

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

SHEISA FIN DANTAS SIERPINSKI

ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE ESTROGÊNIOS E DE SUAS INTERAÇÕES  
COM SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

PONTA GROSSA  
2015

SHEISA FIN DANTAS SIERPINSKI

ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE ESTROGÊNIOS E DE SUAS INTERAÇÕES  
COM SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

Dissertação apresentada para a obtenção  
do título de Mestre em Química Aplicada no  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Aplicada da Universidade Estadual de  
Ponta Grossa.

Orientadora: Profa Dra Elizabeth W. O.  
Scheffer

PONTA GROSSA  
2015

**Ficha Catalográfica**  
**Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG**

Sierpinski, Sheisa Fin Dantas  
S571      Estudo do comportamento de estrogênios  
            e de suas interações com substâncias  
            húmicas/ Sheisa Fin Dantas Sierpinski.  
            Ponta Grossa, 2015.  
            75f.

            Dissertação (Mestrado em Química  
            Aplicada - Área de Concentração: Química),  
            Universidade Estadual de Ponta Grossa.  
            Orientadora: Profª Drª Elizabeth W. O.  
            Scheffer.

            1.Substâncias húmicas. 2.Interferentes  
            endócrinos. 3.Espectroscopia. I.Scheffer,  
            Elizabeth W. O.. II. Universidade  
            Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em  
            Química Aplicada. III. T.

CDD: 628.5

**TERMO DE APROVAÇÃO**

**SHEISA FIN DANTAS SIERPINSKI**

**“ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE ESTROGÊNIOS E DE SUAS  
INTERAÇÕES COM SUBSTÂNCIAS HÚMICAS.”**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientador:

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elizabeth Weinhardt de Oliveira Scheffer  
UEPG/PR

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Danielle Caroline Schnitzler  
UTFPR /PR

  
Prof. Dr. Adriano Gonçalves Viana  
UEPG/PR

**Ponta Grossa, 27 de fevereiro de 2016.**

Dedicado a  
ADHEMAR SIERPINSKI,  
ÂNGELA CRISTINA F. D. SIERPINSKI e  
ADHEMAR SIERPINSKI JR.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus.

Aos meus pais Adhemar e Ângela, que estiveram ao meu lado me apoiando e incentivando em cada momento com amor, dedicação, paciência e muita força.

Ao meu irmão Junior, pela amizade, apoio e pelos momentos de “férias”.

À Profa. Dra. Elizabeth Weinhardt de Oliveira Scheffer, pela contribuição, pelo entusiasmo e por não poupar esforços na realização deste trabalho, pelo conhecimento compartilhado e orientação no mesmo.

Aos meus amigos que de alguma forma fizeram-se presentes, na elaboração desde trabalho.

Aos meus amigos de laboratório Vitor e Aline, pelos momentos de descontração durante as corridas cromatográficas e por sua ajuda.

À Profa. Dra. Elenise Sauer e ao Prof. Dr. Ciro Maurício Zimmermann pelo apoio institucional da UTFPR neste trabalho.

Ao Técnico de Laboratório da UEPG Valdeci Souza de Almeida, por toda ajuda.

Aos meninos da “Borracharia” pela ajuda nas gambiarras.

A todos do complexo de laboratórios multiusuários da UEPG (CLABMU), em especial à Bárbara, Josiane e Simone.

À coordenação do Programa de Pós Graduação em Química Aplicada da UEPG e todo seu corpo docente.

À CAPES pela bolsa concedida.

***“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”***  
**(Madre Teresa de Calcutá)**

## RESUMO

Os micropoluentes orgânicos são substâncias que mesmo presentes em pequenas concentrações, são capazes de desencadear efeitos sobre os sistemas em que são introduzidos, destacando-se, dentre eles, os chamados interferentes endócrinos (IEs). Os IEs são substâncias capazes de interferir nas funções do sistema endócrino, causando efeitos adversos a um organismo ou a sua prole. Hormônios sexuais naturais e sintéticos são potentes IEs e têm sido detectados em ambientes aquáticos em todos os continentes, principalmente em função da inexistência ou deficiência nos processos de tratamento de esgotos. Substâncias húmicas (SH) são os principais compostos capazes de interagir com micropoluentes orgânicos como os hormônios, interferindo nos processos de biodisponibilidade para o ambiente. Estudos usando SH como complexante de hormônios têm sido realizados utilizando-se a cromatografia como método de quantificação. Porém, existem poucos estudos de métodos alternativos para a quantificação de hormônios estrógenos. O objetivo deste trabalho foi validar e adaptar uma metodologia para estudar estrona (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2) e 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) e estudar suas interações com substâncias húmicas empregando-se espectroscopia de absorção molecular Ultravioleta-Visível para quantificação desses hormônios. Este método é baseado na diazotação da sulfanilamida com nitrito de sódio, seguida da reação de acoplamento com o hormônio. Foi possível estabelecer curva analítica para concentrações na faixa de 10,0 a 28,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  que apresentou linearidade, exatidão e precisão adequadas. Apesar do método espectroscópico não ser seletivo, o mesmo apresentou resultados compatíveis com a cromatografia, o que comprova sua adequação para os estudos de bancada realizados nesse trabalho. Para realizar um comparativo entre os métodos, empregou-se a cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando-se metanol e água como fase móvel e cartucho C-18 como fase estacionária. Para o estudo de interação utilizou-se as amostras padrões dos hormônios em estudo e solução de ácido húmico, sob agitação constante e coletas realizadas no período máximo de 48 horas. A redução na concentração dos estrogênios no meio de estudo, quando em presença de SH foi detectada desde o início do processo. Para todos os casos, observou-se um aumento na remoção do hormônio com o aumento do tempo de contato. Ao aumentar-se a concentração de SH, observou-se um aumento na complexação dos estrogênios E2, e EE2 sendo que o hormônio EE2 foi o que apresentou os melhores resultados de complexação com a SH nas condições estudadas. Na alíquota retirada do sistema, após 48 horas de agitação, removeu-se 51,1% (10,22  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em presença de 10,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de SH e 75,8% (15,16  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As simulações permitem prever o comportamento dos hormônios em ambientes aquáticos naturais ricos em SH, nos quais essa interação pode reduzir a disponibilidade para a biota e assim, a absorção e os efeitos orgânicos.

**Palavras-Chave:** Substâncias húmicas. Interferentes endócrinos. Espectroscopia UV-Vis.

## ABSTRACT

Organic micropollutants are substances that present even in small concentrations, are capable of triggering effects on systems where it is introduced, highlighting, among them the so-called endocrine disruptors (EDs). The EDs are substances that can interfere with the functions of the endocrine system, causing adverse effects to an organism or its offspring. Natural and synthetic sexual hormones are potent and EDs have been detected in aquatic environments on all continents, mainly due to the absence or deficiency in wastewater treatment processes. Humic substances (HS) are the main compounds able to interact with organic micropollutants such as hormones, interfering in the processes of bioavailability for the environment. Studies using HS as a complexing hormones have been carried out using the quantification method as chromatography. However, there are few studies of alternative methods for the quantification of estrogen hormones. The objective of this study was to validate and adapt a methodology to study estrone (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2) and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) and study their interactions with humic substances employing molecular absorption spectroscopy Ultraviolet-Visible to quantify these hormones. This method is based on the diazotization of sulfanilamide with sodium nitrite, followed by coupling reaction with the hormone. Be established analytical curve for concentrations in the range from 10.0 to 28.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  which was linear, adequate accuracy and precision. Despite the spectroscopic method is not selective, it presented results compatible with chromatography, which proves their suitability for the bench studies in this work. To perform a comparison between the methods employed to high performance liquid chromatography, using methanol and water as mobile phase and C-18 cartridge as stationary phase. For the study of interaction we used samples patterns of hormones in study and humic acid solution under constant agitation and samples taken within a maximum period of 48 hours. The reduction in the concentration of estrogen in the middle of the study, when in the presence of SH was detected since the beginning of the process. In all cases, we observed an increase in the removal of the hormone with increasing contact time. The reduction in the concentration of estrogen in the middle of the study, when in the presence of HS was detected since the beginning of the process. In all cases, we observed an increase in the removal of the hormone with increasing contact time. By increasing the concentration of HS, there was an increase in the complexation of estrogens E2, and EE2 being that the hormone was EE2 that showed the best results of complexation with HS in the studied conditions. In aliquot removed from the system after 48 hours of stirring, was removed 51.1% (10.22  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) in the presence of 10.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of the HS and 75.8% (15.16  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) at 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The simulations can predict the behavior of E2 and EE2 hormones in natural aquatic environments rich in HS, where this interaction can reduce the availability to the biota and thus the absorption and physiological effects.

**Keywords:** Humic substances. Endocrine disruptors. UV-Vis spectroscopy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura Básica dos Esteróides.....	21
Figura 2	Estrutura básica dos hormônios estrona (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2) e 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2).....	21
Figura 3	Modelo estrutural para o Ácido Húmico.....	26
Figura 4	Solução da reação colorimétrica do E1, E2 e EE2.....	29
Figura 5	Curva analítica para o estrona em comprimento de onda de 480 nm.....	45
Figura 6	Curva analítica para o 17 $\beta$ -estradiol em comprimento de onda de 480 nm.....	45
Figura 7	Curva analítica para o 17 $\alpha$ -etinilestradiol em comprimento de onda de 480 nm.....	46
Figura 8	Cromatograma para E1 e EE2.....	49
Figura 9	Curva analítica para o estrona para o método cromatográfico.....	51
Figura 10	Curva analítica para o 17 $\beta$ -estradiol para o método cromatográfico.....	51
Figura 11	Curva analítica para 17 $\alpha$ -etinilestradiol para o método cromatográfico....	52
Figura 12	Gráfico de transmitância do Ácido Húmico para análise de IV.....	56
Figura 13	Gráfico da interação do E1 com AH durante 48 horas.....	59
Figura 14	Gráfico da interação do E2 com AH durante 48 horas.....	60
Figura 15	Gráfico da interação do EE2 com AH durante 48 horas.....	60
Figura 16	Relação entre a porcentagem de remoção de hormônios com a concentração de Ácido Húmico.....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Excreção diária ( $\mu\text{g}$ ) de $17\beta$ -estradiol, estrona, estriol e $17\alpha$ -etinilestradiol, por seres humanos.....	23
Tabela 2	Quantidade de estrogênios ( $\text{ng L}^{-1}$ ) encontrada em águas superficiais pelo Brasil.....	24
Tabela 3	Preparação das soluções para reação colorimétrica.....	41
Tabela 4	Condições cromatográficas.....	42
Tabela 5	Valores médios de absorvância (A) de E1, E2, e EE2 e desvio padrão com leitura em 480 nm no mesmo dia.....	44
Tabela 6	Ensaio analítico para avaliação da exatidão do método.....	46
Tabela 7	Desvio padrão relativo para a faixa de concentrações de 10 a $28\ \mu\text{g mL}^{-1}$ de E1, E2 e EE2.....	47
Tabela 8	LD e LQ calculado para o E1, E2 e EE2.....	48
Tabela 9	Valores médios da Área ( $\text{mV s}^{-1}$ ) do E1, E2, e EE2 e desvio padrão pelo método cromatográfico.....	50
Tabela 10	Ensaio analítico para avaliação da exatidão do método cromatográfico...	52
Tabela 11	Desvio padrão relativo para a faixa de concentrações de 10 a $30\ \mu\text{g mL}^{-1}$ de E1, E2 e EE2 pelo método cromatográfico.....	53
Tabela 12	Resultados obtidos na análise simultânea de E1, E2 e EE2 por espectroscopia UV-Vis e CLAE.....	54
Tabela 13	Atribuições dos picos observados no espectro de IV do ácido húmico.....	56
Tabela 13	Complexação entre AH e os estrógenos E1, E2 e EE2.....	58

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMD	Concentração Média Determinada
CV%	Coefficiente de Variação
DICLA	Divisão de Acreditação de Laboratórios
DPa	Desvio Padrão do Intercepto com o eixo Y
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
E1	Estrona
E2	17 $\beta$ -estradiol
EE2	17 $\alpha$ -etinilestradiol
EDTA	Etilenodiamina Tetra-acético
ER	Erro Relativo
ETEs	Estações de Tratamento de Esgoto
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEs	Interferentes Endócrinos
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IUPAC	União Internacional da Química Pura e Aplicada
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MO	Matéria Orgânica
PCB's	Bifenilas Policloradas
PET	Politereftalato de etileno

pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotações por Minuto
S <sup>2</sup>	Média dos Quadrados dos Desvios
SHA	Substâncias Húmicas Aquáticas
SH	Substâncias Húmicas
SPE	Extração em Fase Sólida
SPME	Micro-extração em Fase Sólida
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
VR	Variância

## SUMÁRIO

	<b>RESUMO</b> .....	6
	<b>ABSTRACT</b> .....	7
	<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	8
	<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	9
	<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b> .....	10
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1	Justificativa.....	14
1.2	Revisão bibliográfica.....	15
1.2.1	Interferentes Endócrinos.....	17
1.2.1.1	Hormônios Sexuais Femininos.....	20
1.2.2	Interação dos Estrogênios com Substâncias Húmicas.....	24
1.3	Técnica e Seus Fundamentos.....	27
1.3.1	Reação Colorimétrica para Análise UV-VIS.....	29
1.3.2	Validação da metodologia.....	30
1.3.2.1	Linearidade e faixa de aplicação.....	32
1.3.2.2	Exatidão.....	33
1.3.2.3	Precisão.....	34
1.3.2.4	Limite de Detecção (LD) ou sensibilidade.....	35
1.3.2.5	Limite de Quantificação (LQ) ou determinação.....	37
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	39
2.1	Objetivo Geral.....	39
2.2	Objetivos Específicos.....	39
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	40
3.1	Implantação da metodologia.....	40
3.2	Análises por Espectroscopia de Absorção Molecular UV-Vis.....	40
3.2.1	Preparação de Solução Padrão de Estrogênios.....	40
3.2.2	Reação Colorimétrica.....	41

3.2.3	Análises por Espectroscopia de Absorção Molecular dos Hormônios E1, E2 e EE2.....	41
3.3	Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	42
3.4	Análises por espectroscopia no Infravermelho do Ácido Húmico.....	43
3.5	Interações estrogênios-SH.....	43
3.6	Descarte de resíduos.....	43
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
4.1	Processo de Validação.....	44
4.1.1	Linearidade e Faixa de Aplicação.....	44
4.1.2	Exatidão.....	46
4.1.3	Precisão.....	47
4.1.4	Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ).....	48
4.2	Método Cromatográfico.....	48
4.2.1	Linearidade e Faixa de Aplicação.....	50
4.2.2	Exatidão.....	52
4.2.3	Precisão.....	53
4.2.4	Limite de Detecção (LD) e Quantificação (LQ).....	54
4.3	Espectroscopia UV-Vis X Cromatografia.....	54
4.4	Análise espectroscópica do AH empregando Infravermelho.....	55
4.5	Interação entre hormônios estrógenos e SH.....	58
<b>5.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>63</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>64</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Justificativa

A transformação de mananciais como receptores de esgotos sanitários, tratados ou não, têm sido o principal motivo de preocupação acerca da contaminação de águas superficiais em áreas urbanas (RODRIGUEZ-MOZAZ, 2004).

Entre as substâncias contaminantes dos corpos aquáticos, merecem atenção aquelas denominadas “poluentes emergentes”, substâncias químicas antes desconhecidas que passaram a ser detectadas, identificadas e definidas quanto aos riscos que possam causar no meio ambiente, devido ao desenvolvimento de métodos mais sensíveis, ou seja, compostos já utilizados há décadas, mas que foram avaliados e monitorados recentemente (PEDROSO, 2007) e cujas concentrações no ambiente ainda não foram regulamentadas (GHISELLI e JARDIM, 2007). Hormônios são poluentes emergentes que podem agir como desreguladores ou interferentes endócrinos (IEs) e vêm sendo encontrados em compartimentos ambientais, especialmente em águas superficiais, podendo afetar a biota aquática e demais seres que interagem nesse meio.

A presença já detectada de IEs em efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETEs) e, inclusive, em águas superficiais, em concentrações na faixa de  $\text{ng L}^{-1}$  a  $\mu\text{g L}^{-1}$ , pode ser considerada um problema mundial de saúde pública. Entre os IEs incluem-se os estrogênios: estrona (E1),  $17\beta$ -estradiol (E2) e  $17\alpha$ -etinilestradiol (EE2) (FILHO, 2006), cuja presença está relacionada principalmente à ineficiência dos processos de tratamento de efluentes e de esgotos (GHISELLI e JARDIM, 2007). No ambiente aquático, são diversas rotas de degradação e complexação dos IEs, sendo de grande interesse as interações com as substâncias húmicas (SH).

Na literatura científica internacional, diversos métodos analíticos para a quantificação de estrogênios são preconizados utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Contudo, há poucos relatos do uso da espectrofotometria de absorção no ultravioleta visível (UV-vis).

