------|---------------------|-----------|
| E1/FLU | 2,5 | 97 | 1 | 5,0 | 77 | 15 | 8,0 | 86 | 2 |
| E2/FLU | 0,1 | 89 | 1 | 0,2 | 77 | 15 | 0,3 | 84 | 3 |
| E3/UV | 2,5 | 46 | 3 | 5,0 | 53 | 14 | 8,0 | 75 | 3 |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 9 - Recuperação e CV em três níveis de fortificação para a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), em solo com esterco enriquecido com solução padrão (n=3).

| Hormônio | Nível 1 ($\mu\text{g g}^{-1}$) | Rec média (%) | CV (%) | Nível 2 ($\mu\text{g g}^{-1}$) | Rec média (%) | CV (%) | Nível 3 ($\mu\text{g g}^{-1}$) | Rec média (%) | CV (%) |
|----------|-------------------------------------|---------------------|-----------|-------------------------------------|---------------------|-----------|-------------------------------------|---------------------|-----------|
| E1/FLU | 2,5 | 94 | 1 | 5,0 | 79 | 15 | 8,0 | 88 | 15 |
| E2/FLU | 0,1 | 88 | 3 | 0,2 | 81 | 12 | 0,3 | 80 | 15 |
| E3/UV | 2,5 | 63 | 6 | 5,0 | 86 | 9 | 8,0 | 80 | 15 |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Empregando como critério a obtenção de recuperações nos intervalos aceitáveis entre 50 a 120%, com precisão < 20% dependendo da complexidade

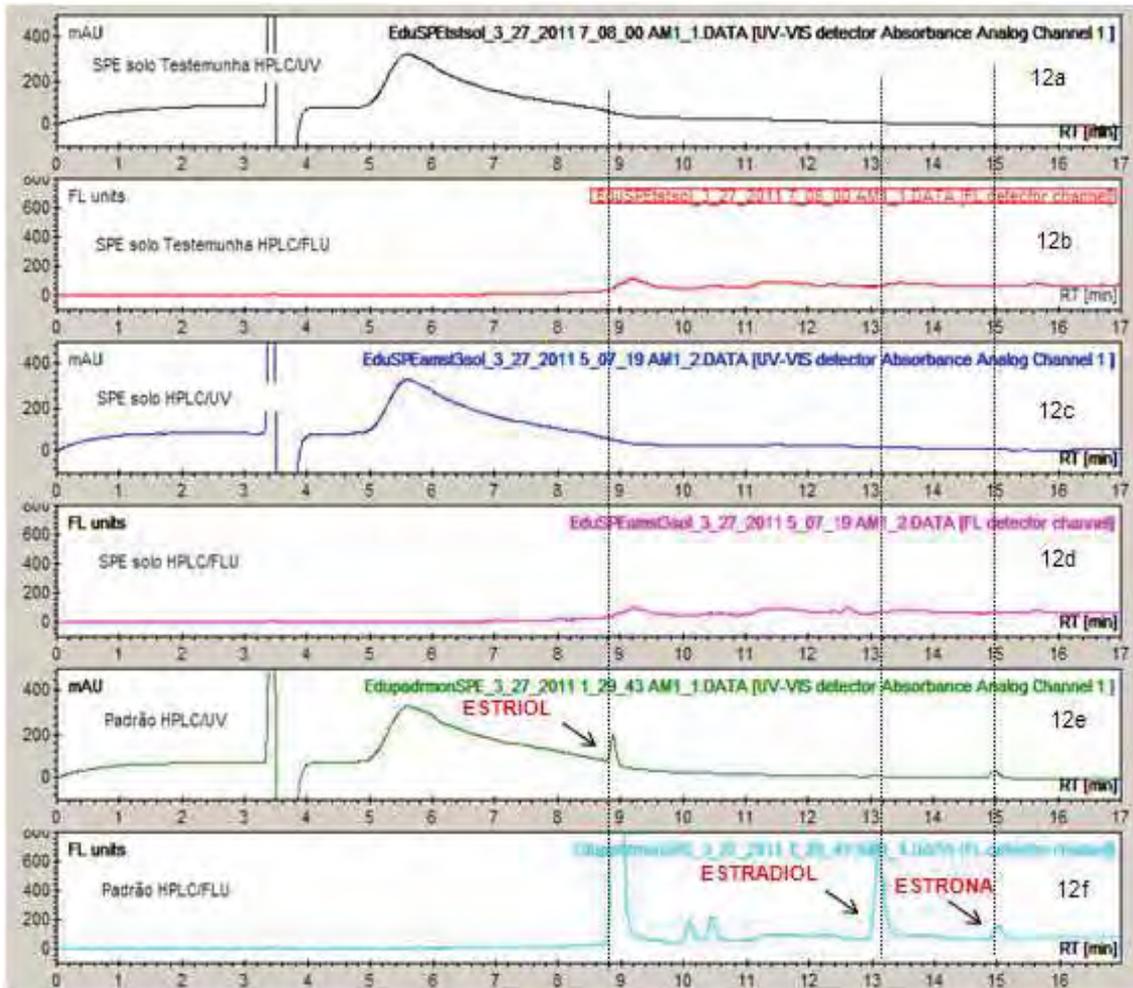
analítica e da amostra (RIBANI et al., 2004), nota-se que o método da MSPD apresentou resultados apropriados. No presente trabalho, o LQ_m foi estimado segundo o método estatístico, no qual corresponde ao menor nível de fortificação estudado, segundo a recuperação e precisão proposta por Ribani et al., 2004. Pelas Tabelas 8 e 9 se estabelece, portanto, que o limite de quantificação do método foi de $2,5\mu\text{g g}^{-1}$ para os analitos estriol (E3) e estrona (E1) e $0,1\mu\text{g g}^{-1}$ para o estradiol (E2) em ambas as matrizes.

Considerou-se também o limite de quantificação para o estriol em solo como $2,5\mu\text{g g}^{-1}$, pois, embora tenha apresentado recuperação média de 46% (abaixo do proposto por RIBANI et al. (2004)), obteve baixo valor de coeficiente de variação (CV= 3%).

4.4.2 Avaliação da precisão e exatidão do método do banho de ultrassom seguido de extração em fase sólida (SPE) na extração solo e solo com esterco.