Devido à importância ecotoxicológica dos IEs e suas correlações com possíveis impactos sobre a dinâmica e estrutura das populações animais, acredita-se de extrema importância estudar suas características químicas, suas interações no ambiente aquático, especialmente com SH, bem como buscar metodologias analíticas visando identificar e quantificar sua presença em amostras ambientais.

Com base nisso, o presente trabalho apresenta uma metodologia adaptada para a quantificação dos hormônios estrógenos, por espectroscopia UV-Vis, que visam facilitar estudos de bancada, além de apresentar um estudo sobre a interação entre os hormônios estrógenos com ácido húmico que possam elucidar seu comportamento no meio ambiente.

## **1.2 Revisão Bibliográfica**

Todas as formas de vida existentes em nosso planeta dependem da água. Cada ser humano necessita consumir água doce diariamente para manter-se vivo (BAIRD, 2002).

A disponibilidade de água é um dos fatores mais importantes para a manutenção dos ecossistemas. A água deve conter substâncias essenciais à vida e, ao mesmo tempo, estar isenta de outras que possam produzir efeitos deletérios. Assim, disponibilidade de água significa que ela está presente não somente em quantidade adequada em uma dada região, mas também que sua qualidade seja satisfatória para suprir as necessidades de um determinado conjunto de seres vivos (BRAGA, 2006).

Neste sentido, a preservação dos recursos hídricos constitui um problema complexo mas indispensável no cenário atual, principalmente pelos conflitos de interesse acirrados pela influência de múltiplos usuários. A capacidade de renovação da água depende da manutenção de uma estabilidade física, química e biológica do meio ambiente, além da sazonalidade climática (ANDREOLI, 2005).

O crescimento populacional exacerbado, a falta de planejamento da urbanização e a expansão das atividades agrícolas e industriais que tem ocorrido nas últimas décadas, geraram grandes volumes de resíduos domésticos e efluentes

industriais, muitas vezes dispostos e tratados de maneira incorreta, com um elevado potencial poluente ao ambiente (BOTERO, 2010).

Dentre os muitos poluentes que caracterizam o esgoto doméstico e os resíduos industriais que são lançados de modo indiscriminado no meio ambiente, estão os agrotóxicos, os surfactantes, os fármacos, os corantes têxteis (PETROVIC *et al.*, 2003), sendo relevante o seu monitoramento nos diversos compartimentos ambientais, assim como a realização de estudos que permitam avaliar o comportamento, destino e persistência no meio aquático e terrestre (PERALTA-ZAMORA, 2003).

Em meio a numerosos contaminantes ambientais é possível destacar o grupo dos poluentes emergentes, que mesmo estando presentes em concentrações na faixa de  $\mu\text{gL}^{-1}$  e  $\text{ngL}^{-1}$ , provocam efeitos tóxicos (HALLING - SORENSEN, 2000). Dentro deste contexto, fármacos, hormônios e cianotoxinas merecem destaque, em razão da sua contínua presença em efluentes de ETEs (TERNES *et al.*, 2003).

Poluentes emergentes ou contaminantes emergentes referem-se a qualquer composto químico presente numa variedade de produtos comerciais como medicamentos, produtos de uso veterinário, embalagens de alimentos, produtos de higiene, agrotóxicos, etc., ou ainda qualquer microorganismo, que possa ser encontrado em matrizes ambientais e biológicas, que não são usualmente monitorados ou que ainda não possuem legislação regulatória correspondente, mas que apresentam risco potencial à saúde humana e ao meio ambiente (LA FARRÉ *et al.*, 2008, KUSTER *et al.*, 2008).

Ao contrário dos poluentes orgânicos persistentes (POPs), os poluentes emergentes não necessitam ser persistentes para causar efeitos negativos devido à entrada contínua no ambiente, como resultado de processos industriais, descarte de produtos comerciais ou ainda por sua excreção orgânica na forma metabolizada ou não, lançados diretamente nos corpos d'água ou na rede de esgotos. Também podem ser descartados no solo e sedimentos, o que leva à contaminação de mananciais superficiais por escoamento e aquíferos por infiltração (BARCELÓ, 2003, LÓPEZ *et al.*, 2010 e PETROVICK, 2005).

Entre essas substâncias, estão os hormônios, de importante efeito no sistema endócrino, os quais, em razão da baixa eficiência de remoção apresentada pelos

sistemas convencionais de tratamento de água e esgoto, contaminam águas superficiais e subterrâneas, impactando o meio hídrico e podendo ser considerado um problema de saúde pública (SCHERR *et al*, 2009; BILA e DEZOTTI, 2007; GHISELLY e JARDIM, 2007, CHOW *et al*, 1999, HOEGER *et al*, 2005).

Apesar de possuírem meia-vida relativamente curta quando comparados a outros compostos orgânicos (como alguns pesticidas), os estrógenos são continuamente introduzidos no ambiente, o que lhes concede um caráter de persistência.

A remoção de estrogênios em sistemas de tratamento de esgoto é muito complexa. Nelson *et al*. (2007) verificaram que os tratamentos primário e secundário não foram suficientes para remover desreguladores endócrinos ou traços de substâncias orgânicas como hormônios, fármacos e pesticidas em esgoto doméstico. Porém, as lagoas de estabilização representam uma das principais tecnologias de tratamento de esgotos do Brasil.

### **1.2.1 Interferentes Endócrinos**

Juntamente com o sistema nervoso, um dos principais mecanismos de controle de funções essenciais do organismo de humanos e de outros animais é o sistema endócrino ou hormonal (MOREIRA, 2010).

O sistema endócrino é um mecanismo complexo que coordena e regula a comunicação entre as células, constituído por combinações de glândulas e hormônios, sendo responsável pelas funções biológicas normais, como reprodução, desenvolvimento embrionário, crescimento e metabolismo entre outras (COM, 1999).

Nos seres humanos o sistema endócrino é constituído por um conjunto de glândulas (hipófise, tireóides e paratireóides, timo, supra-renais, pâncreas, testículos e ovários) localizadas em diferentes regiões do corpo, e pelos hormônios por elas sintetizados, tais como a tiroxina, os estrogênios e progestogênios, a testosterona e a adrenalina (BIRKETT, 2003, LINTELMANN, 2003, ANKEY *et al*, 1998).

Hormônios são mensageiros químicos produzidos e secretados pelas glândulas endócrinas, que respondem pela comunicação entre diferentes tipos de células, as quais identificam os hormônios através de receptores que são estruturas proteicas especializadas em reconhecimento molecular (MASTERS, 2001). Depois da aproximação e interação (hormônio-receptor) ocorre uma série de reações bioquímicas, levando a respostas biológicas específicas.

Quando lançadas na corrente sanguínea, coordenam o funcionamento do organismo como um todo. Algumas funções que controlam são: atividades de órgãos, níveis de sais, açúcares e lípidos no sangue, o uso e armazenamento de energia, o crescimento e o desenvolvimento de um determinado organismo, sua reprodução, suas características sexuais, etc (JARDIM, 2007).

Atualmente existem várias substâncias químicas suspeitas de causar danos ao sistema endócrino, e as mesmas são conhecidas como Interferentes Endócrinos (IEs). Muitas definições têm sido usadas pelos pesquisadores, mas a mais difundida é a definição dada pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), segundo a qual, IEs são agentes exógenos que interferem na síntese, secreção, transporte, recepção, ação, ou eliminação dos hormônios naturais do corpo, que são responsáveis pela manutenção da homeostase (preservação da constância interna), reprodução, desenvolvimento e comportamento (USEPA, 1997).

Os IEs afetam o sistema endócrino e conseqüentemente as funções vitais nos seres vivos, e seus efeitos podem se manifestar em cada um dos estágios da dinâmica hormonal (produção de hormônios, ligação aos receptores, ação hormonal, excreção e biotransformação) (CRAIN *et al.*, 2000), atuando nos sítios receptores e no conjunto de enzimas associado ao ciclo hormonal, interferindo nos mecanismos de retroalimentação e nas interconexões com os sistemas nervoso e imunológico (JACOBS, 2001), de forma a imitar, bloquear ou provocar o colapso dos hormônios.

Apenas recentemente esta importante questão tem recebido atenção por parte da comunidade científica, embora já existissem, desde o início do século XX, hipóteses prevendo alterações no funcionamento do sistema endócrino de algumas espécies animais expostas a determinadas substâncias químicas tóxicas. Esse interesse tem ocorrido principalmente devido ao número crescente de publicações que relatam o

aumento da incidência de disfunções no sistema endócrino de seres humanos e, mais significativamente, efeitos fisiológicos adversos observados em espécies animais para as quais a relação causa/efeito é mais evidente (GHISELLI E JARDIM, 2007). De acordo com Moreira (2010), muitos são os estudos que evidenciam uma ligação direta entre a presença desta classe de substâncias e alterações endócrinas em animais, contudo, não se sabe em que quantidade estes compostos são prejudiciais. Alguns autores defendem que mesmo em concentrações de  $\text{ng L}^{-1}$ , alguns destes perturbadores podem causar ao longo de anos, efeitos na saúde humana e alterações funcionais em outras espécies animais.

Os efeitos desencadeados pelos hormônios sexuais sobre a biota incluem: alterações nas taxas de fecundidade, fertilização, eclosão; modificações comportamentais (agressividade, movimentação); histopatologias (fígado, gônadas, rins); imunodepressão; imposex (desenvolvimento de características sexuais femininas em machos ou o oposto), inibição do desenvolvimento dos órgãos sexuais e reversão sexual. As evidências observadas em estudos envolvendo moluscos, crustáceos, peixes, répteis, pássaros e alguns mamíferos têm sugerido que possíveis alterações de saúde humana envolvendo o sistema reprodutivo tais como o câncer de mama e de testículo, podem estar relacionadas à exposição a tais substâncias (MANAHAN, 2003 e FILHO, 2007).

Grande quantidade destes IEs pode ser liberada no ambiente em função de uso veterinário, da descarga de resíduos industriais e quando lixiviados de aterros sanitários. Entretanto, estima-se que uma importante fonte de contaminação por estes tipos de compostos esteja representada pelas excreções metabólicas naturais (HEBERER, 2002; e BENDZ, 2005). Segundo Bila e Dezotti (2003), algumas toneladas de medicamentos são produzidas por ano e aplicadas na medicina humana e veterinária. A dosagem ingerida de um fármaco não é 100 % absorvida pelo organismo, sendo parte excretada ao ambiente onde pode manter suas propriedades químicas, ou ainda, gerar produtos que algumas vezes tem maior persistência ou mesmo toxicidade.

Dentre as substâncias emergentes que têm sido reportadas como desreguladores endócrinos ou com potencial ação desreguladora, podem-se destacar produtos farmacêuticos (antibióticos de uso humano e veterinário, analgésicos,

antiinflamatórios, contraceptivos, etc), drogas de uso psiquiátrico (como a fluoxetina, etc), produtos de higiene pessoal (fragrâncias, protetores solar, repelentes de inseto, antissépticos, etc), drogas de abuso (anfetaminas, cocaína, etc), aditivos industriais como EDTA, agrotóxicos, PCB's, hormônios naturais (estrona, testosterona, etc) (SILVA e COLLINS, 2011).

Estrogênios sintéticos ( $17\alpha$ -etinilestradiol) e naturais (estrona,  $17\beta$ -estradiol), provenientes do uso de contraceptivos e do metabolismo humano, respectivamente, são frequentemente detectados em estações de tratamento de esgoto e, inclusive, em águas naturais, o que representa um sério problema de saúde pública (DESBROW *et al*, 1998; SNYDER *et al*, 1999; TERNES *et al*, 1999, BARONTI *et al*, 2000, JOSS *et al*, 2004, JOSS *et al*, 2005).

Os estrogênios são primeiramente biotransformados no sistema hepático e parcialmente nos músculos, rins e gônadas, sendo oxidados, hidroxilados, desoxidados e metilados antes da conjugação com ácido glicurônico ou sulfato, transformando-se em compostos estrogênicos menos ativos. Além dos conjugados, muitos outros metabólitos polares, como a 16-hidroxi-estrona, podem estar presentes nas fezes e na urina (YING, KOOKANA e RU, 2002).

Embora, em grande parte, sejam metabolizados e excretados na forma inativa, conjugada como glucuronídeos e sulfatos, a ação de enzimas produzidas por bactérias comumente encontradas em áreas de despejo de efluentes facilmente os biotransformam em compostos biologicamente ativos e passíveis de desencadear efeitos principalmente na biota (GHISELLI, 2006; KHANAL *et al.*, 2006; HUTCHINS *et al.*, 2007; TANAKA *et al.*, 2009).

### **1.2.1.1 Hormônios Sexuais Femininos**

Atualmente a terapia hormonal é uma área importante da medicina que consiste no uso de hormônios naturais no estado bruto ou puro, e de substâncias que simulam ou antagonizam a ação de hormônios.

Segundo a IUPAC (União Internacional da Química Pura e Aplicada), os esteróides compreendem uma classe de hormônios cuja estrutura básica é formada

pelo ciclo[a]fenantreno (Figura 1). Nessa estrutura podem existir ligações duplas, metilas, carbonilas e hidroxilas, dando origem a uma série de hormônios esteroidais (RAIMUNDO, 2007).

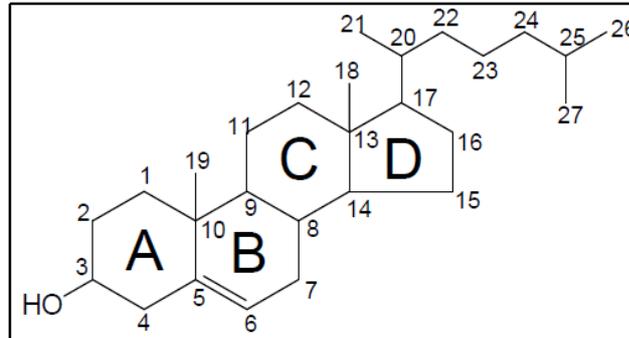


FIGURA 1 - ESTRUTURA BÁSICA DOS ESTEROIDES  
FONTE: KASSAB (2001)

Os hormônios sexuais são derivados do colesterol e podem ser classificados em três grupos principais: hormônios sexuais femininos, ou estrógenos; hormônios sexuais masculinos, ou andrógenos e, hormônios da gravidez, ou progestógenos (SOLOMONS, 2000).

Os hormônios estrógenos vêm recebendo atenção por serem compostos extremamente ativos biologicamente e estão relacionados à etiologia de vários tipos de cânceres (DOS REYS, 2001). Os estrógenos naturais  $17\beta$ -estradiol (E2), estrona (E1) e o sintético  $17\alpha$ -etinilestradiol (EE2), despertam grande preocupação, tanto pela potência como pela quantidade contínua introduzida no ambiente. Estes hormônios possuem a melhor conformação reconhecida pelos receptores e, portanto, resultam em respostas máximas, sendo considerados como responsáveis pela maioria dos efeitos disruptores desencadeados pela disposição de efluentes (FILHO, 2006). A Figura 2 mostra a estrutura química destes compostos.

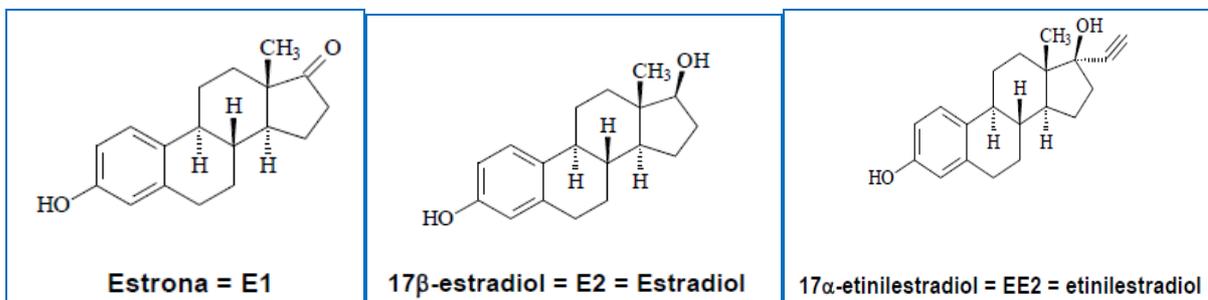


FIGURA 2 - ESTRUTURA BÁSICA DOS HORMÔNIOS E1, E2 E EE2  
FONTE: DURIGAN (2001)

Os estrogênios são excretados pelo corpo principalmente como formas biológicas inativas conjugadas (sulfatos e glucuronides). Os estrogênios conjugados não possuem atividade biológica direta, porém, uma grande proporção presente no esgoto é provavelmente desconjugada pelas bactérias fecais (*Escherichia coli*) antes de alcançar as estações de tratamento de esgotos (COLEMAN *et al.*, 2004; D'ASCENZO *et al.*, 2003; BARONTI *et al.*, 2000). Os estrogênios conjugados na forma de glucuronides são muito menos recalcitrantes a degradação biológica no esgoto do que os estrogênios sulfatados (D'ASCENZO *et al.*, 2003). Os estrogênios como o E2 e seus metabólitos, estriol e estrona, são produzidos naturalmente por mamíferos, sendo excretados principalmente por mulheres em idade fértil e influenciam no desenvolvimento do sistema reprodutor feminino e masculino, nas funções das glândulas mamárias, do útero, do ovário, testículos e da próstata e são responsáveis pelo desenvolvimento das características secundárias femininas relacionadas ao crescimento, à reprodução e ao metabolismo. Os estrogênios também desempenham um papel importante na manutenção do tecido ósseo, no sistema cardiovascular e no sistema nervoso central (SHIMADA *et al.*, 2001; MILLER 2009).

Os estrogênios E1 e E2, além de funcionarem como hormônios sexuais femininos, desempenham papéis importantes como a prevenção de doenças ósseas, proteção do sistema cardiovascular, controle sobre o comportamento e humor, entretanto, apesar de essenciais para saúde alguns estudos concluíram que sua exposição elevada aumenta o risco de câncer de mama, ovário e tireoide (RAY *et al.*, 2012). O EE2 é um estrogênio sintético comumente utilizado em pílulas anticoncepcionais, e apesar de ser administrado em baixa dosagem, sua estrogenicidade chega a ser de 10 a 50 vezes maior do que a estrona e o estradiol (JOSEPH *et al.*, 2011).

Por sua vez, estrógenos sintéticos, como o EE2, são usados extensivamente como contraceptivos e com propósitos terapêuticos, principalmente para o controle da síndrome da menopausa e do câncer de próstata (REIS *et al.*, 2006).

Esses hormônios são encontrados no ambiente devido, principalmente, a excreção de seres vivos (Tabela 1).

TABELA 1- EXCREÇÃO DIÁRIA ( $\mu\text{g}$ ) DE 17  $\beta$ -ESTRADIOL, ESTRONA, ESTRIOL E 17  $\alpha$ -ETINILESTRADIOL POR SERES HUMANOS.

Excreção ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ )	17 $\beta$ -Estradiol	Estrona	Estriol	17 $\alpha$ -Etinilestradiol
Homens	1,6	3,9	1,5	-
Mulheres em menstruação	3,5	8,0	4,8	-
Mulheres em menopausa	2,3	4,0	1,0	-
Mulheres em gestação	259	600	6000	-
Mulheres	-	-	-	35

FONTE: JOHNSON, BELFROID E DI CORCIA (2000); YING, KOOKANA E RU (2002); JOHNSON E WILLIAMS (2004).

A Tabela 1 mostra as quantidades médias de estrógenos excretados por homens e mulheres (grávidas, em menopausa e em período menstrual). Pode-se observar que a quantidade de estrogênios liberados no meio ambiente por gestantes é cerca de seis mil vezes maior para o estriol quando comparados com a excreção por mulheres em menopausa, porém, milhares de mulheres estão em seu período menstrual todos os dias. Os valores para homens são sempre inferiores aos das mulheres, sendo que a excreção de EE2 está relacionada à ingestão do fármaco. Estrogênios naturais ou sintéticos são excretados, através da urina em suas formas biologicamente ativas (FALCONER, 2006; KUCH *et al.*, 2000; TERNES *et al.*, 1999) ou seja, como conjugados solúveis em água e, em menor proporção, por meio das fezes. Ainda é necessário lembrar que as quantidades de hormônios excretadas dependem da idade, do estado de saúde, da dieta, maturação sexual, entre outros (SODRÉ *et al.* 2007).

Diversos trabalhos pautados na identificação e quantificação de hormônios em águas naturais foram desenvolvidos nas últimas décadas pelo mundo todo. Os primeiros estudos nesse sentido no Brasil foram realizados em 1997 por Ternes em Penha, RJ (Tabela 2).

TABELA 2 – QUANTIDADE DE ESTROGÊNIOS ( $\text{ng L}^{-1}$ ) ENCONTRADA EM ÁGUAS SUPERFICIAIS PELO BRASIL.

Local	Hormônio	Quantidade ( $\text{ngL}^{-1}$ )	Fonte
Penha – RJ	E2	21,0	Ternes, 1997
Campinas – SP	E2 e EE2	6000,0 e 3500,0	Ghiselle, 2006
Campinas – SP	E2 e EE2	2510,0 e 310	Sodré, 2007
Piracicaba – SP	EE2	até 305,0	Torres, N.H., 2009
Belo Horizonte – MG	E2 e EE2	62,6 e 63,8	Moreira, 2010
Curitiba – PR	E1, E2 e EE2'	1800, 0; 13450,0 e 5900,0	Machado, K., 2010
Baía de Todos os Santos - BA	EE2	20,0	Filho, N. S., 2012

NOTA: E1 = estrona, E2= 17  $\beta$ -estradiol, EE2= 17  $\alpha$ -etinilestradiol

Outra linha de pesquisa referente aos IEs busca implementar e otimizar metodologias que identifiquem e quantifiquem os estrógenos em amostras ambientais, que sejam sensíveis a esses micropoluentes, mas que sejam mais acessíveis. O grande desafio são as quantidades encontradas em níveis traço, difíceis de detectar e quantificar, mas que mesmo nessas concentrações podem trazer prejuízos aos organismos vivos.

### 1.2.2 Interação dos estrogênios com SH

A presença de IEs em águas superficiais está diretamente relacionada à eficiência dos processos de tratamento de efluentes e esgotos, pelo menos em países onde existe essa prática de saneamento. No Brasil, apenas cerca de 46 % dos municípios (IBGE, 2011) têm algum tipo de serviço de esgotamento sanitário e o tratamento é realizado somente em parte do esgoto coletado, incluindo processos físicos e químicos como coagulação, floculação, decantação, filtração, desinfecção, fluoretação e correção de pH, existindo ao final, a possibilidade da presença de micropoluentes como estrogênios. Segundo Sodré (2007, 2010), como consequência da inadequação dos sistemas de tratamento ou à falta de tratamento de esgotos ou efluentes, IEs são detectados em águas superficiais o que aponta para a necessidade de novas alternativas de descontaminação.

Há uma preocupação mundial pelo desenvolvimento de técnicas eficientes para remoção integral de IEs dos sistemas aquáticos, que sejam de baixo custo e preferencialmente um processo natural. Devido às suas propriedades físico-químicas e características estruturais as Substâncias Húmicas (SH) se habilitam a serem estudadas visando sua aplicação no tratamento de água/efluentes contendo IEs.

Considerando a complexidade do ambiente aquático, são possíveis as interações naturais dos IEs com as SH. De acordo com Stehlickova *et al* (2009), nos sistemas aquáticos e também nos terrestres, as SH são os principais compostos capazes de interagir com micropoluentes orgânicos como os hormônios, interferindo nos processos de biodisponibilidade para o ambiente.

Recentemente, diferentes adsorventes têm sido estudados como uma alternativa tecnológica para a remoção de IEs presentes em efluentes aquosos, (ZHANG, 2005, ZUKUHARA, 2006 e FERNANDES, 2007) dentre os quais pode-se destacar as SH (FERNANDES e GIOVANOLA, 2011).

As SH são compostos poliméricos heterogêneos, resultantes da decomposição de resíduos de animais e vegetais em vários estágios de decomposição (STEHLICKOVA *et al.*, 2009), e o principal componente da matéria orgânica (MO) aquática e terrestre. São complexantes orgânicos naturais importantes, pois possuem uma grande variedade de grupos funcionais presentes em sua estrutura, que nos meios aquático e terrestre influenciam diretamente no comportamento de diversas espécies no ambiente.

As SH interagem com compostos orgânicos xenobióticos, por exemplo, pesticidas e herbicidas por efeitos de adsorção, solubilização, hidrólise, processos microbiológicos e fotossensibilizantes. O efeito solubilizante das SH sobre compostos orgânicos exerce importante função na dispersão, mobilidade e transporte dessas substâncias no ambiente aquático e terrestre (MARTINETTO *et al.*, 1994; SANTOS *et al.*, 1998; STEINBERG *et al.*, 2003).

Uma concepção sobre a estrutura das SH foi proposta por Wershaw (1986, 1993) que as considerou em solução como pseudo-micelas ou possuidora de estrutura do tipo micelar, com uma parte hidrofóbica voltada para o interior e uma parte hidrofílica voltada para o exterior. Uma evolução dessa proposta coincide com as teorias de

Piccolo (2002) e colaboradores sobre um arranjo supra-estrutural de pequenas unidades de substâncias húmicas através de forças de interação fracas como as de van der Waals e outras ligações hidrofóbicas a pH neutro e de pontes de  $H^+$  em valores mais baixos de pH. Esse modelo tem grande utilidade: do ponto de vista macroscópico as macromoléculas húmicas formariam colóides, e microscopicamente possuiriam muitos microcosmos químicos (agregados) (CANELLAS, 2005).

Esse material, disponível em ambientes naturais, também possui boa capacidade de adsorção devido à presença de grupos funcionais de grande reatividade (Figura 3) que atuam nas reações de troca iônica, fazendo com que o potencial de adsorção frente a certas espécies, tais como metais e moléculas orgânicas, seja alto (BROWN, 2000).

Botero e colaboradores (2011) estudaram as interações entre o EE2 e o bisfenol A com substâncias húmicas aquáticas (SHA) de rios tropicais, sendo que os resultados indicaram forte influência no transporte e reatividade desses compostos.

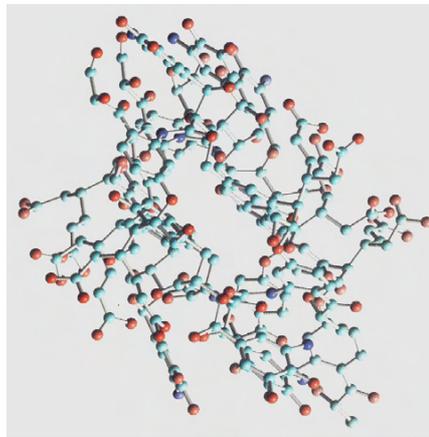


FIGURA 3 - MODELO ESTRUTURAL PARA O ÁCIDO HÚMICO  
FONTE: ROSA, et al. 2000

De acordo com Rosa e colaboradores (2000), as SH são ambientalmente importantes principalmente por influenciar no transporte, biodisponibilidade e complexação de metais e pesticidas no ambiente e por atuar no mecanismo de sorção no solo de gases orgânicos e inorgânicos presentes na atmosfera.

Além disso, possuem importante função reguladora que evita processos erosivos no solo devido a sua alta capacidade de retenção de água (STEVENSON,

1994); interagem com compostos orgânicos antrópicos, por exemplo, xenobióticos por efeitos de adsorção, solubilização, hidrólise, processos microbiológicos e fotossensibilizantes (BARCELÓ, 1991; SANTOS *et al.*, 1998); e os complexos formados entre SH e espécies metálicas, nutrientes e compostos orgânicos (SH-M) possuem diferentes estabilidades, as quais são altamente dependentes do pH, espécies metálicas, força iônica, concentração de SH e condições redox (NINFANT'EVA *et al.*, 1999).

### 1.3 Técnicas e seus fundamentos

Encontrar métodos analíticos confiáveis é um dos principais desafios no monitoramento de micropoluentes emergentes em amostras ambientais, principalmente devido às baixas concentrações e a complexidade da matriz tais como águas naturais, efluentes industriais, solos, sedimentos, emissões gasosas, amostras biológicas, alimentos, etc.

De acordo com Vieira e colaboradores (2010), diversos trabalhos têm sido dedicados a desenvolver métodos para determinação e quantificação de IEs e avaliação de sua atividade estrogênica em organismos aquáticos. Técnicas de preparo de amostras como extração e micro-extração em fase sólida (SPE e SPME) e cromatográficas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG) com diferentes detectores e outras fundamentadas em testes toxicológicos (YES, ELISA, E-screen, ELRA) têm sido desenvolvidas.

A detecção e identificação de novos compostos em faixas de concentração mais baixas tem sido possível graças ao grande progresso na instrumentação analítica nos últimos anos e o desenvolvimento de técnicas de extração mais robustas, contribuindo, assim, para o melhor entendimento do problema de contaminação do meio ambiente (BARCELÓ *et al.*, 2008 e SODRÉ *et al.*, 2010).

A CG e a CLAE têm sido as técnicas mais utilizadas na separação, identificação, e quantificação de estrogênios atualmente.

A cromatografia compreende um grupo diversificado e importante de métodos que permitem separar componentes muito semelhantes de misturas complexas como

amostras ambientais (águas superficiais, efluentes, etc) com alta complexidade devido ao seu grande volume e possibilidade de contaminação. Características como a alta sensibilidade, fácil adaptação para determinações quantitativas acuradas, adequação à separação de espécies e sua ampla aplicabilidade industrial fazem da cromatografia a mais usada de todas as técnicas analíticas de separação (SKOOG, 2002).

Um levantamento bibliográfico realizado por Filho (2006) demonstrou que os detectores e acoplamentos de detectores mais empregados para análise de hormônios pela técnica de CLAE são: eletroquímico, fluorescência, espectrômetro de massas, ultravioleta com varredura de diodo e ultravioleta com varredura de diodo acoplado a espectrômetro de massas. Ainda que, a cromatografia acoplada à espectrometria de massa apresente maior eficiência e sensibilidade na determinação de hormônios sexuais femininos, sua aplicação é limitada devido ao seu alto custo e complexidade (YACABE, HONDA e MAGALHAES, 2005; ZHOU, WANG e JIA, 2007). O detector de arranjo de diodos é, dentre os detectores, o de menor custo além de ser o detector mais utilizado em determinações analíticas de poluentes ambientais por CLAE (DEGANI, CASS e VIEIRA, 1998).

Por outro lado, a disponibilidade cada vez maior de dispositivos para pré-concentração de amostras, tem viabilizado o uso de métodos acessíveis como a espectroscopia de absorção molecular UV-Vis.

Principal concorrente das técnicas cromatográficas, as técnicas espectroscópicas apresentam a vantagem de serem mais rápidas, com a obtenção de espectros em poucos segundos, possuem maior robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações desenvolvidas. No entanto, sistemas com mais de uma espécie apresentam uma alta sobreposição espectral. Para a resolução destes sistemas, é necessária a utilização de métodos de separação matemática, como as técnicas quimiométricas (TREVISAN e POPPI, 2006; ROCHA e TEIXEIRA, 2004).

A espectrofotometria é fundamentada na lei de Lambert-Beer (Equação 1), que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. Para medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda, tem-se:

$$A = \log(I_0 / I) = \epsilon bc \quad (1)$$

A absorvidade molar ( $\epsilon$ ) é uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente. Normalmente é necessário o uso de reagentes para a conversão da espécie de interesse em uma forma que permita a medida de absorção de radiação com maior sensibilidade e/ou seletividade, para a determinação espectrofotométrica de espécies na região UV-Vis. Sendo assim, espécies que absorvem fracamente podem ser convertidas em compostos com maior absorvidade molar, visando a determinação de menores quantidades do analito (HOWELL e HARGIS, 1994; PRENESTI, DANIELE e TOSO, 2002).

### 1.3.1 Reação colorimétrica para análise UV-Visível de E1, E2, EE2

De acordo com proposta de Yakabe (2005), a aplicação do método espectroscópico visando o estudo de hormônios e sua interação com SH, baseia-se na diazotização do reagente sulfanilamida seguida de acoplamento com o hormônio, formando um complexo que apresenta coloração laranja-amarelado (Figura 4).

Os azo-compostos formados, como os azo-aromáticos (R = arila) são muito coloridos, estáveis e foram muito usados como corantes de baixo custo por mais de um século (ALLINGER, 2009).



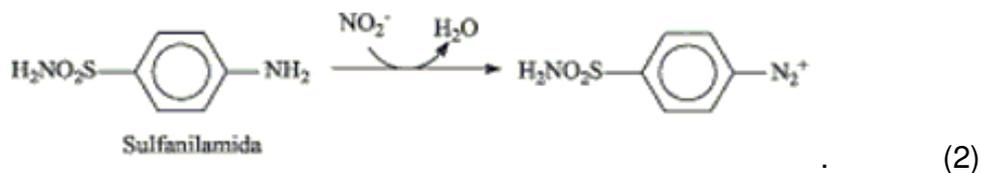
FIGURA 4 – SOLUÇÃO DA REAÇÃO COLORIMÉTRICA DO E1, E2 E EE2  
FONTE: O AUTOR

Os sais de diazônios são preparados pelo tratamento de soluções de aminas em ácidos aquosos a frio com nitrito de sódio. As diazotações de aminas aromáticas são usualmente feitas em HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluídos (ALLINGER, 2009).

Os compostos *azo* contêm o grupo –N=N–. A estabilidade do composto dissubstituído R-N=N-R é dependente da natureza do grupo R (ALLINGER, 2009).

Na reação, emprega-se nitrito de sódio, que reage com a sulfanilamida em meio ácido formando um diazo composto, seguida de acoplamento com o hormônio (YAKABE, HONDA e MAGALHÃES, 2005).

A reação mostrada na Equação 2 representa um mecanismo de reação usada no método de Griess (RAMOS, et al., 2006).



O composto formado apresenta baixa estabilidade e o limite máximo recomendado para as análises espectroscópicas das soluções é de até duas horas após a reação colorimétrica (RAMOS, *et al.*, 2006).