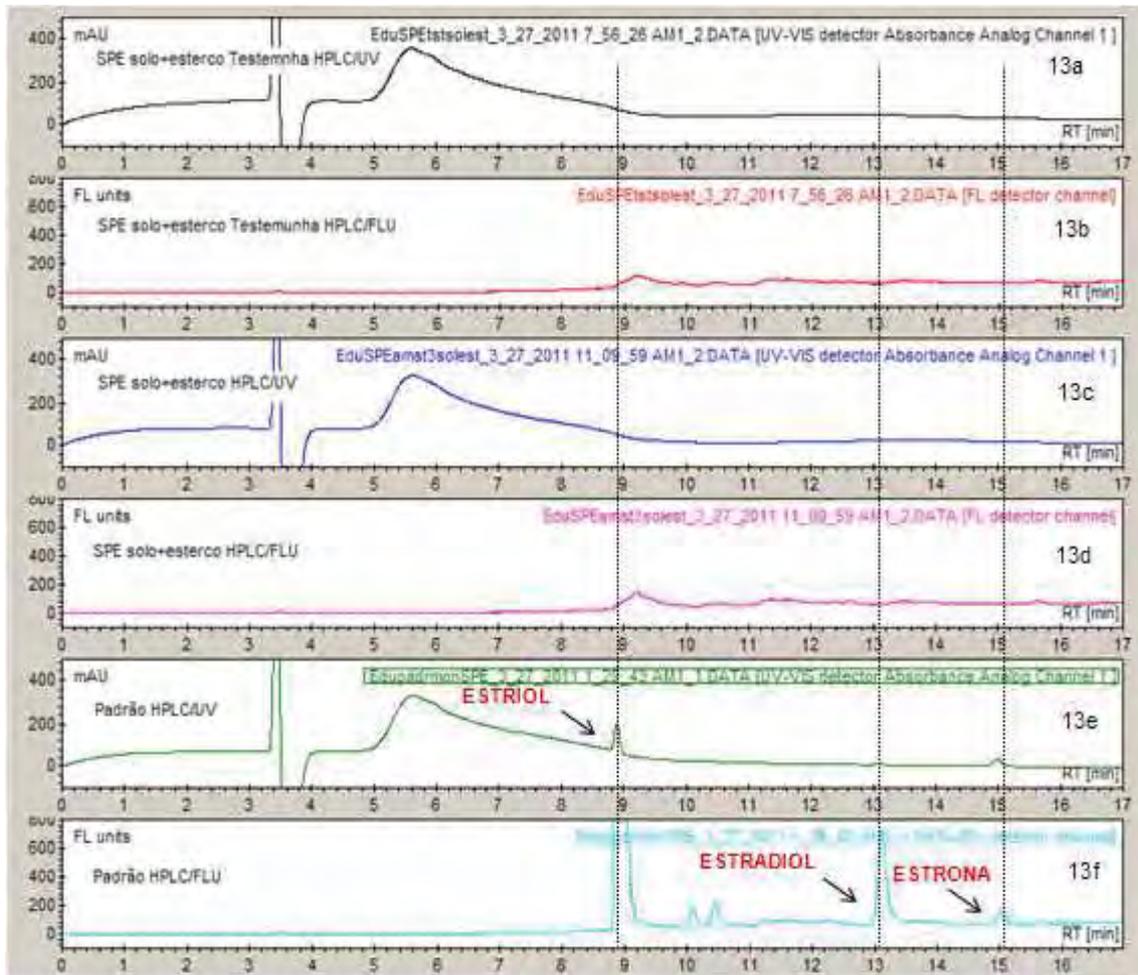
Os resultados obtidos com as análises dos extratos utilizando-se o método para as matrizes solo e solo com esterco não foram satisfatórios, como mostram as Figuras 12 e 13, pois não obtiveram resultados em nenhuma das análises nos níveis de fortificação da curva analítica, persistindo o problema mesmo após algumas modificações realizadas na etapa do ultrassom, como variações da massa pesada das amostras e volume de redissolução do resíduo com metanol:H₂O. Como toda a etapa de condicionamento do cartucho já foi anteriormente otimizado no grupo de pesquisas para matrizes líquidas, atribuiu-se a etapa do ultrassom a ineficiência na extração dos analitos das matrizes.

Figura 12 – Seletividade do método do banho de ultrassom seguido de extração em fase sólida (SPE) em solo. Comparação das testemunhas no sistema UV (Figura 12a) e FLU (Figura 12b) com extrações na concentração $5\mu\text{g g}^{-1}$ para E3 no sistema UV 200nm (Figura 12c), $5\mu\text{g g}^{-1}$ para E1 e 200ng g^{-1} para E2 no sistema FLU 230nm excitação, 306nm emissão (figura 12d), com padrões nas mesmas concentrações no UV e FLU (Figuras 12e e 12f respectivamente).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13 – Seletividade do método do banho de ultrassom seguido de extração em fase sólida (SPE) em solo com esterco. Comparação das testemunhas no sistema UV (Figura 13a) e FLU (Figura 13b) com extrações na concentração $5\mu\text{g g}^{-1}$ para E3 no sistema UV 200nm (Figura 13c), $5\mu\text{g g}^{-1}$ para E1 e 200ng g^{-1} para E2 no sistema FLU 230nm excitação, 306nm emissão (Figura 13d), com padrões nas mesmas concentrações no UV e FLU (Figuras 13e e 13f respectivamente).



Fonte: Elaborado pelo autor.

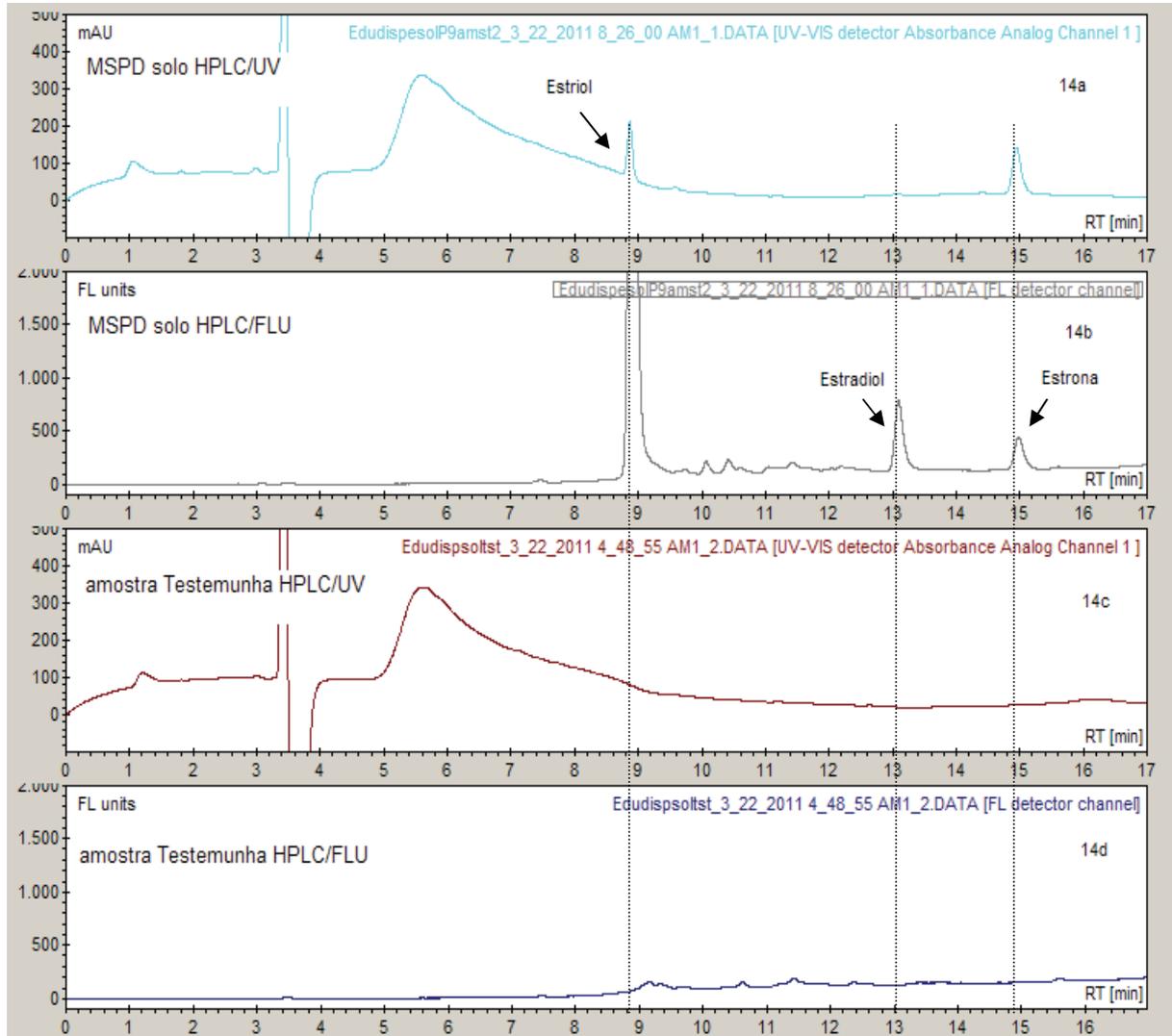
Considerando-se os resultados observados nas Figuras 12 e 13 e havendo a necessidade de maiores alterações para se otimizar o método para adequá-lo a essas matrizes sólidas, aliado ainda ao maior custo e consumo de solventes que são empregados nas extrações por esse método, optou-se por dar continuidade apenas a otimização do método da dispersão de matriz em fase sólida (MSPD).

4.4.3 Avaliação da seletividade e do efeito de matriz para a dispersão de matriz em fase sólida na extração solo e solo com esterco.

Retomado o processo de otimização do método da MSPD, foram avaliados os parâmetros da seletividade e efeito de matriz.

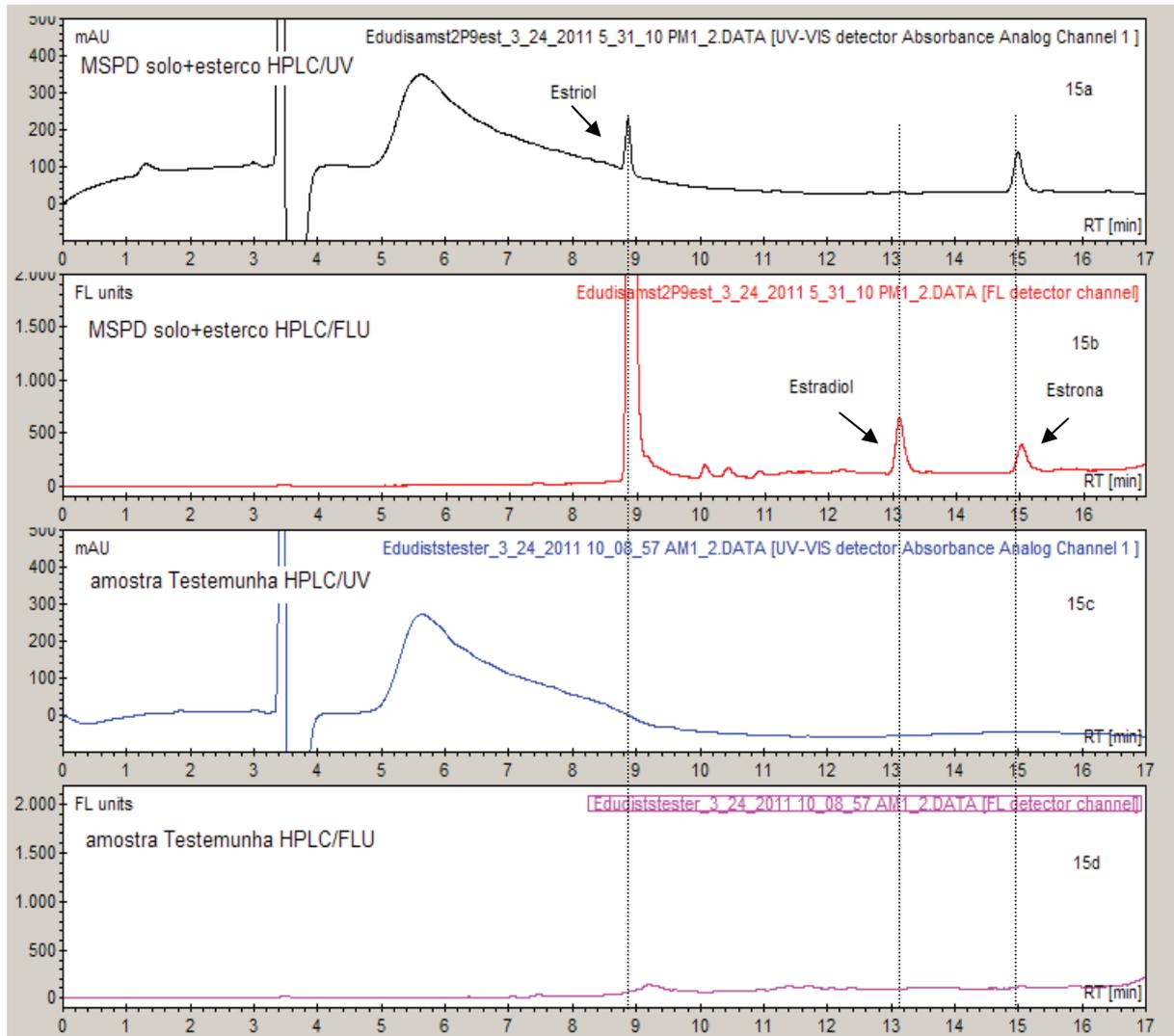
Seletividade: é a capacidade de avaliar de forma inequívoca as substâncias em exame, na presença de componentes que podem interferir na determinação de analitos em uma amostra complexa. Consiste em comparar a matriz isenta da substância de interesse a matriz fortificada com esta substância (padrão); a fim de se investigar a técnica com melhor resolução e menor número de interferentes na corrida cromatográfica para essa matriz. Nenhum outro composto deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse. As Figuras 14 e 15 apresentam respectivamente os parâmetros da seletividade para solo e solo com esterco utilizando-se o método da MSPD.

Figura 14 - Seletividade da MSPD em solo para os estrógenos em estudo. Comparação das extrações nas concentrações $5\mu\text{g g}^{-1}$ para E3 no sistema UV 200nm (Figura 14a), $5\mu\text{g g}^{-1}$ para E1 e 200ng g^{-1} para E2 no sistema FLU 230nm excitação, 306nm emissão (figura 14b) com testemunhas no sistema UV (Figura 14c) e FLU (Figura 14d).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 - Seletividade da MSPD em solo com esterco para os estrógenos em estudo. Comparação das extrações nas concentrações $5\mu\text{g g}^{-1}$ para E3 no sistema UV 200nm (Figura 15a), $5\mu\text{g g}^{-1}$ para E1 e 200ng g^{-1} para E2 no sistema FLU 230nm excitação, 306nm emissão (figura 15b) com testemunhas no sistema UV (Figura 15c) e FLU (Figura 15d).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Observou-se nas Figuras 14 e 15 a ausência de picos interferentes com mesmos tempos de retenção dos analitos em estudo. Assim, o método proposto foi considerado seletivo para a determinação dos estrógenos nas matrizes solo e solo com esterco.

Efeito de matriz: Como em toda técnica analítica, grande parte dos problemas de interferência deste tipo é resultado de amostras pouco homogêneas. Essa interferência denominada efeito de matriz é avaliada comparando-se os coeficientes

angulares das curvas analíticas preparadas na matriz com os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas em solvente, sendo que, se o resultado for acima de 10% em relação aos seus coeficientes angulares, considera-se que existe o efeito de matriz, podendo influenciar nos dados analíticos quantitativos da amostra (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; apud TOLEDO NETTO, 2009). O efeito de matriz é avaliado pela redissolução de extratos os quais foram submetidos a todas as etapas do processo de extração até o procedimento de secagem com fluxo de N₂, em que posteriormente foram redissolvidos em padrões correspondentes as concentrações intermediárias da faixa linear do intervalo de trabalho. Assim verifica-se se a matriz exerce algum efeito sobre os resultados das análises. Todas as análises foram feitas em triplicata acompanhadas de injeções em triplicata da curva analítica do dia no solvente acetonitrila. As equações, bem como seus coeficientes de correlação podem ser visualizadas na Tabela 10.