Esta reação colorimétrica é perceptível na faixa do UV-Vis e corresponde ao espectro de absorção dos hormônios E1, E2 e EE2 em 480nm. Realizou-se leitura em 480 nm, verificando-se, de acordo como esperado, a variação de absorção conforme a concentração.

### 1.3.2 Validação da metodologia

Para realização das análises propostas realizou-se a validação dos métodos analíticos. A validação de um processo consiste em uma avaliação que estime a eficiência na rotina de um laboratório no desenvolvimento de um método analítico,

adaptação ou implementação de método conhecido. Segundo Brito *et al.* (2003), várias definições estão descritas na literatura para validação, tratando-se portanto de termo não-específico. Se as características do método estiverem de acordo com os pré-requisitos estabelecidos, ele é considerado validado. Portanto, existe diferença entre a execução de experimentos que determinam os diversos parâmetros (coleta dos dados experimentais) e a validação. Essa deve avaliar a relação entre os resultados experimentais e as questões que o método se propõe a responder.

O objetivo da validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito. A validação deve ser considerada quando se desenvolve ou efetua adaptações em metodologias já validadas, inclusão de novas técnicas ou uso de diferentes equipamentos (BRITO *et al.*, 2003). Segundo Leite (1996), não ter validação é ter apenas um número e não um resultado.

A validação é uma comprovação, por meio de fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos (INMETRO, 2003).

Atualmente, no Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) e o MAPA (Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) são as três agências credenciadoras que verificam a competência de laboratórios de ensaios (INMETRO, 2003; ANVISA, 2003; MAPA, 2003).

Alguns parâmetros são exigidos pela ANVISA e INMETRO: linearidade e faixa de aplicação, seletividade, sensibilidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). Mas vale lembrar que não existe um modelo pré-definido para sistemas de validação, sendo necessário ajustar e adequar às melhores adaptações (LEITE, 1996). Portanto, os parâmetros a serem incluídos na validação dependem do experimento e da intenção do uso do método analítico, pois nem sempre é necessário levar todos os critérios em consideração. Deve-se selecionar os critérios de maior relevância para obter o melhor processo de validação para cada caso (FALONE, 2007).

Quando as etapas de validação são realizadas em um único laboratório, seja para verificar se um novo método tem sido desenvolvido adequadamente ou para

verificar se um método adaptado de outras fontes está apropriado, denomina-se validação no laboratório *in house validation*. Outro tipo de validação trata-se da validação completa *full validation* que envolve todas as características de desempenho de um estudo interlaboratorial utilizado para verificar como uma metodologia se comporta em uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza associada à metodologia como um todo (THOMPSON, ELLISON e WOOD, 2002).

Muitos artigos são encontrados abordando os critérios de validação de acordo com sua área específica, enfatizando a exatidão, a precisão e os limites de detecção e quantificação. Dentre esses, muitos são das áreas biológica (HUBERT *et al.*, 1999; CAUSON, 1997), farmacêutica (BRESSOLLE *et al.*, 1996; CHASIN *et al.*, 1996) e química (PEREIRA *et al.*, 2000).

O processo de validação de um método deve estar descrito em um procedimento, e os estudos para determinar os parâmetros de validação devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente e adequadamente calibrados (DICLA, 2010).

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser validado. A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida, pois isso evita que dados analíticos não confiáveis conduzam a decisões desastrosas e mesmo a prejuízos financeiros irreparáveis (RIBANI, 2004).

A validação de métodos analíticos, frequentemente abrange os parâmetros: Especificidade/Seletividade, Função da Resposta (gráfico analítico), Intervalo de Trabalho, Linearidade, Sensibilidade, Exatidão, Precisão (repetitividade, precisão intermediária e reprodutividade), Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ) e Robustez (BRITO *et al.*, 2003).

### **1.3.2.1 Linearidade e faixa de aplicação**

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados linearmente correlacionados às concentrações do analito em uma determinada faixa de

aplicação. Pode-se também definir a linearidade como a capacidade que uma metodologia analítica possui em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003).

De acordo com BRASIL (2010), a linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Para tal, deve ser verificada a ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração e a homocedasticidade (homogeneidade da variância dos resíduos) dos dados, antes de fazer a regressão linear.

A Lei de Beer estabelece que a relação entre a absorvância ( $y$ ) e a concentração do analito ( $x$ ), descrita pela Equação (3) só é válida para o intervalo correspondente à faixa linear da curva analítica.

$$y = A x + B \quad (3)$$

### 1.3.2.2 Exatidão

Segundo ANVISA (BRASIL, 2003), a exatidão de um método analítico indica a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Desta forma, a exatidão do método foi estabelecida após o alcance da linearidade do mesmo.

A exatidão pode ser alcançada por meio do cálculo do erro relativo (ER), expresso em percentagem (DICLA, 2010). Para ANVISA (BRASIL, 2003), a exatidão também pode ser calculada como a diferença porcentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança, de acordo com a Equação (4), a seguir:

$$\text{EXATIDÃO} = \frac{\text{Concentração Média Experimental}}{\text{Concentração Teórica}} \times 100 \quad (4)$$

### 1.3.2.3 Precisão

De acordo com ANVISA (BRASIL, 2003), pode-se definir precisão como a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Desta forma, pode-se alcançá-la em três níveis:

- a) Repetibilidade (ou precisão intra-corrída);
- b) Precisão Intermediária;
- c) Reprodutibilidade.

As condições de repetibilidade podem ser caracterizadas utilizando:

- Mesmo procedimento de medição;
- Mesmo observador;
- Mesmo instrumento usado sob mesmas condições;
- Mesmo local, e
- Repetições no menor espaço de tempo possível.

A repetibilidade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição do analito a branco da amostra, em várias concentrações na faixa de trabalho (BRASIL, 2010).

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes tempos (BRASIL, 2010), enquanto que para a reprodutibilidade expressa a precisão entre laboratórios, mediante estudos colaborativos usualmente aplicados para padronização de metodologias (BRITO *et al.*, 2003).

No presente trabalho apenas a repetibilidade foi avaliada devido à limitação de operação do sistema analítico por operador e laboratório únicos.

Segundo Skoog (2002), a precisão dos dados analíticos é o grau de concordância mútua entre os dados que foram obtidos do mesmo modo. Para tanto, a

avaliação da precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15%. Para o DPR emprega-se a Equação (5), a seguir (BRASIL, 2003):

$$\text{DESVIO PADRÃO RELATIVO (DPR)} = \frac{\text{Desvio Padrão (DP)}}{\text{Concentração Média Determinada (CMD)}} \times 100 \quad (5)$$

Para este cálculo é necessário obter previamente o DP e a CMD.

O desvio padrão (DP) é uma medida de dispersão usada com a média. Mede a variabilidade dos valores à volta da média.

Para Pocinho, (2009), o DP pode ser definido como a raiz quadrada da variância, e a variância (VR) é caracterizada pela média dos quadrados dos desvios ( $S^2$ ) de acordo com as equações 6 e 7, a seguir:

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad (6)$$

$$\text{DP} = \sqrt{S^2} \quad (7)$$

O desvio padrão é uma medida que indica a dispersão dos dados dentro da amostra, isto é, o quanto os resultados diferem da média. Por isso que ele sempre é apresentado junto da média. Um não faz sentido sem o outro. Quanto menor o desvio padrão, mais homogêneo é o resultado.

Uma vez obtido DP, pode-se então calcular DPR que evidencia a precisão do método. Este valor consiste na razão do desvio padrão (DP) pela concentração média determinada (CMD) expressa em %.

#### **1.3.2.4 Limite de detecção (LD) ou sensibilidade**

Define-se LD como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003; NIJHUIS, 1999; HUBER, 1998).

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método (BRASIL, 2010).

A importância desta determinação e os problemas associados a ela advêm do fato de que a probabilidade de detecção não muda rapidamente de *zero* para *um* quando seu limiar é ultrapassado. Os problemas têm sido investigados estatisticamente e diversos critérios de decisão têm sido propostos. Muitas controvérsias são originadas devido ao fato de não haver atualmente uma concordância da terminologia aplicável. O termo "*limite de detecção*" não é aceito por todos, apesar de ser usado em alguns documentos setoriais (BRASIL, 2010).

O limite de detecção para um procedimento analítico pode variar em função do tipo da amostra. É fundamental assegurar-se de que todas as etapas de processamento do método analítico sejam incluídas na determinação desse limite de detecção (BRASIL, 2010).

Para a validação de um método analítico, é normalmente suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco/ruído.

Segundo Ribeiro et al. (2003), analistas, quando desenvolvem métodos novos ou modificados para análise de traços, frequentemente definem LD em termos do desvio-padrão de medidas do branco. Entretanto, sendo o branco constituído de todos os reagentes, com exceção da amostra e do analito, não reproduz as mesmas condições a que o analito estará sujeito durante a análise. O LD determinado dessa forma pode avaliar mudanças ocorridas durante o desenvolvimento do método, ou para comparação de instrumentos. Entretanto, em relação à análise prática, esses valores são extremamente baixos e não representam a realidade.

O limite de detecção pode ainda ser determinado mediante a relação sinal/ruído, através do desvio-padrão da resposta e do coeficiente angular, e também por processos estatísticos.

No caso de métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser determinada conforme a Equação (8).

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad (8)$$

Onde  $DP_a$  é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação, e IC é a inclinação da curva de calibração.

Segundo Brito et al. (2003), tendo por base *Analytical Methods Committee* (Royal Society of Chemistry), LD pode ser assim calculado:

$$LD = \frac{3s}{S} \quad (9)$$

Na qual: s = desvio-padrão da resposta; S = o coeficiente angular da curva analítica.

#### 1.3.2.5 Limite de quantificação (LQ) ou limite de determinação

O limite de quantificação é definido como a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas (BRITO *et al*, 2003). Pode ser estimado por meio do sinal/ruído, através do desvio-padrão e por processos estatísticos.

Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado com amostras independentes, para averiguar se a tendência e a precisão conseguidas são satisfatórias. Uma maneira de se calcular o LQ é conforme a Equação (10):

$$LQ = X + 5s \text{ ou } LQ = X + 6s \text{ ou } LQ = X + 10s \quad (10)$$

Onde, X = média dos valores dos brancos, s = desvio-padrão amostral dos brancos

A concentração do analito corresponde ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios padrão. Todavia, a maneira mais realista é determinar o LQ experimentalmente, com base em critérios de aceitação pré-definidos.

O método analítico deve ser especificado e o LQ para cada analito deve ser expresso nas unidades apropriadas, de acordo com o preconizado no método analítico. A matriz da amostra usada para determinar o LQ deve ser identificada.

Segundo Brito *et al.* (2003), tendo por base *Analytical Methods Committee* (Royal Society of Chemistry), outra forma de se calcular o LQ é conforme a Equação (11):

$$LQ = \frac{10s}{S} \quad (11)$$

Onde:  $s$  = desvio-padrão da resposta da menor concentração da curva analítica;  $S$  = o coeficiente angular da curva analítica (sensibilidade do método).

Do exposto, percebe-se a necessidade de pesquisas voltadas ao desenvolvimento de metodologias de análise que permitam o monitoramento de microcontaminantes orgânicos em águas superficiais, particularmente no Brasil onde há poucos estudos sobre os níveis de contaminação em águas que são destinadas ao abastecimento público.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos Gerais**

Adaptar e padronizar um método empregando espectroscopia de absorção molecular para quantificação dos estrogênios E1, E2 e EE2 e, com base nessa metodologia, realizar estudos de bancada que busquem esclarecer aspectos da interação entre SH e os hormônios.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Validar procedimento analítico de espectroscopia de absorção molecular UV-Vis para a quantificação de estrogênios.
- Realizar análise comparativa entre o método de espectroscopia UV-Vis validado e o método cromatográfico (CLAE).
- Realizar estudos de bancada sobre o comportamento de estrógenos e suas interações com SH, empregando Espectroscopia de Absorção Molecular UV-Vis.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Implantação da Metodologia**

A metodologia analítica empregada nesta pesquisa está baseada na literatura sobre o desenvolvimento e padronização de método colorimétrico para quantificar o 17 $\beta$ -Estradiol (YAKABE, HONDA e MAGALHÃES, 2005) o emprego de CLAE na quantificação de hormônios estrógenos em águas (TORRES, 2009) e sobre a remoção dos hormônios 17  $\beta$ -estradiol e 17  $\alpha$ -etinilestradiol de soluções aquosas empregando turfa decomposta como material adsorvente (FERNANDES e GIOVANELA, 2011).

Todos os reagentes utilizados foram de pureza adequada para realização do trabalho (grau analítico). Os estrogênios e o ácido húmico da marca Sigma Aldrich®. O etanol absoluto, nitrito de sódio p.a. e sulfanilamida da marca Synth®. O ácido clorídrico fumegante a 37 %, o cloreto de cálcio p.a. e carbonato de sódio anidro p.a., da marca Merck®. A água utilizada foi obtida de um sistema milli-Q (Millipore). Para as análises cromatográficas complementares empregou-se metanol grau HPLC da Merck®.

#### **3.2 Análises por Espectroscopia de Absorção Molecular UV-Vis**

##### **3.2.1 Preparação da solução-padrão de estrogênios**

Preparou-se uma solução padrão de estrogênio, com concentração de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , diluída em álcool etílico absoluto. Para tanto, pesou-se 100 mg de cada um dos hormônios em balança analítica, em balões volumétricos com capacidade de 100 mL previamente lavados e ambientados com álcool etílico, seguido da adição de 80 mL de álcool etílico absoluto, que foi então submetido ao banho de ultra-som por cinco minutos para eliminação de bolhas, depois o volume do balão foi completado com o mesmo solvente.

A partir desta solução foram preparadas diluições, ainda em etanol absoluto para efetuar a curva analítica. As soluções então apresentaram dez concentrações diferentes para a obtenção do espectro de absorção (10,0 a 28,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### 3.2.2 Reação Colorimétrica

Em banho de gelo, misturou-se solução de sulfanilamida 0,1 % (p/v) dissolvida em solução de ácido clorídrico  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , com nitrito de sódio 0,5 % (p/v) e incubou-se por cerca de dois minutos. Em seguida, acrescentou-se a solução padrão (Yakabe, *et al.*, 2005). Agitou-se, aguardando por mais um minuto. Por fim, adicionou-se a solução de carbonato de sódio a 10 % (p/v) e completou-se com água destilada para 50 mL, como indica a Tabela 3.

TABELA 3 - PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PARA REAÇÃO COLORIMÉTRICA

Concentração de Estrogênio ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Sulfanilamida 0,1 % (mL)	Nitrito de sódio 0,5 % (mL)	Solução padrão de estrogênio (mL)	Carbonato de sódio 10 % (mL)	Água destilada q.s.p (mL)
10	10	10	10	10	50
12	10	10	10	10	50
14	10	10	10	10	50
16	10	10	10	10	50
18	10	10	10	10	50
20	10	10	10	10	50
22	10	10	10	10	50
24	10	10	10	10	50
26	10	10	10	10	50
28	10	10	10	10	50
Branco	10	10	-	10	50

FONTE: O AUTOR

### 3.2.3 Análises por Espectroscopia de Absorção Molecular dos hormônios E1, E2 e EE2

Com as soluções-padrão contendo 10,0; 12,0; 14,0; 16,0; 18,0; 20,0; 22,0; 24,0; 26,0 e 28,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  dos estrogênios determinou-se as absorbâncias obtidas de três repetições, relacionadas às correspondentes concentrações para a construção da curva analítica, com leitura simples no comprimento de onda de 480 nm, região de melhor sinal do espectro conforme o estudo de Yakabe, Honda e Magalhães (2005), onde verifica-se curvas de absorção com boa simetria e com um máximo de absorção. O

branco foi composto de álcool etílico absoluto sem o hormônio, e as leituras na faixa do UV-Vis foram realizadas em um espectrofotômetro VARIAN, modelo CARY 50, utilizando-se células de quartzo com capacidade para 3 mL e caminho ótico de 5 mm.

O desempenho analítico do método foi avaliado por meio dos seguintes parâmetros de mérito: linearidade, exatidão, precisão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), conforme Ribani e colaboradores (2004).

### 3.3 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Em laboratório de química analítica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus de Ponta Grossa/PR, realizou-se as análises cromatográficas em triplicata das soluções dos estrogênios estudados nas concentrações de 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 e 30,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para que seja empregada a mesma faixa de concentração utilizada para o método espectroscópico. Empregou-se um cromatógrafo modelo YL9100 e coluna C18 marca Luna Kinetex (4,6 x 250 mm x 5  $\mu\text{m}$ ) com detector UV-Vis.

Baseado na metodologia de Wang *et al.* (2008), utilizou-se mistura de dois solventes: A (água ultrapura) e B (metanol grau HPLC). Nos primeiros 9 minutos o gradiente A:B foi igual a (41% A : 59% B), após decorrido este tempo o gradiente variou para (49% A : 51% B) até o fim da corrida. As condições cromatográficas utilizadas seguem na Tabela 4.

TABELA 4- CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Tempo de corrida	30 min
Volume de injeção	20 $\mu\text{L}$
Temperatura da coluna	40 $^{\circ}\text{C}$
Fluxo	1,2 $\text{mL min}^{-1}$
Comprimento de onda	230 nm

. FONTE: O autor

### 3.4 Análise por Espectroscopia Infravermelho do Ácido Húmico

Com o padrão de ácido húmico, determinou-se o espectro do composto, para identificação das bandas referentes aos grupos funcionais no intervalo de 400 a 4000

$\text{cm}^{-1}$ , usando o padrão na forma sólida. Utilizou-se um espectrofotômetro SHIMADZU, modelo IR PRESTIGE 21. As pastilhas foram preparadas com 100 mg de KBr grau espectroscópico seco a  $110^\circ\text{C}$  e pulverizado, e 1 mg de ácido húmico padrão.

### **3.5 Interações estrogênios-SH**

Com base na metodologia proposta por Fernandes e Giovanela (2011), a interação dos hormônios E1, E2 e EE2 com SH foi realizada à temperatura ambiente ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ) e em pH aproximadamente 7,0. A força iônica foi mantida constante com cloreto de cálcio  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ .

Foram realizados experimentos variando-se a concentração da SH em 5,0; 10,0 e  $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  frente à solução dos hormônios em concentração inicial constante de  $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Para realizar a solubilização do ácido húmico, deixou-se a solução em pH 10, com a adição de solução de hidróxido de sódio  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ . Depois de solubilizar o ácido húmico, neutralizou-se com a adição de solução de ácido clorídrico até pH 7,0.

A interação, sob agitação constante a 80 rpm em mesa agitadora Cientec®, foi acompanhada por coletas periódicas de solução por períodos de no máximo 48 h, e análises espectroscópicas visando a quantificação através do método validado na presente pesquisa.

### **3.6 Descarte de Resíduos**

Todos os resíduos contendo hormônios gerados neste trabalho foram coletados em recipiente de PET e encaminhados a grupo de pesquisa do DEQUIM/UEPG, que estuda a potencialidade dos processos oxidativos avançados na remediação de poluentes de relevância ambiental.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Processo de validação

As figuras de mérito selecionadas, no presente estudo, para testar o desempenho da metodologia adotada foram:

- a) Linearidade e faixa de aplicação;
- b) Exatidão;
- c) Precisão;
- d) Limite de quantificação;
- e) Limite de detecção (sensibilidade).

#### 4.1.1 Linearidade e faixa de aplicação

A linearidade foi determinada através da análise em triplicata e no mesmo dia de 10 concentrações distintas (10,0; 12,0; 14,0; 16,0; 18,0; 20,0; 22,0; 24,0; 26,0 e 28,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), obtendo-se um coeficiente de correlação médio ( $R^2$ ) de três curvas analíticas de 0,994 para o E1, 0,994 para o E2 e 0,981 para o EE2. Os valores médios experimentais obtidos para a construção das curvas analíticas através da média da análise em triplicata de cada um dos 10 pontos estão demonstrados na Tabela 5.

TABELA 5 – VALORES MÉDIOS DE ABSORBÂNCIA (A) DE E1, E2 E EE2 E DESVIO PADRÃO COM LEITURA EM 480 nm, NO MESMO DIA.

Concentração Estrogênio ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	E1		E2		EE2	
	Média (A)	Desvio Padrão	Média (A)	Desvio Padrão	Média (A)	Desvio Padrão
10,0	0,034	0,005	0,031	0,004	0,024	0,003
12,0	0,050	0,001	0,033	0,004	0,040	0,006
14,0	0,059	0,007	0,046	0,005	0,036	0,006
16,0	0,060	0,011	0,052	0,007	0,047	0,013
18,0	0,077	0,011	0,069	0,005	0,062	0,007
20,0	0,082	0,009	0,082	0,001	0,073	0,003
22,0	0,091	0,008	0,094	0,010	0,079	0,005
24,0	0,103	0,008	0,102	0,013	0,096	0,004
26,0	0,110	0,010	0,113	0,003	0,103	0,005
28,0	0,120	0,007	0,121	0,004	0,141	0,010

FONTE: O AUTOR

Após o cálculo da média das triplicatas (valores experimentais) de cada ponto, as curvas analíticas foram construídas e estão demonstradas nas Figuras 5, 6 e 7.

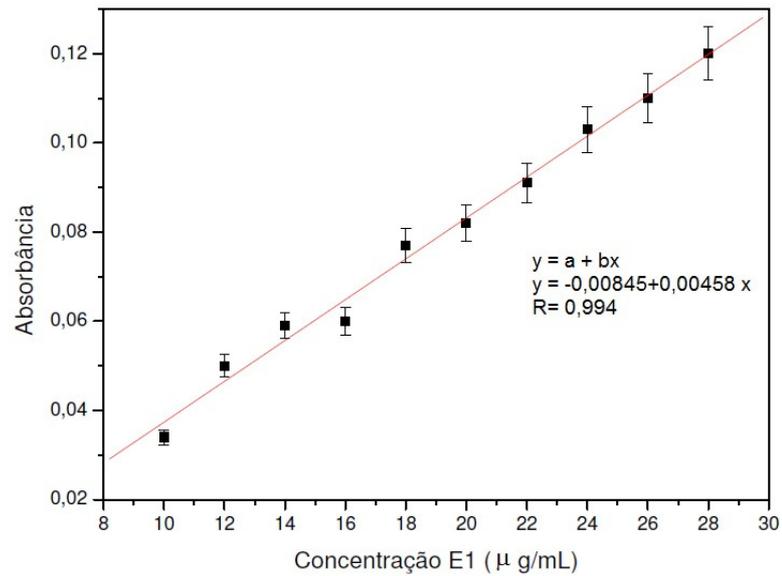


FIGURA 5 - CURVA ANALÍTICA PARA E1 EM 480 nm.  
FONTE: O AUTOR.

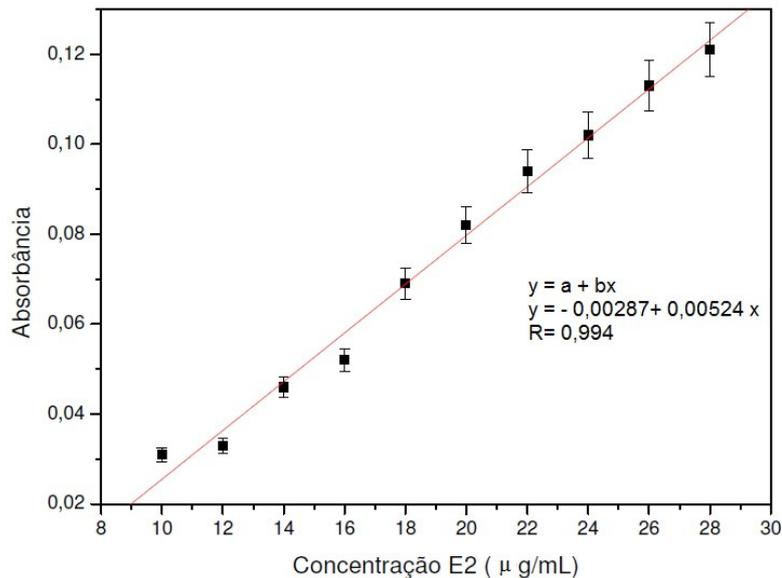


FIGURA 6 - CURVA ANALÍTICA PARA E2 EM 480 nm.  
FONTE: O AUTOR.

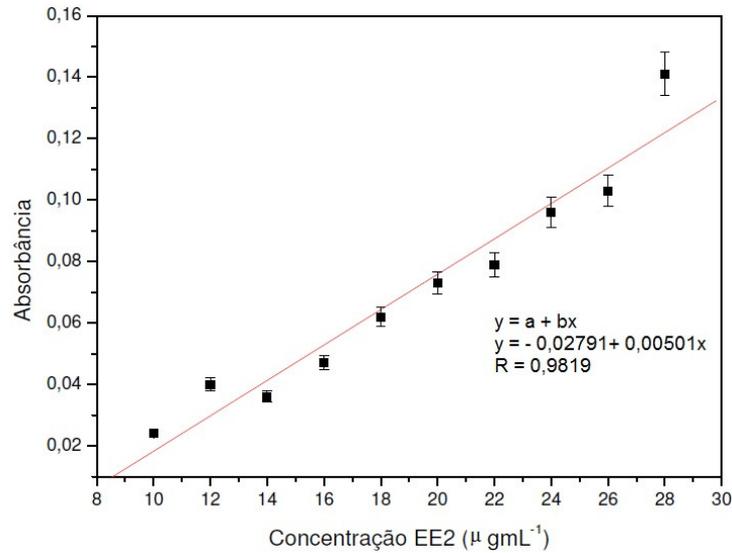


FIGURA 7-CURVA ANALÍTICA PARA EE2 EM 480 nm.  
FONTE: O AUTOR.

O coeficiente de correlação médio obtido demonstra a variação dos dados obtidos, ou seja, quanto mais próxima de 1 menor a variação obtida. Assim pode-se afirmar que os dados obtidos apresentaram pouca variação. Segundo o INMETRO (2010), valores maiores que 0,90 são aceitáveis, portanto, pode-se dizer que os valores obtidos atendem aos critérios exigidos, verificando-se, portanto, relação linear entre a concentração dos estrogênios estudados e a absorbância na faixa de concentração 10,0 – 28,0 µg mL<sup>-1</sup>.

#### 4.1.2 Exatidão

Para o cálculo de exatidão foi estabelecido um intervalo linear, a partir de 3 concentrações: baixa (10,0 µg mL<sup>-1</sup>), média (20,0 µg mL<sup>-1</sup>) e alta (28,0 µg mL<sup>-1</sup>), todas analisadas em triplicatas (Tabela 6).

TABELA 6 – ENSAIO ANALÍTICO PARA AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO DO MÉTODO.

Concentração Teórica (µg mL <sup>-1</sup> )	E1		E2		EE2	
	Concentração média experimental (µg mL <sup>-1</sup> )	Exatidão (%)	Concentração média experimental (µg mL <sup>-1</sup> )	Exatidão (%)	Concentração média experimental (µg mL <sup>-1</sup> )	Exatidão (%)
10,0	9,8	98,5	10,7	107,1	11,3	113,0
20,0	19,7	98,5	19,7	98,5	20,8	104,0
28,0	28,4	101,4	27,9	99,6	27,7	98,9

FONTE: O AUTOR

A exatidão do método foi estabelecida através da relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. Segundo a ANVISA (BRASIL, 2003), todos os valores obtidos encontram-se dentro do estabelecido pela legislação a qual estabelece valores entre 80 e 120 % de alcance do teor do analito em pesquisa.

#### 4.1.3 Precisão

A precisão foi avaliada em termos de desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV %), não se admitindo valores superiores a 15 %. Uma vez obtido Desvio Padrão (DP), calculou-se DPR que evidencia a precisão do método. Este valor consiste na razão do desvio padrão (DP) pela concentração média determinada (CMD) expressa em %. Considerando a absorvância para a faixa de concentração dos estrogênios na curva analítica, em 480 nm, obteve-se os seguintes resultados (Tabela 7).

TABELA 7 – DESVIO PADRÃO RELATIVO PARA A FAIXA DE CONCENTRAÇÕES DE 10 A 28  $\mu\text{g mL}^{-1}$  DE E1, E2 E EE2.

C ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	E1			E2			EE2		
	Absorvância Média	DP	DPR (%)	Absorvância Média	DP	DPR (%)	Absorvância Média	DP	DPR (%)
10	0,034	0,005	14,7	0,031	0,004	12,9	0,024	0,003	15,0
12	0,050	0,001	2,0	0,033	0,004	12,1	0,040	0,006	15,0
14	0,059	0,007	11,8	0,046	0,005	10,8	0,036	0,006	8,1
16	0,060	0,011	15,0	0,052	0,007	13,4	0,047	0,013	11,2
18	0,077	0,011	14,2	0,069	0,005	7,2	0,062	0,007	11,8
20	0,082	0,009	10,9	0,082	0,001	1,2	0,073	0,003	3,9
22	0,091	0,008	8,8	0,094	0,010	10,6	0,079	0,005	6,0
24	0,103	0,008	7,7	0,102	0,013	12,7	0,096	0,004	4,6
26	0,110	0,010	9,0	0,113	0,003	2,6	0,103	0,005	4,5
28	0,120	0,007	5,8	0,121	0,004	3,3	0,141	0,010	8,1

FONTE: O AUTOR

Portanto, o DPR, para a metodologia implantada conforme as condições experimentais descritas anteriormente, tem um valor médio de 9,4 % para o E1, 8,3 % para o E2 e 8,1 % para o EE2, ou seja, o método apresentou precisão dentro do limite de desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%).

#### 4.1.4 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Neste trabalho os limites foram determinados tendo por base o *Analytical Methods Committee (Royal Society of Chemistry)* (BRITO *et al*, 2003), que considera a relação entre o desvio-padrão da resposta e o coeficiente angular da curva analítica (Tabela 8).

TABELA 8: LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO CALCULADOS PARA E1, E2 E EE2

Estrogênio	Desvio padrão	Coeficiente angular	LD calculado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LQ calculado ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
E1	0,005	0,00458	3,27	10,91
E2	0,004	0,00524	2,29	7,63
EE2	0,003	0,00501	1,79	5,98

FONTE: O AUTOR.

Os limites, após terem sido determinados, foram testados com amostras independentes, para averiguar se a tendência e a precisão conseguidas eram satisfatórias. De acordo com Brasil (2010), para a análise em nível de traços, pode-se adotar o LQ como a concentração mais baixa da curva analítica.

Após realizar-se a validação do método colorimétrico com quantificação por espectroscopia UV-Vis, validou-se também a metodologia empregando CLAE com detector UV-Vis, comparando-se posteriormente os resultados obtidos com o intuito de confirmar a adequação do método espectroscópico para os propósitos do presente trabalho.

## 4.2 Método cromatográfico

A metodologia aplicada na etapa de cromatografia foi baseada no trabalho desenvolvido por Torres (2009), empregando-se uma coluna C-18 Kinetex como fase estacionária e como fase móvel a mistura água:metanol 41:59 (v/v) nos primeiros nove

minutos de corrida e depois na proporção 49:51 (v/v) até o final da corrida cromatográfica, com leitura em detector UV-Vis em 230 nm.

Foram preparadas soluções padrão de E1, E2 e EE2 em etanol. Após injeção das amostras, foram identificados os tempos de corrida em aproximadamente 24,5 minutos para o E2, 26 minutos para o E1 e 29 minutos para o EE2. Os picos para E1 e E2 possuem tempo de retenção muito próximos sob as condições cromatográficas apresentadas e assim, ocorre sobreposição dos picos referentes aos hormônios E1 e E2 quando analisados simultaneamente, no cromatograma resultando em apenas um pico largo. Por esse motivo, o E2 foi injetado separadamente. O cromatograma para o E1 e para o EE2 está demonstrado conforme a Figura 8.

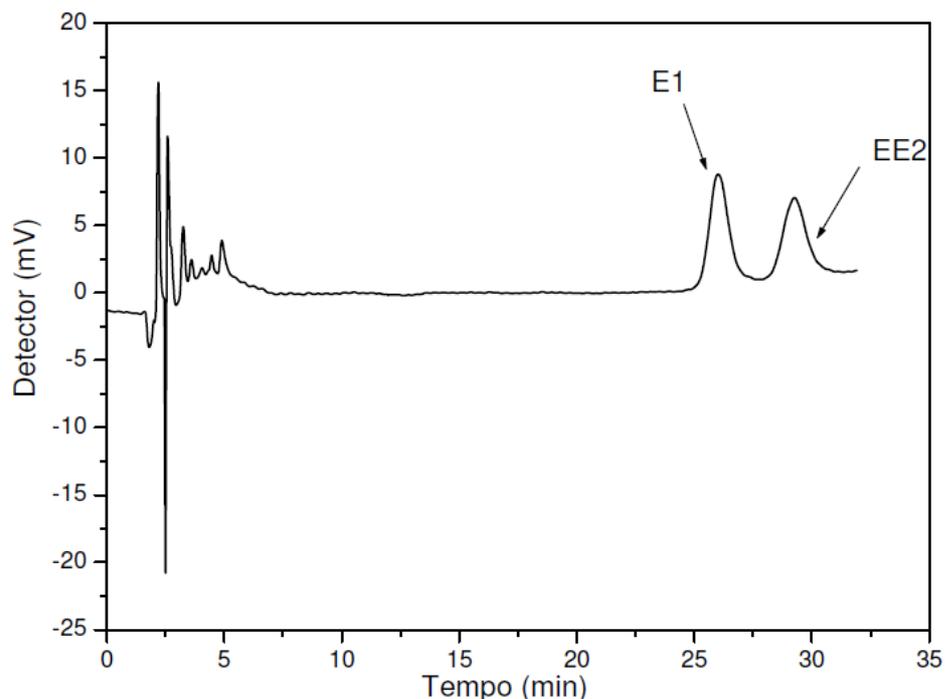


FIGURA 8: CROMATOGRAMA PARA E1 E EE2  
FONTE: O AUTOR

Os picos cromatográficos observados entre 1 a 6 minutos podem ser atribuídos ao solvente utilizado para preparação das soluções padrão (etanol) e também a possíveis impurezas.