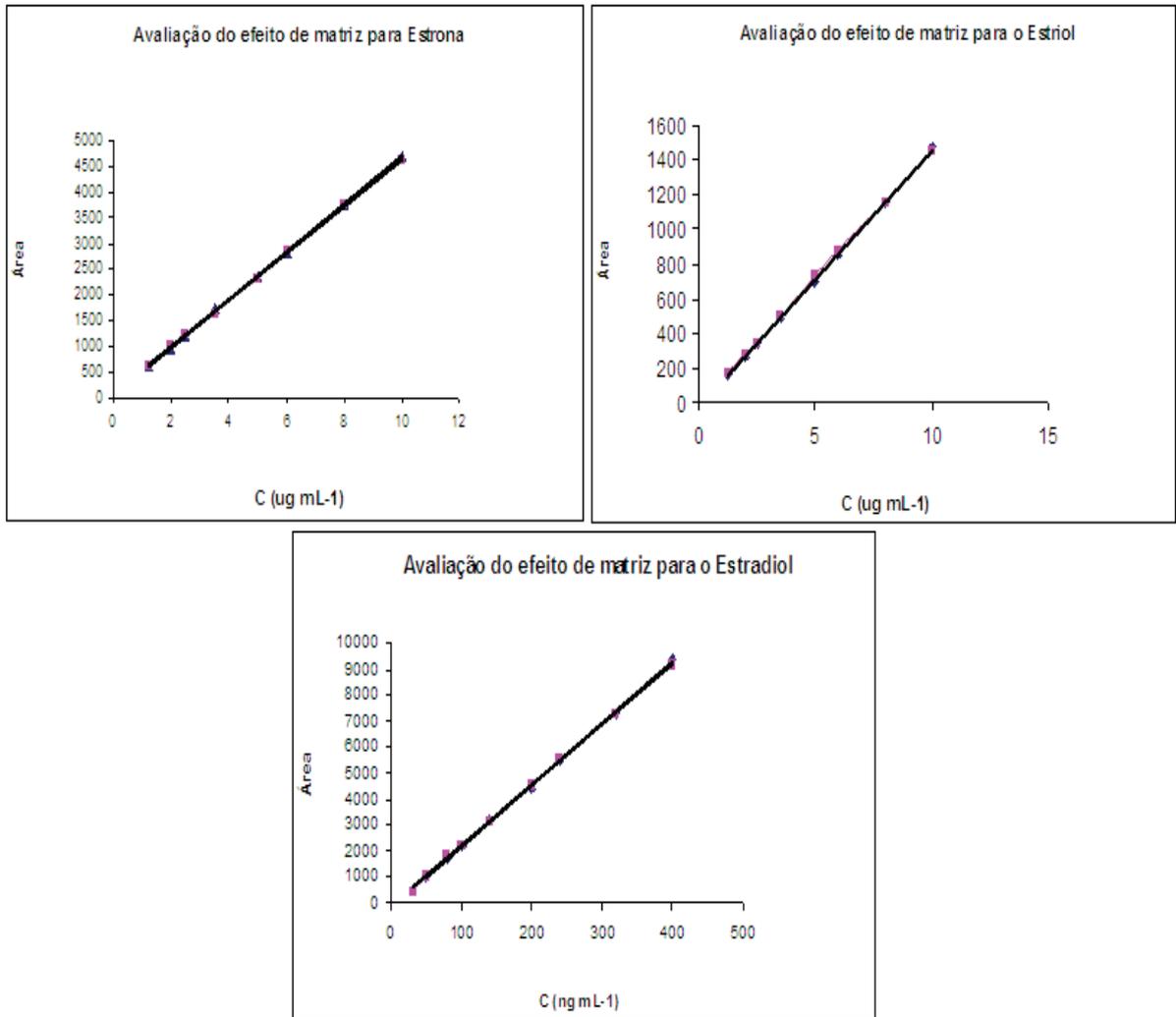
Tabela 10 - Equações das curvas analíticas dos estrógenos em acetonitrila, solo e solo com esterco com respectivos coeficientes de correlação (HPLC UV/FLU, Varian 920).

| Hormônio | Curva analítica em solvente (acetonitrila) | R ² | Curva analítica na matriz (solo) | R ² | Curva analítica na matriz (solo com esterco) | R ² |
|----------|--|----------------|----------------------------------|----------------|--|----------------|
| E3/UV | $y = 149,2x - 33,78$ | 0,999 | $y = 147,3x - 16,44$ | 0,999 | $y = 148,9x - 13,03$ | 0,995 |
| E1/FLU | $y = 467,3x + 26,96$ | 0,999 | $y = 462,2x + 37,63$ | 0,999 | $y = 459,8x + 15,67$ | 0,997 |
| E2/UV | $y = 23,66x - 201,2$ | 0,999 | $y = 23,36x - 156,1$ | 0,999 | $y = 23,39x - 195,4$ | 0,995 |

Fonte: Elaborado pelo autor.

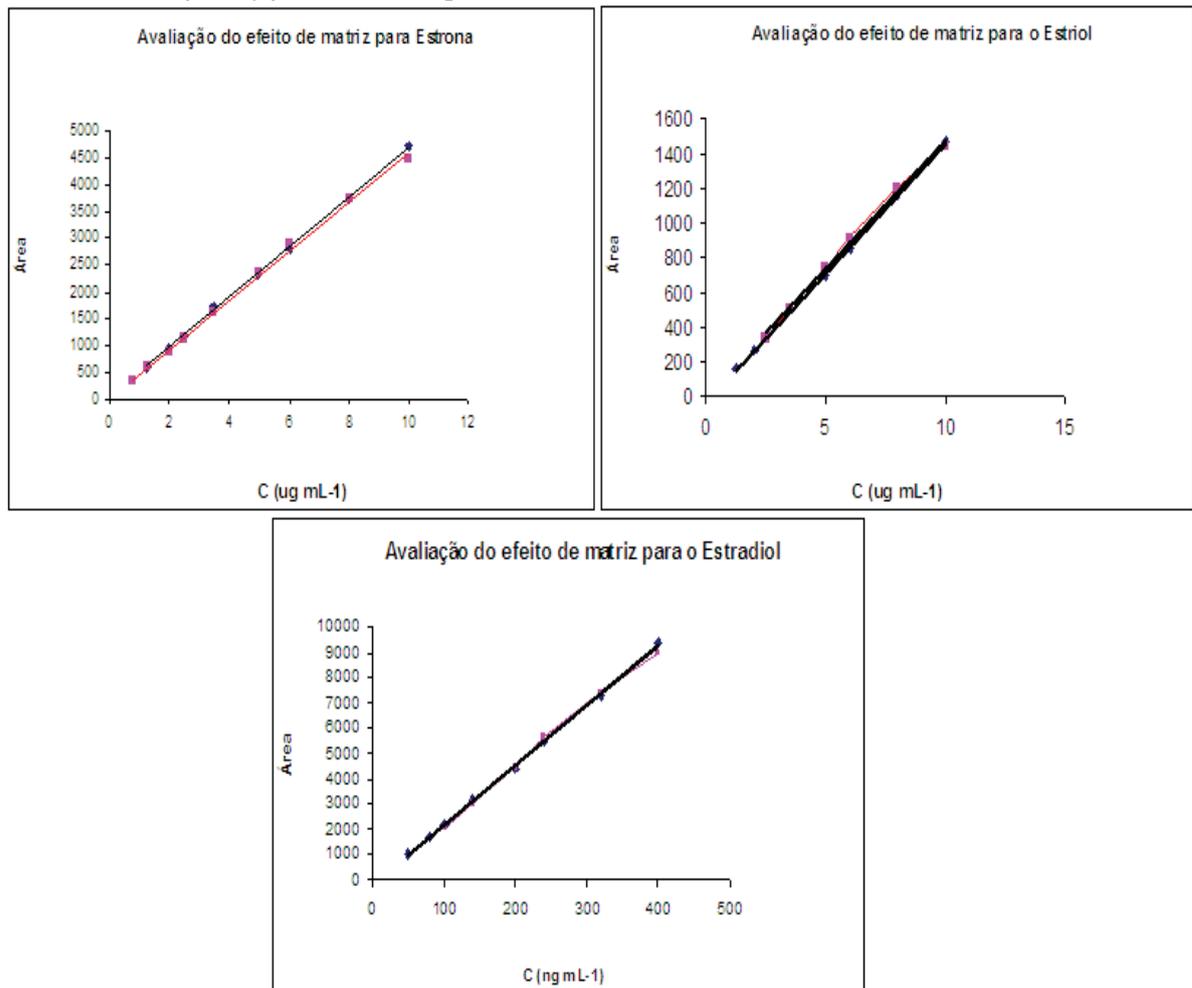
Nas Figuras 16 e 17 estão ilustradas as curvas de calibração referentes aos resultados da avaliação do efeito de matriz da Tabela 10, comparando-se as curvas analíticas preparadas nas matrizes solo e solo com esterco com as curvas analíticas no solvente acetonitrila.

Figura 16 - Curvas analíticas na matriz solo (em rosa) e no solvente ACN (em preto) para os estrógenos em estudo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17 - Curvas analíticas na matriz solo com esterco (em rosa) e no solvente ACN (em preto) para os estrógenos em estudo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Como se observa na Tabela 10 e nas Figuras 16 e 17 pode-se afirmar que não houve efeito de matriz em ambas as matrizes para os analitos estudados, pois a diferença entre seus coeficientes angulares foi inferior a 10%, não sendo necessário, portanto, a avaliação das recuperações na curva da matriz.

4.4.4 Determinação dos limites de detecção (LD_m) do método da dispersão de matriz em fase sólida na extração solo e solo com esterco.

Os limites de detecção do método são determinados de acordo com a proposta de Thier e Zeumer, (1987). De acordo com o autor, o limite de detecção do

método pode ser estimado utilizando-se os resultados obtidos para o menor nível de recuperação estudado.

$$LD = \frac{2 \times t_{n,95\%} \times s_{com}}{S} \quad s_{com} = \sqrt{\frac{(m-1)s_A^2 + (n-1)s_B^2}{m+n-2}}$$

sendo:

s_A - desvio padrão estimado a partir do estudo de recuperação com o menor nível de fortificação;

s_B - desvio padrão obtido com a aplicação do método à amostra controle (amostra testemunha);

m - número de repetições da aplicação do método à amostra com menor nível de fortificação;

n - número de repetições da aplicação do método à amostra controle;

s_{com} - a estimativa do desvio padrão combinado;

S - a sensibilidade do equipamento para o analito;

$t_{n,95\%}$ - o valor tabelado em função do número de análises.

Os dados obtidos para os limites de detecção e de quantificação para o método da dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) na extração solo e solo com esterco estão expressos na Tabela 11.

Tabela 11- Limites de detecção para o método da dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) na extração solo e solo com esterco.

| Hormônio | LD ($\mu\text{g g}^{-1}$) solo | LD ($\mu\text{g g}^{-1}$) solo com esterco |
|-----------------|--|--|
| E3 | 1,47 | 1,12 |
| E2 | 0,03 | 0,05 |
| E1 | 1,45 | 1,11 |

Fonte: Elaborado pelo autor.

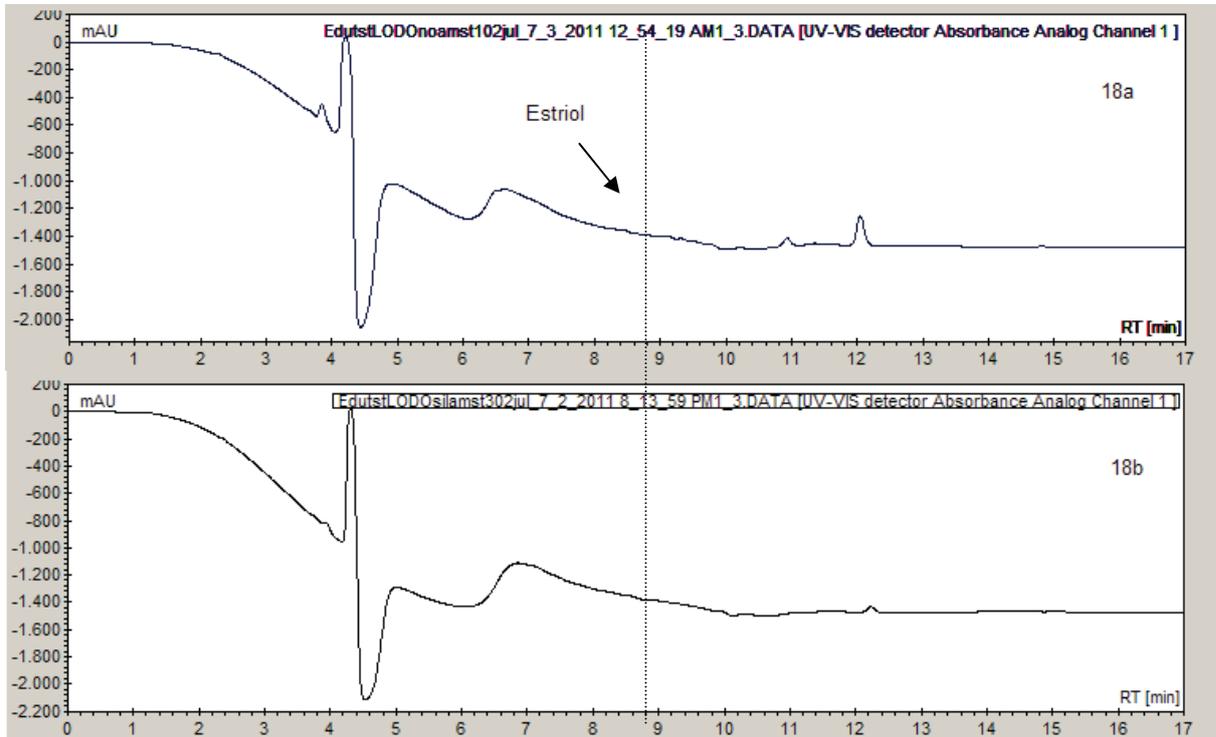
Embora tenha apresentado para os analitos estrona (E1) e estriol (E3) resultados acima das concentrações encontradas em outros trabalhos, os limites estão dentro da faixa esperada, levando-se em conta o trabalho abordar a proposta do método de Thier e Zeumer (1987), considerado um método mais adequado em relação a outros métodos na literatura (IUPAC, método visual), pois corrige variações do branco e da amostra no menor nível de fortificação, como por exemplo, impurezas de solventes e reagentes, ruídos do instrumento e resíduos coextraídos (TOLEDO-NETTO, 2009).

4.5 Aplicação do método proposto às amostras solo com lodo de esgoto.

4.5.1 Avaliação preliminar da dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) na extração solo com lodo de esgoto.

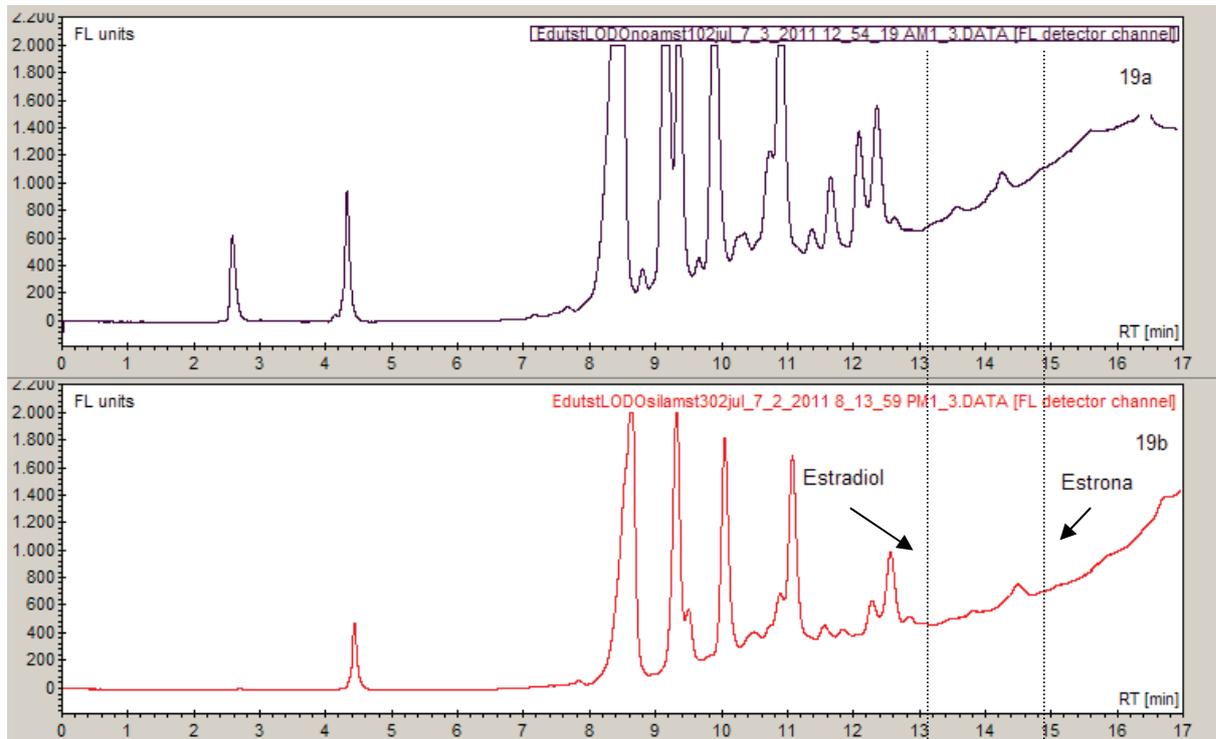
Para avaliar a eficiência da extração do método da dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) a matriz solo com lodo de esgoto, foi realizado o estudo do método anteriormente otimizado e validado à essa matriz. Para viabilizar a análise nessa matriz, alterações no método mostraram-se necessárias, buscando introduzir uma etapa de *clean-up*, com a adição de 1g do composto sílica-gel no cartucho de extração, devido à alta complexidade dessa matriz e a característica da sílica em reter possíveis compostos polares indesejáveis presentes. Realizou-se a análise de duas amostras testemunhas sem e com a presença da sílica, comparando-se assim a sua eficiência, como se observa nas Figuras 18 e 19.