Como o intuito do presente trabalho é realizar um comparativo entre o método cromatográfico e o método espectroscópico, utilizou-se as mesmas figuras de mérito para validação.

#### 4.2.1 Linearidade e faixa de aplicação

A linearidade foi determinada segundo ANVISA (BRASIL, 2003), através da análise em triplicata de 5 concentrações distintas (10,0; 15,0; 20,0; 25,0 e 30,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), obtendo-se um coeficiente de correlação médio ( $R^2$ ) de três curvas analíticas de 0,990 para E1; 0,987 para E2 e 0,995 para EE2. Os valores experimentais obtidos para a construção da curva analítica através da média da análise em triplicata de cada um dos 5 pontos escolhidos estão demonstrados na Tabela 9.

TABELA 9- VALORES MÉDIOS DE ÁREA ( $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ) DO E1, E2 E EE2 E DESVIO PADRÃO.

Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	E1		E2		EE2	
	Média (Área)	Desvio Padrão	Média (Área)	Desvio Padrão	Média (Área)	Desvio Padrão
10,0	111,009	8,7	139,234	7,9	91,062	6,3
15,0	242,207	13,4	280,446	6,2	194,014	12,4
20,0	300,006	6,6	358,195	5,8	266,145	5,2
25,0	391,649	9,9	480,244	8,3	324,271	6,4
30,0	455,975	3,2	511,883	5,3	408,125	5,1

Após o cálculo da média das triplicatas de cada ponto experimental, as curvas analíticas foram construídas a partir da relação entre as diferentes concentrações e a média dos valores de área ( $\text{mVs}^{-1}$ ) produzidos pelos picos cromatográficos e estão demonstradas nas Figuras 9, 10 e 11:

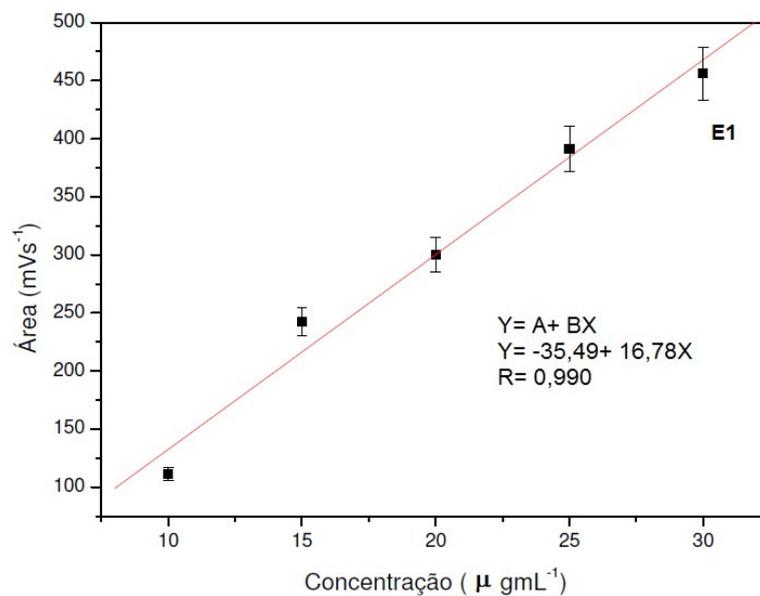


FIGURA 9 - CURVA ANALÍTICA PARA E1 OBTIDA ATRAVÉS DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO  
FONTE: O AUTOR.

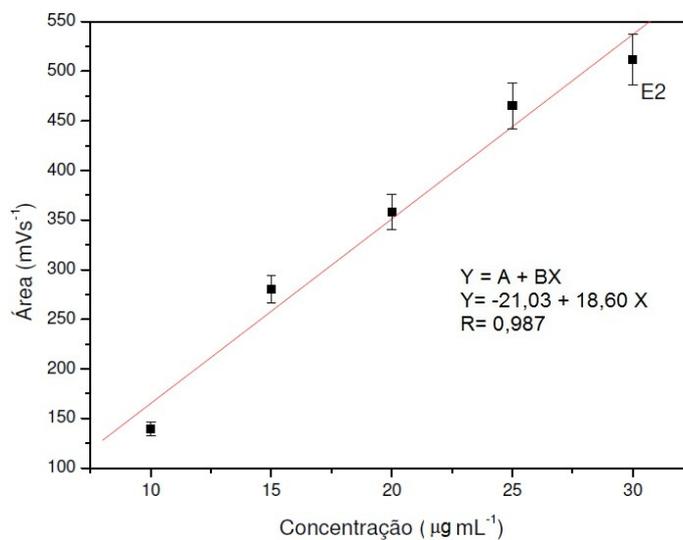


FIGURA 10 - CURVA ANALÍTICA PARA E2 OBTIDA ATRAVÉS DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO  
FONTE: O AUTOR.

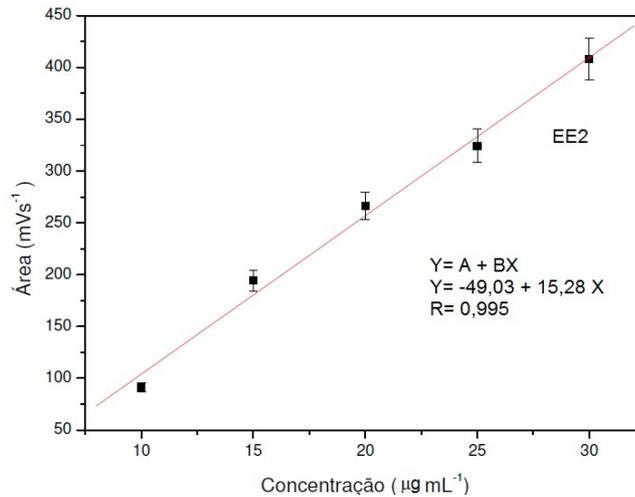


FIGURA 11 - CURVA ANALÍTICA PARA EE2 OBTIDA ATRAVÉS DE MÉTODO CROMATOGRÁFICO  
 FONTE: O AUTOR.

O coeficiente de correlação médio obtido demonstra a variação dos dados obtidos, ou seja, quanto mais próxima de 1 menor a variação obtida. Assim pode-se afirmar que os dados obtidos apresentaram pouca variação. Segundo o INMETRO (2010), valores maiores que 0,90 são aceitáveis, portanto, pode-se dizer que os valores obtidos atendem aos critérios exigidos, verificando-se, portanto, relação linear entre a concentração dos estrogênios estudados e a área dos picos cromatográficos na faixa de concentração 10,0 a 30,0 µg mL<sup>-1</sup>.

#### 4.2.2 Exatidão

Para o cálculo de exatidão foi estabelecido um intervalo linear entre três níveis de concentração: baixa (10,0 µg mL<sup>-1</sup>), média (20,0 µg mL<sup>-1</sup>) e alta (28,0 µg mL<sup>-1</sup>), todas analisadas em triplicatas (Tabela 10).

TABELA 10 – ENSAIO ANALÍTICO PARA AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Concentração Teórica (µg mL <sup>-1</sup> )	E1		E2		EE2	
	Concentração média experimental (µg mL <sup>-1</sup> )	Exatidão (%)	Concentração média experimental (µg mL <sup>-1</sup> )	Exatidão (%)	Concentração média experimental (µg mL <sup>-1</sup> )	Exatidão (%)
10,0	10,37	103,7	9,28	92,8	10,59	105,9
20,0	19,62	98,1	20,34	101,7	20,01	100,05
28,0	28,71	102,5	28,06	100,2	27,92	99,7

FONTE: O AUTOR

A exatidão do método foi estabelecida através da relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. Segundo a ANVISA (BRASIL, 2003), todos os valores obtidos encontram-se dentro do estabelecido pela legislação a qual estipula valores entre 80 e 120 % de alcance do teor do analito em pesquisa.

#### 4.2.3 Precisão

Considerando a área dos picos cromatográficos para a faixa de concentração dos estrogênios E1, E2 e EE2 na curva analítica, obteve-se os seguintes resultados (Tabela 11):

TABELA 11 – DESVIO PADRÃO RELATIVO PARA A FAIXA DE CONCENTRAÇÕES DE 10 A 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$  DE E1, E2 E EE2 PELO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.

C ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	E1			E2			EE2		
	Média (Área)	DP	DPR (%)	Média (Área)	DP	DPR (%)	Média (Área)	DP	DPR (%)
10,0	111,009	8,7	7,8	139,234	7,9	5,6	91,062	6,3	6,9
15,0	242,207	13,4	5,5	280,446	6,2	2,2	194,014	12,4	6,3
20,0	300,006	6,6	2,1	358,195	5,8	1,6	266,145	5,2	1,9
25,0	391,649	9,9	2,5	480,244	8,3	1,7	324,271	6,4	1,9
30,0	455,975	3,2	0,7	511,883	5,3	1,0	408,125	5,1	1,2

FONTE: O AUTOR

No que diz respeito à precisão, ou seja, a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla, o método apresentou precisão dentro do limite de desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), que segundo Brito *et al.* (2003) não deve ter valores superiores a 15 %.

Portanto, o DPR, para a metodologia implantada conforme as condições experimentais descritas anteriormente tem um valor médio de 3,7 % para E1, 2,4 % para E2 e 3,6 % para EE2.

#### 4.2.4 Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os limites foram calculados conforme definido por Brito *et al.* (2003), tendo por base a *Analytical Methods Committee (Royal Society of Chemistry)*.

Os valores de LD calculados para o método cromatográfico são: 1,56  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para E1; 1,28  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para E2 e 1,24  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para EE2.

Os valores de LQ calculados para o método cromatográfico são: 5,22  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para E1; 4,27  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para E2 e 4,13  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para EE2.

Pode-se observar que os valores de LD e LQ para o método cromatográfico são menores que para o método por espectroscopia UV-Vis, o que corrobora dados da literatura de que a cromatografia é um método mais sensível.

#### 4.3 Espectroscopia UV-Vis X Cromatografia

Após validar-se o método de quantificação dos estrogênios E1, E2 e EE2 por espectroscopia de absorção molecular UV-Vis e por CLAE, realizou-se análise simultânea através dos dois métodos para soluções preparadas especificamente para esse teste, obtendo-se os resultados que seguem conforme a Tabela 12:

TABELA 12- RESULTADOS OBTIDOS NA ANÁLISE SIMULTÂNEA DE SOLUÇÕES DE E1, E2 E EE2 POR ESPECTROSCOPIA UV-VIS E CLAE.

Concentração Teórica ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	E1 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		E2 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		EE2 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	
	Cromatografia	UV-Vis	Cromatografia	UV-Vis	Cromatografia	UV-Vis
10,0	10,4	9,7	9,3	10,4	10,6	10,8
20,0	19,6	19,7	20,3	19,7	20,0	20,5
28,0	28,7	28,7	28,0	27,6	27,9	27,5

FONTE: O AUTOR

Independente do fato do método cromatográfico ser considerado pela literatura como o mais preconizado para a quantificação de hormônios estrógenos, o método espectroscópico aplicado neste trabalho apresentou bons resultados, próximos aos

obtidos por cromatografia, lembrando que foram empregadas soluções padrão preparadas no laboratório, com composição química conhecida.

Silva *et al* (2008) realizou testes comparativos entre o método cromatográfico (CLAE) e a espectroscopia por UV-Vis para a determinação de cumarina em xarope, e foi demonstrado não existir diferenças significativas entre as médias do teor de cumarina detectado pela técnica espectrofotométrica em 320 nm comparada a técnica por CLAE, indicativo de exatidão do método.

Alves *et al* (2010), também obteve bons resultados ao desenvolver um método analítico para quantificação do Efavirenz por espectrofotometria no UV-Vis, quando o mesmo foi comparado ao método CLAE. A comparação entre estes dois métodos também foram equivalentes na análise de doseamento do ornidazol em comprimidos revestidos (SOARES *et al*, 2008).

Considerando-se que a espectrometria no UV-Vis apresenta a importante vantagem de ser uma técnica simples, rápida, de baixo custo e que utiliza menos quantidade de solvente em comparação à CLAE, conclui-se que o método, conforme descrito neste trabalho pode ser uma alternativa para a quantificação de amostras padrões de estrógenos, com a limitação de que não é possível detectar misturas desses hormônios devido à falta de seletividade do método espectroscópico.

A comparação do método por espectro UV-Vis com o método por cromatografia líquida vem agregar valor e confiabilidade aos resultados do método espectroscópico. Assim, com base nesses resultados, deu-se seguimento aos estudos de interação entre os hormônios E1, E2 e EE2 com SH.

#### **4.4 Análise espectroscópica do Ácido Húmico empregando infravermelho**

O espectro apresentou bandas características de grupos fenólicos e carboxílicos, havendo também presença de compostos aromáticos. O espectro está apresentado na Figura 12.

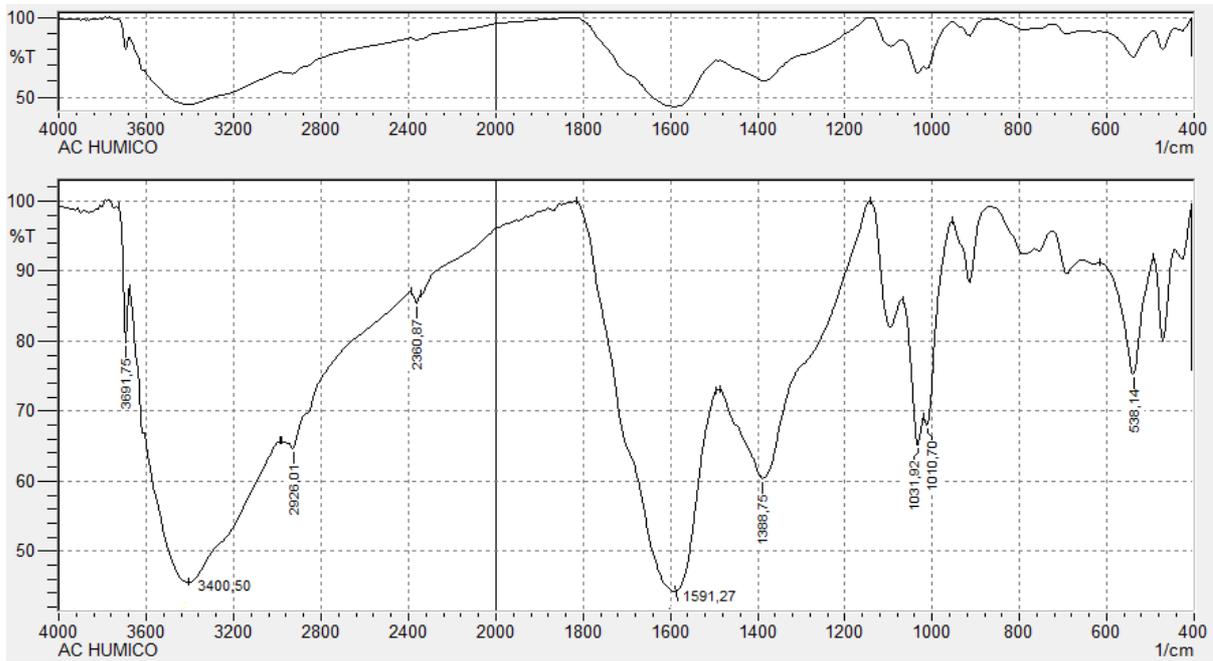


FIGURA 12- GRÁFICO DE TRANSMITÂNCIA DO ÁCIDO HÚMICO POR ANÁLISE DE IV  
 FONTE: O AUTOR

Com base no gráfico resultante, montou-se a Tabela 13 com as bandas observadas e as suas atribuições.

TABELA 13- ATRIBUIÇÕES DOS PICOS OBSERVADOS NO ESPECTRO DE IV DO ÁCIDO HÚMICO

Pico Observado ( $\text{cm}^{-1}$ )	Faixa Esperada pela Literatura ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuição
3400	3550 – 3200	$\nu(\text{O-H})$
1591	1600 - 1585 e 1500 – 1400	deformação axial das ligações C-C do anel
1591	1750 - 1500	$\nu(\text{C=O})$ ; $\nu_{\text{as}}(\text{C=O})$ e $\delta(\text{N-H})$
1388	1440 – 1395	$\delta(\text{O-H})$
2926	3.000 – 2800	$\nu(\text{C-H})$

FONTE: O AUTOR

Banda forte e larga na região de  $3550 - 3200 \text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída ao estiramento  $\nu(\text{O-H})$ , que corresponde a vários grupos contendo OH fenólico (SILVERSTEIN, 2000), o que pode ser observado em  $3400 \text{ cm}^{-1}$ .