Figura 18 - Comparação entre cromatogramas da MSPD para a amostra testemunha solo com lodo no sistema HPLC/UV em 200nm sem (Figura 18a) e com (Figura 18b) a adição de 1g de sílica.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19 - Comparação entre cromatogramas da MSPD para a amostra testemunha solo com lodo no sistema HPLC/Fluorescência em excitação 230nm emissão 306nm sem (Figura 19a) e com (Figura 19b) a adição de 1g de sílica.



Fonte: Elaborado pelo autor.

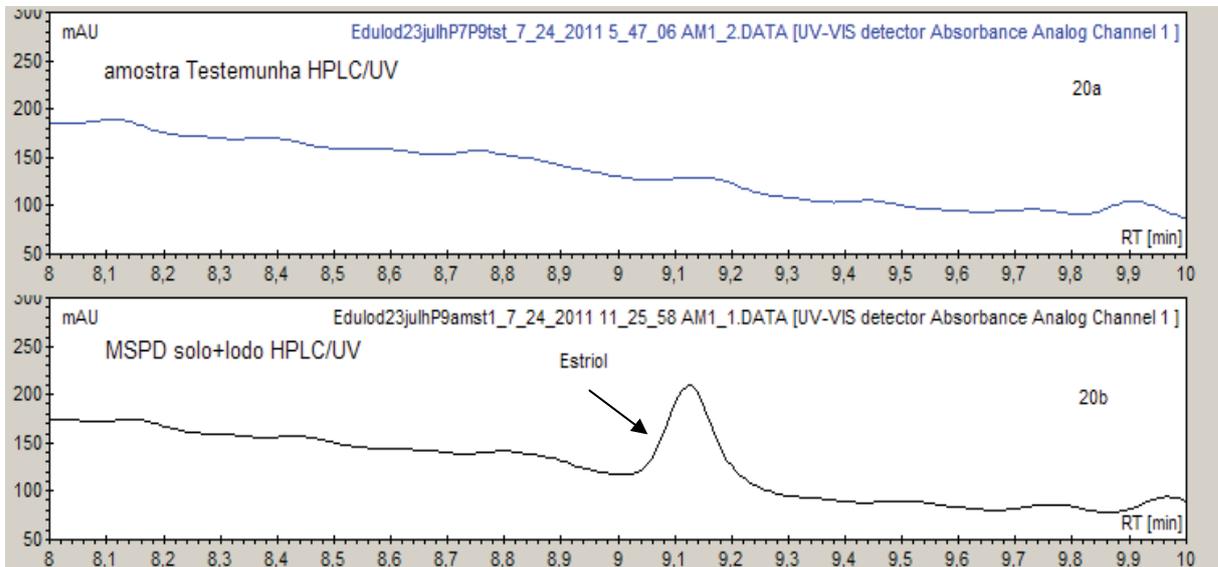
Conforme comprovado pelos cromatogramas obtidos nas Figuras 18 e 19, a presença da sílica resultou em menor número de interferentes nas análises. Ela ilustra também a importância da etapa de *clean-up* na remoção de substâncias interferentes, quando presentes.

Diante disso, o prosseguimento das análises se deu com o uso da sílica.

4.5.2 Avaliação da seletividade e do efeito de matriz ao método da dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) na extração solo com lodo de esgoto.

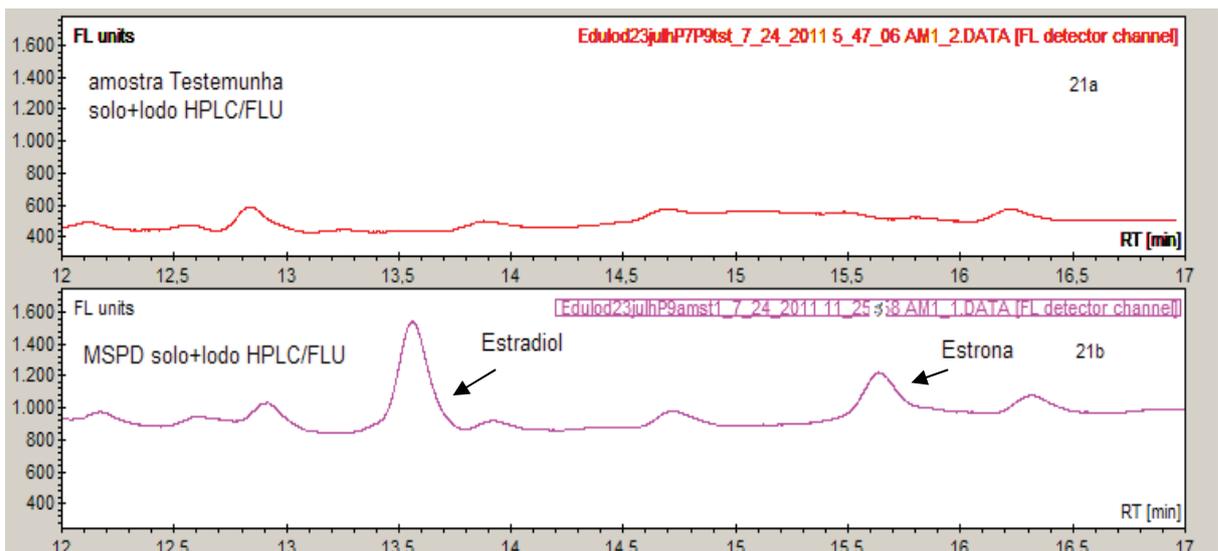
A continuidade do estudo se deu através da avaliação da seletividade e do efeito de matriz nas análises solo com lodo como anteriormente sumarizado no item 4.4.3 para solo e solo com esterco. As Figuras 20 e 21 ilustram os resultados para a seletividade, já a Tabela 12 e a Figura 22 ilustram os resultados para o efeito de matriz.

Figura 20 - Seletividade da MSPD em solo com lodo para os estrógenos em estudo. Comparação entre cromatogramas da amostra testemunha (Figura 20a) com extrações na concentração $5\mu\text{g g}^{-1}$ para E3 no sistema UV 200nm (Figura 20b).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21 - Seletividade da MSPD em solo com lodo para os estrógenos em estudo. Comparação entre cromatogramas da amostra testemunha (Figura 21a) com extrações na concentração $5\mu\text{g g}^{-1}$ para E1 e 200ng g^{-1} para E2 (Figura 21b) no sistema FLU 230nm excitação, 306nm emissão.



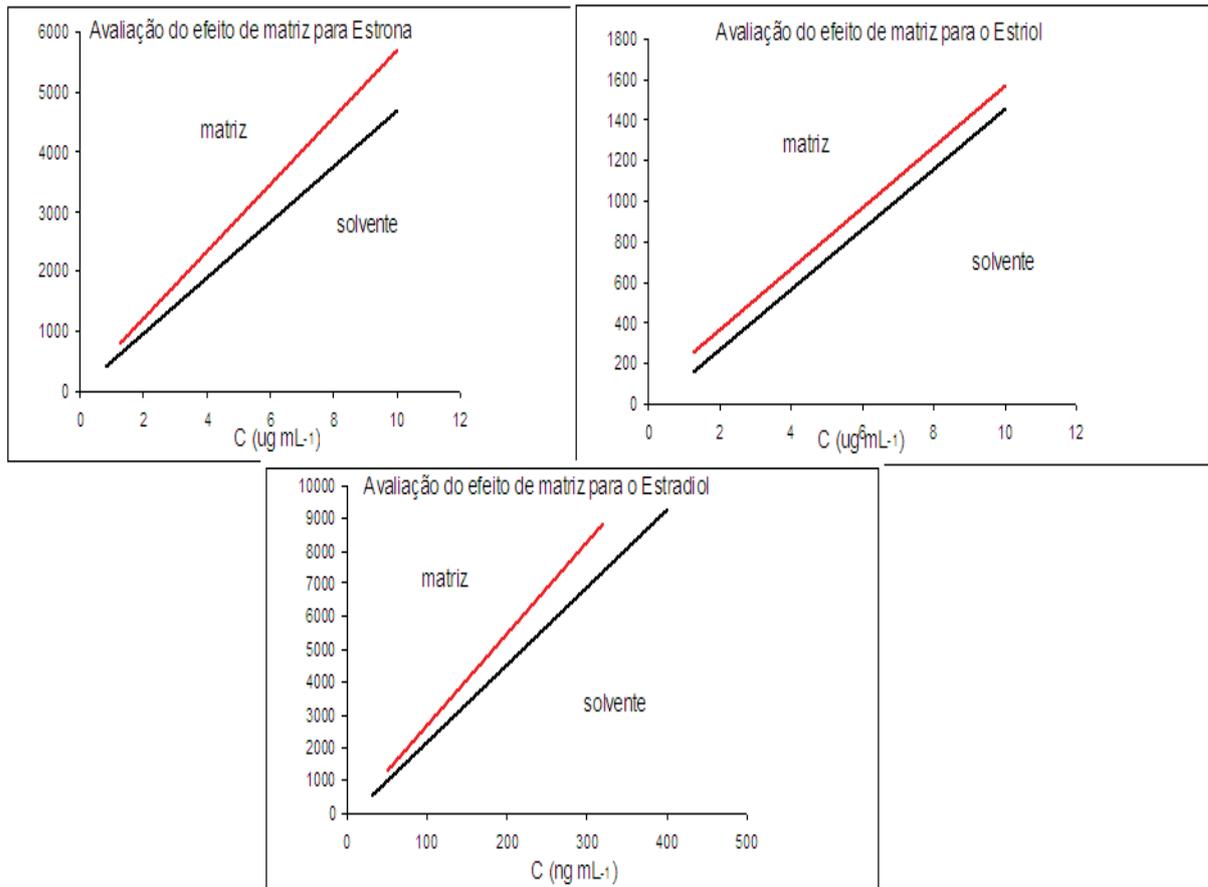
Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 12 - Equações das curvas analíticas dos estrógenos em acetonitrila e na matriz solo com lodo com os respectivos coeficiente de correlação

| Hormônio | Curva analítica em solvente (acetonitrila) | R ² | Curva analítica na matriz (solo com lodo) | R ² |
|----------|--|----------------|---|----------------|
| E3 | $y = 147,2x - 7,259$ | 0,999 | $y = 150,7x + 62,84$ | 0,999 |
| E1 | $y = 534,2x - 63,83$ | 0,997 | $y = 505,5x - 5,095$ | 0,994 |
| E2 | $y = 31,14x - 402,6$ | 0,995 | $y = 28,08x - 113,5$ | 0,999 |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22 - Curvas analíticas na matriz solo com lodo (em vermelho) e no solvente (em preto) para os estrógenos em estudo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Observou-se nas Figuras 20 e 21 a ausência de picos interferentes com mesmos tempos de retenção dos analitos em estudo. Assim, o método proposto foi considerado seletivo para a determinação dos estrógenos na matriz solo com lodo.

Através da Figura 22, nota-se que embora tenha ocorrido uma pequena variação no coeficiente angular das curvas analíticas, não houve efeito de matriz pronunciado para nenhum dos analitos nessa matriz.

4.5.3 Avaliação da Precisão e Exatidão do método da dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) na extração solo com lodo de esgoto.

A avaliação da precisão e exatidão se deu da mesma forma como para as análises em solo e solo com esterco anteriormente sumarizado no item 4.4.1. Os resultados obtidos das amostras enriquecidas estão ilustrados na Tabela 13.

Tabela 13 - Recuperação e CV para dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), em solo com lodo enriquecido com solução padrão (n=3).

| Hormônio | Nível 1 ($\mu\text{g g}^{-1}$) | Rec média (%) | CV (%) | Nível 2 ($\mu\text{g g}^{-1}$) | Rec média (%) | CV (%) | Nível 3 ($\mu\text{g g}^{-1}$) | Rec média (%) | CV (%) |
|----------|-------------------------------------|---------------------|-----------|-------------------------------------|---------------------|-----------|-------------------------------------|---------------------|--------|
| E1 | 2,5 | 59 | 5 | 5,0 | 62 | 3 | 8,0 | 58 | 8 |
| E2 | 0,1 | 62 | 2 | 0,2 | 67 | 1 | 0,3 | 59 | 4 |
| E3 | 2,5 | 57 | 1 | 5,0 | 60 | 1 | 8,0 | 52 | 1 |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Empregando como critério a obtenção de recuperações nos intervalos aceitáveis entre 50 a 120%, com precisão < 20% dependendo da complexidade analítica e da amostra (RIBANI et al., 2004), nota-se que o método da MSPD apresentou bons resultados. Conforme as condições previamente sumarizadas no item 4.4.1, também se estabelece que o limite de quantificação do método na matriz solo com lodo foi de $2,5\mu\text{g g}^{-1}$ para os analitos estriol (E3) e estrona (E1) e $0,1\mu\text{g g}^{-1}$ para o estradiol (E2), uma vez que para os objetivos do projeto em que este trabalho está inserido os valores foram considerados aceitáveis.

4.5.4 Determinação dos limites de detecção (LD_m) do método da dispersão de matriz em fase sólida na extração para solo com lodo.

A avaliação dos limites de detecção (LD_m) se deu da mesma forma como para as matrizes solo e solo com esterco já sumarizado no item 4.4.4. Os resultados obtidos estão ilustrados na Tabela 14.

Tabela 14 - Limites de detecção para o método da dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) na extração solo com lodo

| Hormônio | LD ($\mu\text{g g}^{-1}$) solo com lodo |
|-----------------|---|
| E3 | 2,10 |
| E2 | 0,05 |
| E1 | 1,62 |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Embora tenha apresentado para os analitos estrona (E1) e estriol (E3) resultados acima das concentrações encontradas em outros, os limites estão dentro da faixa esperada levando-se em conta o trabalho abordar a proposta do método de Thier e Zeumer (1987), considerado um método mais adequado em relação a outros métodos na literatura (IUPAC, método visual), pois corrige variações do branco e da amostra no menor nível de fortificação, como por exemplo, impurezas de solventes e reagentes, ruídos do instrumento e resíduos coextraídos (TOLEDO NETTO, 2009).

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nas análises efetuadas, pôde-se concluir que:

- O sistema HPLC/UV, embora tenha solucionado o problema de identificação do estrógeno estriol (E3), apresentou menor resposta em relação ao sistema HPLC/FLU para a análise dos analitos;

- No processo de otimização da dispersão da matriz em fase sólida (MSPD), os parâmetros que apresentaram melhores resultados foram: 1,0g da matriz, 0,5g do sorbente e 20 mL do solvente de eluição;

- O método da dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) mostrou-se aplicável para os três analitos de interesse no intervalo de trabalho, mostrando ser um método simples, rápido, útil e menos oneroso para extração nas matrizes solo, esterco e lodo de esgoto;

- O método do banho de ultrassom seguido de extração em fase sólida (SPE) não apresentou resultados favoráveis para nenhum dos estrógenos, sendo necessárias alterações na etapa de extração por solventes no ultrassom, visando a validação desse método para as matrizes sólidas.

6 ESTUDOS FUTUROS

Para dar continuidade a esse estudo se faz necessário avaliar:

-Desenvolvimento de estudos envolvendo o método do banho de ultrassom seguido de extração em fase sólida (SPE) para a determinação dos estrógenos em solo, solo com esterco e solo com lodo, visando a validação do método para essas matrizes sólidas.