Bandas que indicam a presença de compostos aromáticos aparecem na região de  $1600 - 1585 \text{ cm}^{-1}$  e  $1500 - 1400 \text{ cm}^{-1}$  que são atribuídas à vibração de esqueleto envolvendo a deformação axial das ligações C-C do anel (SILVERSTEIN, 2000). Há

também bandas localizadas na região de 1750 - 1500  $\text{cm}^{-1}$ , onde apareceram os estiramentos  $\nu$  (C=O) de grupos carboxílicos e estiramento assimétrico  $\nu_{\text{as}}$ (C=O) dos carboxilatos, indicando alta concentração de grupos carboxílicos. A presença de bandas nessa região também recebe contribuição da deformação  $\delta$ (N-H) (BRIGHENTI, 2010).

As bandas que aparecem no espectro de ácidos carboxílicos nas regiões de 1320 – 1210  $\text{cm}^{-1}$  e de 1440 – 1395  $\text{cm}^{-1}$ , são provenientes da deformação axial de C-O e da deformação angular de O-H, respectivamente (SILVERSTEIN, 2000). A banda localizada na região de 3.000 – 2800  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento  $\nu$  (C-H). Há ainda uma banda na região entre 1.120 - 1.050  $\text{cm}^{-1}$  que pode ser atribuída ao estiramento  $\nu$  (C-O)<sub>alc</sub> de alcoóis (BRIGHENTI, 2010).

Em 1095  $\text{cm}^{-1}$  é observado um pico referente aos grupos Si-O presentes, indicando presença de sílica na amostra (PRETSCH, 2009).

Os ácidos húmicos (AH) são um marcador natural da humificação dos resíduos orgânicos, pois no processo de humificação dos resíduos orgânicos, os AH representam a fração intermediária entre a estabilização de parte desses compostos pela interação com a matéria mineral (huminas) e a ocorrência de ácidos orgânicos na solução do solo (ácidos fúlvicos) (STEVENSON, 1994). Com o avanço da humificação, ocorrem a policondensação e a conjugação de estruturas insaturadas nos AH (PICCOLO, 2001). Grupamentos fenólicos formados durante o processo de decomposição da matéria orgânica são convertidos em quinonas, via reações de oxidação, as quais são precursoras de radicais livres do tipo semiquinonas nos AH (MILORI *et al.*, 2002; BUDZIAC *et al.*, 2004; RIVERO *et al.*, 2004), que se estabilizam com o avanço da humificação.

Struyk & Sposito (2001) mostraram que os AH possuem atividade redox em sistemas naturais. Baldotto *et al.* (2007) apresentaram medidas do potencial do eletrodo e da capacidade de oxidação de AH isolados de adubos orgânicos. Esses autores verificaram aumento da atividade redox de ácidos húmicos com o aumento da concentração de grupos funcionais fenólicos, quinonas e semiquinonas em sua estrutura, isto é, com o aumento de aromaticidade seletiva ou do grau de humificação.

A amostra de SH analisada que corresponde ao material empregado no estudo deste trabalho tem, portanto, características estruturais que podem ser indicadores da sua reatividade e de sua tendência de participação em reações como as de complexação ou adsorção.

#### 4.5 Interação entre hormônios estrógenos e SH

Para o estudo da interação entre hormônios e SH, empregou-se ácido húmico (AH), e optou-se por soluções com baixas concentrações, com o intuito de eliminar interferências na leitura por espectroscopia UV-Vis, já que o mesmo apresenta coloração.

A interação dos hormônios E1, E2 e EE2 numa concentração inicial de 20,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  com AH nas concentrações de 5,0; 10,0 e 20,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram obtidas num período máximo de 48 horas para que interferências do ambiente, como a temperatura e luz solar não interferissem nos resultados. Os resultados obtidos seguem na Tabela 14.

TABELA 14- COMPLEXAÇÃO ENTRE AH E OS ESTRÓGENOS E1, E2 E EE2

Tempo (horas)	AH 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$			AH 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$			AH 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$		
	E1*	E2*	EE2*	E1*	E2*	EE2*	E1*	E2*	EE2*
0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
7	14,1	19,0	18,6	24,7	16,5	18,7	13,7	14,4	14,2
24	12,8	18,9	16,9	18,5	15,1	17,1	12,4	12,6	13,6
32	10,9	12,8	14,7	13,8	13,5	15,7	12,6	11,1	10,5
48	10,2	12,0	13,7	11,0	11,1	9,8	11,4	9,1	4,8

\* Concentração de E1, E2 e EE2 detectada na solução em  $\mu\text{g mL}^{-1}$

FONTE: O AUTOR

A redução na concentração dos estrogênios no meio de estudo, quando em presença de AH foi detectada desde o início do processo. Para todos os casos, observou-se um aumento na remoção do hormônio com o aumento do tempo de contato.

Para a concentração de 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de AH, ao final de 48 horas, a concentração de E1 foi reduzida de 20,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para 10,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , ou seja, uma remoção de 49 %. Quando a concentração de AH foi aumentada para 10 e 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , novamente verificou-se a redução na concentração dos estrogênios estudados, ao longo do tempo

(Figura 13). Entretanto para E1, a porcentagem removida foi praticamente igual, podendo-se afirmar que há uma diferença mínima na capacidade de remoção quando comparadas com a solução de AH  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Na presença de  $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AH, 44,85 % ( $9,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) do E1 foi removido, enquanto que em  $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AH, removeu-se 43,0 % ( $8,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) do estrogênio E1.

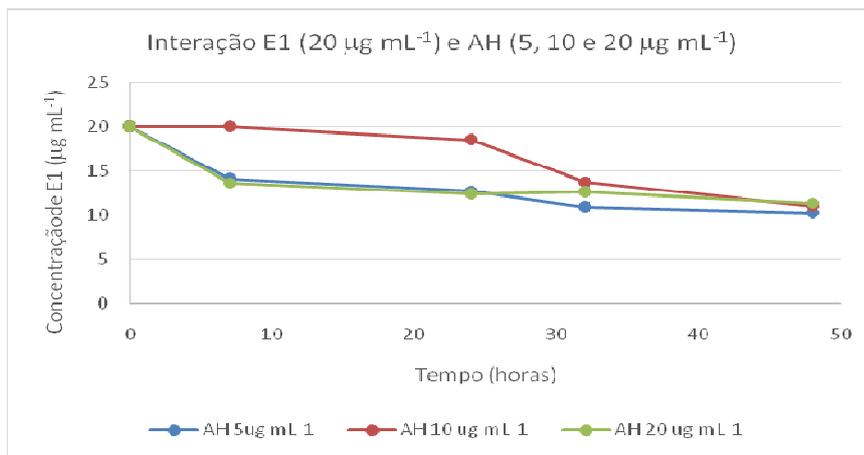


FIGURA 13- GRÁFICO DE INTERAÇÃO DO E1 COM AH DURANTE 48 HORAS  
 FONTE: O AUTOR

Para E2 e EE2, a redução da concentração esteve em torno de 35 %, sendo encontradas concentrações de  $12,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de E2 e  $13,7 \mu\text{g mL}^{-1}$  de EE2 ao final do tempo estipulado.

No caso do hormônio E2 (Figura 14) observou-se a redução na concentração do estrogênio com o aumento do tempo de contato, nas diferentes condições estudadas, porém o aumento na concentração de AH, não aumentou de forma significativa a remoção desse estrogênio, que foi de 44,40 % ( $8,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) na presença de  $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AH e 54,45 % ( $10,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) na presença de  $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de AH.

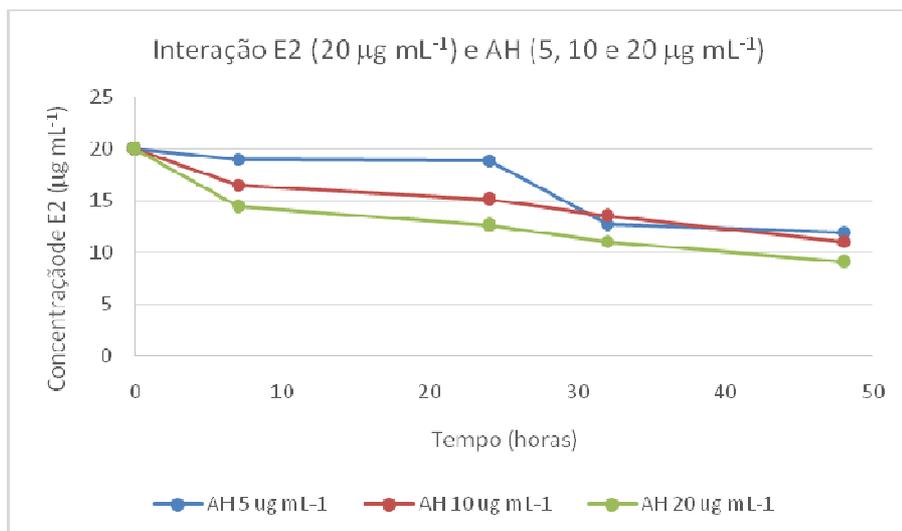


FIGURA 14- GRÁFICO DE INTERAÇÃO DO E2 COM AH DURANTE 48 HORAS  
 FONTE: O AUTOR

O hormônio EE2 foi o que apresentou os melhores resultados de complexação com o AH nas condições estudadas. Ao aumentar a concentração de AH, houve um aumento significativo na remoção do estrogênio (Figura 15). Na alíquota retirada do sistema, após 48 horas de agitação, removeu-se 51,1 % (10,2 µg mL<sup>-1</sup>) em presença de 10,0 µg mL<sup>-1</sup> de AH e 75,8 % (15,2 µg mL<sup>-1</sup>) em 20,0 µg mL<sup>-1</sup>.

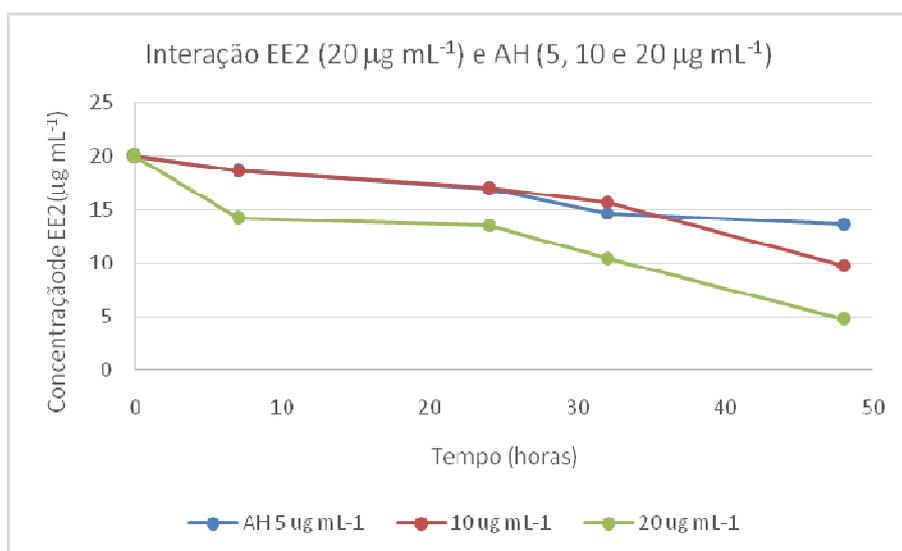


FIGURA 15- GRÁFICO DE INTERAÇÃO DO EE2 COM AH DURANTE 48 HORAS  
 FONTE: O AUTOR

Para as soluções contendo maiores concentrações de AH, o tempo de contato para atingir os mesmos valores de porcentagem de remoção foi menor do que para as soluções contendo as menores concentrações de AH.

Com base nesses resultados, pode-se supor que, em um ambiente rico em SH, a ordem de complexação dos estrogênios com relação ao tempo será  $EE2 > E2 > E1$ .

Cunha (2012) e Machado (2010) realizaram estudos de quantificação de hormônios estrógenos em águas superficiais e em sedimentos e ambos obtiveram maiores concentrações em sedimentos, o que indica a adsorção dos hormônios.

Portanto, a presença de SH no ambiente aquático, reduz consideravelmente a disponibilidade desses estrogênios e provavelmente outros IEs e, conseqüentemente, sua interação com a biota.

A Figura 16 representa o gráfico que mostra a relação entre a porcentagem de remoção de hormônio com a concentração de AH.

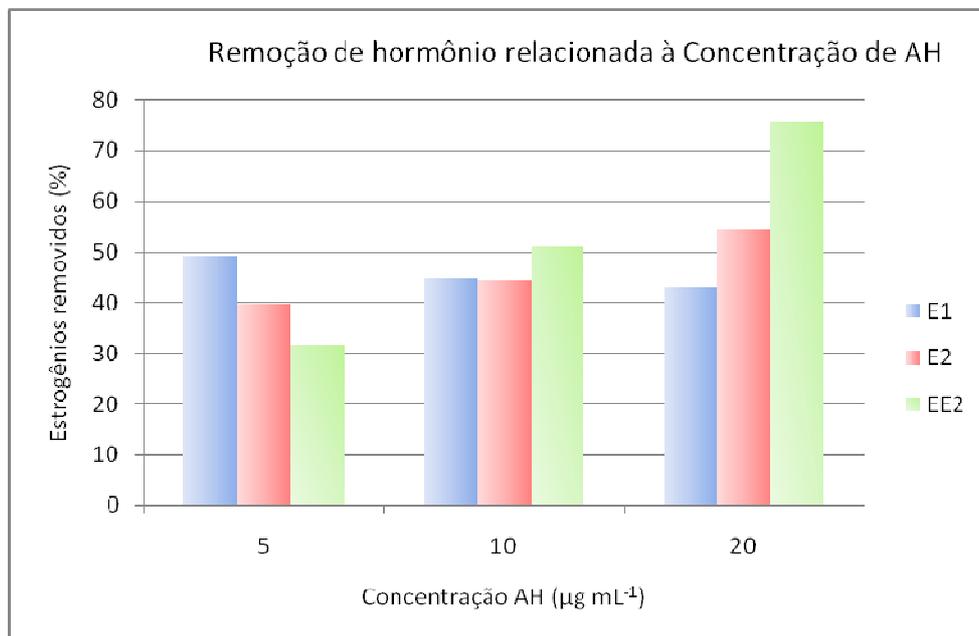


FIGURA 16- RELAÇÃO ENTRE A PORCENTAGEM DE REMOÇÃO DE HORMÔNIO E A CONCENTRAÇÃO DE AH  
 FONTE: O AUTOR.

Esses estrogênios são compostos orgânicos hidrofóbicos, moderadamente solúveis em água e que preferencialmente adsorvem em sedimentos/partículas sólidas. Portanto, é de se esperar que a adsorção no solo, ou sedimento ou lodo biológico seja um significativo fator da redução da concentração desses estrogênios na fase aquosa (Lai *et al.*, 2000; Urase e Kikuta, 2005).

A diferença na quantidade de hormônio complexado com o AH pode estar associada às particularidades estruturais de cada hormônio. O EE2 possui características mais apolares, devido à presença do grupo etinil em sua estrutura, podendo dessa forma, alterar sua afinidade pelo AH (FERNANDES *et al.*, 2011).

Lai *et al* (2000), investigaram a adsorção de estrógenos em sedimentos e relataram que os estrogênios sintéticos, foram removidos mais facilmente da fase água do que os estrogênios naturais, além disso, a sorção dos estrogênios para sedimentos foi diretamente relacionada com os teores de carbono orgânico total do meio

Dados físico-químicos indicam que a molécula húmica apresenta estrutura flexível em razão das interações intra/intermoleculares e ligações de hidrogênio (BOTERO, 2010). Para os IEs estudados, pode-se inferir que a principal interação existente com as SH, representadas pelo AH, são as ligações de hidrogênio dos grupos oxigenados e os grupamentos (-OH) presentes nessas moléculas. Além disso, por possuírem um grande número de hidrogênios disponíveis para interações do tipo Van der Waals em suas estruturas, os estrogênios estudados conseguem ocupar os sítios de complexação presentes nas micelas húmicas (BOTERO, 2010).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos demonstraram que a metodologia estabelecida apresenta os requisitos necessários para os propósitos desse estudo, com características analíticas adequadas de acordo com a legislação vigente e a literatura científica especializada.

O processo de validação da metodologia empregando espectroscopia de absorção molecular UV-Vis para os estrógenos estrona (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2) e 17  $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) foi alcançado com sucesso, assim como para a metodologia baseada na análise cromatográfica (CLAE).

As análises espectroscópicas apresentaram resultados compatíveis com as cromatográficas, dentro da faixa de concentração trabalhada, e considerando as condições experimentais de bancada, o que talvez não possa se constatar ao trabalhar com amostras reais. A quantificação dos estrogênios visando o estudo sobre as interações com as substâncias húmicas (SH) foi assim possibilitado através de ambas as técnicas instrumentais.

Os resultados demonstram que a disponibilidade dos IEs pode estar relacionada à presença de SH no meio aquático, conseqüentemente, estudos do tipo aqui apresentados são importantes para uma melhor compreensão da mobilidade, transporte e/ou reatividade de contaminantes emergentes em sistemas aquáticos.

A ampliação dessa abordagem, incluindo a variação de pH para os estudos de bancada, o uso de amostras reais de águas superficiais, bem como SH extraídas na região, são procedimentos futuros que certamente poderão aprofundar este estudo.