REFERÊNCIAS

- 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: 10 nov. 2011.
- BARKER, S. A.; LONG, A. R.; SHORT, C. R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. **Journal of Chromatography**, v. 475, p. 353-361, 1989.
- BARONTI, C.; CURINI, R.; D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; GENTILI, A.; SAMPIRE, R. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. **Environment Science Technology**, v.34, p. 5059-5066, 2000.
- BECK, J.; TOTSCHKE, K. U.; KÖGEL-KNABNER, I. A rapid and efficient determination of natural estrogens in soils by pressurised liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **ScienceDirect**, v. 71, p. 954-960, 2007.
- BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. **A disposição de lodo de esgoto em solo agrícola**. Jaguariúna: EMBRAPA, 2006.
- BILA, D. M. **Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17 β -Estradiol pelo processo de ozonização**. 2005. 281 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, 2005.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.
- BRITO, N. M.; AMARANTE, O. P. J.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 113, p. 129-146, 2003.
- CANAVER, E. G. **Otimização e validação de método cromatográfico para determinação de estradiol e estrona em solo tratado com esterco animal**. 2008. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.
- CASEY, F. X. M.; LARSEN, G. L.; HAKK, H.; SIMUNEK, J. Fate and transport of 17 β -Estradiol in soil-water systems. **Environment Science Technology**, v. 37, p. 2400-2409, 2003.

COLLINS, C. H.; SILVA, C. G. A. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.

COMBALBERT, S.; HERNANDEZ-RAQUET, G. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 1671-1692, 2010.

D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; GENTILI, A.; MANCINI, R.; MASTROPASQUA, R.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. **The Science of the Total Environment**, v. 302, p. 199-209, 2003.

DASTON, G. P.; GOOCH, J. W.; BRESLIN, W. J.; SHEREY, D. L.; NIKIFOROV, A. I.; FICO, T. A.; GORSUCH, J. W. Environmental estrogens and reproductive health: a discussion of the human and environmental data. **Reproductive Toxicology**, v. 11, n. 4, p. 465-481, 1997.

DÓREA, H. S.; LOPES, W. G. Aplicação da técnica de dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) na análise de pesticidas em quiabo por CG-EM. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 892-896, 2004.

DRAY, J.; DRAY, F.; TILLER, F.; ULMAN, A. Hydrolysis of urine metabolites of different steroid hormones by β -glucuronidase of *Escherichia coli*. **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 123, p. 853-857, 1972.

EMMERIK, T. V.; ANGOVE, M. J.; JOHNSON, B. B.; WELLS, J. D.; FERNANDES, M. B. Sorption of 17 β -estradiol onto selected soil minerals. **Jornal of Colloid And Interface Science**, v. 266, p. 33-39, 2003.

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: 05 nov. 2011.

EUROPEAN COMMISSION ENVIRONMENT. **What is the endocrine system?** Disponível em:

<http://ec.europa.eu/environment/endocrine/definitions/index_en.htm>. Acesso em: 10 nov. 2011.

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.

FONTENELE, E. G. P.; MARTINS, M. R. A.; QUIDUTE, A. R. P.; MONTENEGRO JÚNIOR, R. M. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, n.1, p. 6-16, 2010.

GABET, V.; MIÈGE, C.; BADOS, P.; COQUERY, M. Analysis of estrogens in environmental matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1113-1131, 2007.

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

GOMES, R. L.; AVCIOGLU, E.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. Steroid estrogen determination in sediment and sewage sludge: a critique of sample of preparation and chromatographic/mass spectrometry considerations, incorporating a case study in method development. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p. 737-744, 2004.

GUILLETTE JUNIOR, L. 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, 1996.

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

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. Suppl. 4.

KJÆR, J.; OLSEN, P.; BACH, K.; BARLEBO, H. C.; INGINGERSLEV, F.; HAN SEM, M.; SØRENSEN, B. H. Leaching of estrogenic hormones from manure-treated structured soils. **Environmental Science Technology**, v. 41, p. 3911-3917, 2007.

KUSTER, M.; DE ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, D. Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 10-11, 2004.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: Rima, 2004. 96 p.

LANGE, I. G.; DAXENBERGER, A.; SCHIFFER, B.; WITTERS, H.; IBARRETA, D.; MEYER, H. H. D. Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment. **Analytica Chimica Acta**, v. 473, p. 27-37, 2002.

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.

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.

NIETO, A.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ, R. M. Determination of natural and synthetic estrogens and their conjugates in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1213, p. 224-230, 2008.

OLIVEIRA, P. R. **Calorimetria exploratória diferencial: análise térmica aplicada ao desenvolvimento de formulações**. Disponível em: < www.fasul.edu.br/pasta_professor/download=8138_dsc.pdf >. Acesso em: 15 jan. 2012.

PETERSON, E. W.; DAVIS, R. K.; ORNDORFF, H. A. 17 β -estradiol as an indicator of animal waste contamination in mantled karst aquifers. **Jornal Environment Quality**, v. 34, p. 826-829, 2001.

RA, J. S.; OH, S. Y.; LEE, B. C.; KIM, S. D. The effect of suspended particles coated by humic acid on the toxicity of pharmaceuticals, estrogens, and phenolic compounds. **ScienceDirect**, v. 34, p. 184-192, 2008.

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

REIS FILHO, R. W.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 817-822, 2006.

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.

SANDOR, T.; MEHDI, A. E. Steroids and evolution. In: BARRINGTON, J. (Ed.). **Hormones and evolution**. New York: Academic Press, 1979. p. 1-72.

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

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, 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: 11 nov. 2011.

STANFORD, B. J.; WEINBERG, H. S. Isotope dilution for quantitation of steroid estrogens and nonylphenols by gás chromatography with tandem mass spectrofotometry in septic, soil and grondwater matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1176, p. 26-36, 2007.

STEINER, L.; BIDWELL, V.; DI, H.; CAMERON, K.; NORTHCOTT, G. Transport and modeling of estrogenic hormones in a dairy farm effluent through undisturbed soil lysimeters. **Environment Science Technology**, v. 44, p. 2341-2347, 2010.

STRECK, G. Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, p. 635-652, 2009.

THIER, H. P.; ZEUMER, H. **Manual of pesticide residue analysis**. New York: Verlag Chemie, 1987. v. 1, p. 37-41.

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.

TSO, J.; DUTTA, S.; INAMDAM, S.; AGA, D. S. Simultaneous analysis of free and conjugated estrogens, sulfonamides, and tetracyclines in runoff water and soils using solid phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2213-2222, 2011.

UNITED STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analisys**, n. EPA/630/R-96/012. Washington, DC, 1997.

VIEIRA, E.; LICHTIG, J. Validação de métodos cromatográficos em análise de resíduos de pesticidas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, p.1-749, 2004.

XU, J.; WU, L.; CHEN, W.; CHANG, A. Simultaneous determination of pharmaceuticals, endocrine disrupting compounds and hormone in soils by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1202, p. 189-195, 2008.

WANG, S.; HUANG, W.; FANG, G.; ZHANG, Y.; QIAO, H. Analysis of steroidal estrogen residues in food and environmental samples. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 88, n. 1, p. 1-25, 2008.

WARNER, I. M.; SHELLY, D. C.; KARLESKY, D. A study of polynuclear aromatic hydrocarbons on an amino bonded phase liquid chromatographic column in the normal and reversed phase. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 6, p. 471-495, 1983.

WEBER, S.; LEUSCHNER, P.; KAMPFER, P.; DOTT, W.; HOLLENDER, J. Degradation of estradiol and ethinyl estradiol by activated sludge and by a defined mixed culture. **Applied Microbial and Cell Physiology**, v. 67, p. 106-112, 2004.

WENDLANDT, W. W. M. **Thermal analysis**. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 1986. v. 19, p. 137-460.

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

ZANG, Z.; RHIND, S. M.; KERR, C.; OSPREY, M.; KYLE, C. E. Selective pressurized liquid extraction of estrogenic compounds in soil and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 685, p. 29-35, 2010.

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: 10 ago. 2010.