Considerando a presença de SH em diversos ambientes naturais, acredita-se que o estudo do impacto causado pelo aporte de estrogênios no ambiente e suas conseqüências para os organismos vivos, deve incluir as interações verificadas neste trabalho.

Estudos envolvendo poluentes emergentes se mostram cada vez mais importantes pelos seus riscos ao ambiente e à saúde, além de serem necessários para abrir novas perspectivas de análises, quantificação, etc, e conseqüentemente, alertar os órgãos regulamentadores e a comunidade quanto à esses poluentes.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; DE JONGH, D.C. et al., **Química Orgânica**, 2ª ed., LTC Editora, Rio de Janeiro - RJ, 2009.

ALVES, L. D. S.; ROLIM, L. A.; FONTES, D. A. F., ROLIM-NETO, P.; SOARES, M. F. e SOBRINHO, J. L. S.; **Desenvolvimento de Método Analítico para Quantificação do Efavirenz por Espectrofotometria no UV-Vis**; Quim. Nova, Vol. 33, No. 9, 1967-1972, 2010.

ANDREOLI, C. V.; CARNEIRO, C.; **Gestão Integrada de Mananciais de Abastecimento Eutrofizados**; Curitiba: SANEPAR; Finep; 2005.

ANKLEY, G.; MIHAICH, E.; STAHL, R.; TILLITT, D.; COLBORN, T.; MCMASTER, S.; MILLER, R.; BANTLE, J.; CAMPBELL, P.; DENSLOW, N.; DICKERSON, R.; FOLMAR, L.; FRY, M.; GIESY, J.; GRAY, L.E.; GUINEY, P.; HUTCHINSON, TH.; KENNEDY, S.; KRAMER, V.; LEBLANC, G.; MAYES, M.; NIMROD, A.; PATINO, R.; PETERSON, R.; PURDY, R.; RINGER, R.; THOMAS, P.; TOUART, L.; VAN DER KRAAK, G.; ZACHAREWSKI, T.; **Environ. Toxicol .Chem.**1998, 17, 68.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2ed. Trad. Recio, M.A.L. e Carrera, L.C.M., Porto Alegre: Bookman, 2002.

BALDOTTO, M. A., CANELLAS, L. P., CANELA, M. C., SIMÕES, M. L., MARTIN-NETO, L., FONTES, M. P. F. e VELLOSO, A. C. X.; **Propriedades redox e grupos funcionais de ácidos húmicos isolados de adubos orgânicos**; R. Bras. Ci. Solo, 31:465-475, 2007

BARCELÓ, D.; **Occurence handling and chromatographic determination of pesticides in the aquatic environment**. Analyst, v. 116, n. 2, p. 681-689, 1991.

BARCELÓ, D.; ALDA, M. J. L.; **Determination of Steroid Sex Hormones and Related Synthetic Compounds Considered as Endocrine Disrupters in Water by Fully Automated On-Line Solid-Phase Extraction–Liquid Chromatography–Diode Array Detection**; *J. Chromatogr., A* 2001, 911, 203.

BARCELÓ, D.. **Emerging pollutants in water analysis**. Trac Trends in Analytical Chemistry., v. 22, p. 14-16, 2003.

BARONTI, C.; CURINI, R.; D'ASCENZO, G.; CORCIA, A. D.; GENTILI, A.; SAMPERI, R.; **Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water**. Environmental Science & Technology, 34, 5059-5066; 2000.

BENDZ, D.; PAXÉUS, N. A.; GINN, T. R.; LOGE, F. J., **Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden.** *Journal of Hazardous Materials*, 122, 195; 2005.

BILLA, D. M.; DEZOTTI, M. **Fármacos no meio ambiente.** *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 4, 523-530, 2003.

BILA D. M., DEZOTTI M.: **Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências.** *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 3, 651-666, 2007

BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N.; ***Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes***, 1st ed., IWA Publishing, Lewis Publishers CRC Press LLC: USA, 2003.

BOTERO, W. G; OLIVEIRA, L. C; CUNHA, B. B; OLIVEIRA, L. K; GOLVEIA, D; ROCHA, J. C; FRACETOD, L. F; ROSA, A. H.; ***Characterization of the Interactions between Endocrine Disruptors and Aquatic Humic Substances from Tropical Rivers***; *J. Braz. Chem. Soc.* Vol.22 n°6 São Paulo Junho 2011.

BRAGA, B. et al; **Introdução à engenharia ambiental: O desafio do desenvolvimento sustentável**; 2ª edição; São Paulo: Pearson Prentice Hall; 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.**

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RE nº 29, de 01/06/2012.**

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos**, DOQ-CGCRE-008, Revisão 03, 02/2010.

BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M.; **Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: application to pharmacokinetics.** *J. Chromatogr. B*, v.686, p.3-10, 1996.

BRIGHENTI, C. R. G; REIS, E. L; REIS, C. Características físico-químicas de ácidos húmicos em diferentes etapas da vermicompostagem. *Ecl. Quím.*, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 69 - 82, 2010

BRITO, N. M.; AMARANTE, O. P. Jr.; POLESE, L.; SANTOS, T. C. R.; CALDAS, E. P. A.; VALE, M. L. B. F. **Validação de Métodos Analíticos: Uma Breve Revisão.** *Caderno de Pesquisa*, v. 12, n.1/2, p.116-131, 2001.

BRITO, N. M.; AMARANTE Jr., O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L.; **Validação de Métodos Analíticos: estratégia e discussão.** Ecotoxicol. e Meio Ambiente, v. 13, p. 129-146, 2003.

BROWN, P. A.; GILL, S. A.; ALLEN, S. J.; **Metal Removal from Wastewater Using Peat;** Water Resources, 34, 3907; 2000.

BUDZIAK, C.R.; MAIA, C.M.B.F. & MANGRICH, A.S. **Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira.** Química Nova, 27:399-403, 2004.

CANELLAS, L. P.; VELLOSO, A. C. X.; MARCIANO, C. R.; RAMALHO, J. F. G. P.; RUMJANEK, V. M.; REZENDE, C. E.; SANTOS, G. A. **Propriedades químicas de um Cambissolo cultivado com cana-de-açúcar, com preservação do palhico e adição de vinhaça por longo tempo.** Rev. Bras. Cienc. Sol., v. 27, p. 935-944, 2008.

CAUSON, R. **Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion.** J. Chromatogr. B, v. 689, 175-180, 1997.

CHASIN, A. M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M. C. **Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas.** R. Farm. Bioquim., v. 30, n. 2, p. 49-53, 1994.

CHOW, C. W. K.; DRIKAS, M.; HOUSE, J.; BURCH, M. D.; VELZEBOER, R. M. A., **The impact of conventional water treatment processes on cells of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*.** Water Research, 33, 15, 3253-3262, 1999.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS; *Relatório Final COM (1999) 706*, obtido na internet em Janeiro 2014.

CRAIN, D. A.; JANSSEN, S. J.; EDWARDS, T. M.; HEINDEL, J.; HO, S.; HUNT, P.; IGUCHI, T.; JULL, A.; MCLACHLAN, J. A.; SCHWARTZ, J.; SKAKKEBAEK, N.; SOTO, A. M.; SWAN, S.; WALKER, C.; WOODRUFF, T. K.; WOODRUFF, T. J.; GIUDICE, L. C.; GUILLETTE JR.; L. J.; *Fertility Sterility*, 90, 911, 2008.

CUNHA, B. B.; **Interações entre interferentes endócrinos e amostras de sedimento, turfa e espécies de plantas;** Tese de doutorado – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 88 fl. 2012.

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, n. 1/3, p. 199- 209, 2003.

DEGANI A.L.G.; CASS Q.B.; e VIEIRA P.C. **Cromatografia um breve ensaio.** Química Nova na Escola, v. 7, p. 34-36, Maio 1998.

DESBROW, C.; ROUTLEDGE, E. J.; BRIGHTY, G. C.; SUMPTER, J. P.; WALDOCK, M. **Identification of estrogenic chemicals in STW effluents.** Environ. Science. Technology., v.32, p.1549-1558, 1998.

DOS REYS, L.L. **Tóxicos ambientais desreguladores do sistema endócrino.** RFML, v.6, p. 213-225, 2001.

DURIGAN, M.A.B.; **Desenvolvimento de um sistema contínuo para tratamento de águas contaminadas por poluentes de relevância, utilizando processo oxidativos avançados;** Dissertação de Mestrado PPGQ, UFPR, 2011.

FALCONER, I. R.; **Are Endocrine Disrupting Compounds a Health Risk in Drinking Water?** Int. J. Environ. Res. Public Health, 3(2), 180-184; 2006.

FALONE, S. **Desenvolvimento de Métodos para determinação do hormônio 17  $\alpha$  metiltestoterona em amostras de água e sedimento de piscicultura: ensaios toxicológicos com cladoceros.** 179f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) Departamento de Engenharia Ambiental - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

FERNANDES, A. e GIOVANELA, M.; **Remoção dos hormônios 17b-estradiol e 17a-etinilestradiol de soluções aquosas empregando turfa decomposta como material adsorvente;** Quim. Nova, Vol. 34, No. 9, 1526-1533, 2011.

FERNANDES, R. **Estudos de remoção de 17  $\alpha$ -Etinilestradiol de Águas para Abastecimento, utilizando Dióxido de Cloro, Hipoclorito de Sódio, Carvão Ativado em Pó e Tratamento Físico-Químico.** 180f. Dissertação Mestrado em Engenharia Civil, Departamento de Engenharia Civil-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

FILHO, N.S.L.; **Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de interferentes endócrinos: aplicação em amostras de água da Baía de Todos os Santos, BA.,**Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em química da Universidade Federal da Bahia (87 f.), 2012.

FILHO, R.W.R. **Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos.** Quím. Nova, 29: 817-822, 2006.

FUKUHARA, T., IWASAKI, S., KAWASHIMA, M., SHINOHARA, O., ABE, I. **Adsorbability of estrone and 17 $\beta$ -estradiol in water onto activated carbon.** WaterResearch, Vol. 40, 241- 248, 2006.

GHISELLI, G.; **Palestra apresentada na I Escola de Química Ambiental do IQ-Unicamp, Campinas, Brasil, 2004.**

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. **Interferentes endócrinos no ambiente**. Quím. Nova, 30: 3, 695-706, 2007.

GRASSI, M. T. **Remoção dos hormônios 17 $\beta$ -estradiol e 17 $\alpha$ -etinilestradiol de soluções aquosas empregando turfa decomposta como material adsorvente**. Quím. Nova. vol.34, n.9, pp. 1526-1533, 2011.

HALLING-SORENSEN, B., **Algal Toxicity of Antibacterial Agents Used in Intensive Farming**, Chemosphere, 40, 7, 731-739, 2000.

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

HOEGER, S. J.; HITZFELD, B. C.; DIETRICH, D. R., **Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants**. Toxicology and Applied Pharmacology, 203, 231-242, 2005.

Howell, J. A.; Hargis, L. G.; Anal. Chem. 1994, 66, 445R

HUBERT, P. et al. **The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory**. Anal. Chim. Acta, v. 391, p.135-139, 1999.

HUTCHINS, S.R.; WHITE, M.; HUDSON, F.; FINE, D. **Analysis of Lagoon Samples from Different Concentrated Animal Feeding Operations for Estrogens and Estrogen Conjugates**. Environmental. Sciences. Technology, v. 41, p. 738-744, 2007.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; **Atlas de Saneamento 2011**, obtido em [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/atlas\\_saneamento/default\\_zip.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/atlas_saneamento/default_zip.shtm) Rio de Janeiro, 2011.

JACOBS, M., **Unsafe sex: how endocrine disruptors work**. Pesticide Action Network (PAN). Briefing 4,.14p, 2001.

JARDIM, W. F., GHISELLI, G., **Interferentes Endócrinos no Ambiente**, Química Nova, v. 30, n 3, 695-706, 2007.

JOHNSON A. C.; BELFROID A.; DI CORCIA A. **Estimating steroid oestrogen input into activated sludge treatment works and observation on their removal from the effluent.**; Science Total Environment; v. 256; p.163- 173; 2000.

JOHNSON e WILLIAMS. **A Model to Estimate Influent and Effluent Concentrations of Estradiol, Estrone, and Ethinylestradiol at Sewage Treatment Works**. Environmental. Sciences. Technology, v. 38, p. 3649-3658, 2004.

JOSEPH, L.; ZAIB, Q.; KHAN, I. A.; BERGE, N. D.; PARK, Y. G.; SALEH, N. B.; YOON, Y. **Removal of bisphenol A and 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol from landfill 86 leachate using single-walled carbon nanotubes.** *Water Research*, v. 45, p. 4056-4068, 2011.

JOSS, A.; ANDERSEN, H.; TERNES, T.; RICHLE, P. AND SIEGRIST, H. **Removal of Estrogens in Municipal Wastewater Treatment under Aerobic and Anaerobic Conditions: Consequences for Plant Optimization.** *Environmental Science Technology*, v. 38, p.3047- 3055, 2004.

JOSS, A., KELLER, E., ALDER, A. C., *et al*, **Removal of Pharmaceuticals and Fragrances in Biological Wastewater Treatment.** *WaterResearch*, 39, 14, 3139-3152, 2005.

KASSAB, N. **Determinação de Hormônios Esteroides em Contraceptivos orais por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).** 201f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Universidade de São Paulo. São Paulo, 2001.

KHANAL, S.K.; XIE, B.; THOMPSON, M.L.; SUNG, S.; ONG, S.K.; LEEUWEN, V. **Fate, Transport, and Biodegradation of Natural Estrogens in the Environment and Engineered Systems.** *Environmental Science e Technology*, v. 40, n. 21, p. 6547-6556, 2006.

KUCH, H. M.; BALLSCHMITER, K. **Determination of endocrine disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the pictogram per liter range.** *Environmental Science and Technology*, v. 35, p. 3201-3206, 2001.

KUSTER, M.; DE ALDA, M. J. L.; BARCELÓ D.; **The Handbook of Environmental Chemistry**; Barceló, D.; Petrovic, M.; Aguera, A., eds.; Springer-Verlag: Berlin, vol. 5, p. 1-24, 2005.

KUSTER, M.; DE ALDA, M. J. L.; HERNANDO, M. D.; PETROVIC, M.; MARTÍN-ALONSO, J.; BARCELÓ D.; **Analysys and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, pregestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin;** Barcelona Spain; *J. Hydrol.* **2008**, *358*, 112.

LA FARRÉ, M.; PEREZ, S.; KANTIANI, L.; BARCELÓ, D. **Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment.** *trac-trends AnalChem.*;27(11):991-1007, 2008.

LAI, K. M.; JOHNSON, K. L.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N.; **Binding of Waterborne Steroid Estrogens to Solid Phases in River and Estuarine System;** *Environ. Sci. Technol.* 2000, *34*, 3890-3894.

LEITE, F.; **Validação em Análise Química**, 4<sup>a</sup> ed., p. 46-58, Ed. Átomo: Campinas, 2002.

LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A.; **Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report)**, Pure Appl. Chem., v75, n 5, p 631-681, 2003.

LOPES, L. G.; MARCHI, M. R. R. ; SOUZA, J. B. G.; MOURA, J. A. ; LORENZON, C. S.; CRUZ, C. ; AMARAL, L. A. **Estrogênios em águas naturais e tratadas de Jaboticabal-SP**. Química Nova , v. 33, p. 639-643, 2010.

MACHADO, K. S.; **Determinação de Hormônios Sexuais Femininos Na Bacia Do Alto Iguaçu, Região Metropolitana de Curitiba-Pr**, Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental da Universidade Federal do Paraná (102 f.), 2010.

MANAHAN, S.E.; **Toxicological Chemistry and Biochemistry**, 3rd ed., Lewis Publishers: Boca Raton, 2003.

MARTIN-NETO, L.; ANDRIULO, A.E. & TRAGHETTA, D. **Effects of cultivation on ESR spectra of organic matter from soil size fractions of a mollisol**. Soil Sci., 157:365- 372, 1994a.

MARTIN-NETO, L.; VIEIRA, E.M. & SPOSITO, G. **Mechanism of atrazine sorption by humic acid: a spectroscopic study**. Environ. Sci. Technol., 28:1867-1873, 1994b.

MASTERS, B.; *W & Wl*. 2001, 16, 11.

MILLER W.: **Androgen synthesis in adrenarchereviews in endocrine & metabolic disorders**, Volume 10, Number 1, 2009.

MILORI, D.M.B.P.; MARTIN NETO, L.; BAYER, C.; MIELNICZUCK, J. & BAGNATO, V.S. **Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy**. SoilSci., 167:739-749, 2002

MOREIRA, A. M.; **Avaliação de Perturbadores Endócrinos em Águas do Rio das Velhas por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas**, Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto (110 f.), 2010.

NELSON, J., BISHAY, F., VAN ROODSELAAR, A., IKONOMOU, M., LAW, F. C. P.; **The Use of *In Vitro* Bioassays to Quantify Endocrine Disrupting Chemicals in Municipal Wastewater Treatment Plant Effluents**, *Science of the Total Environment*, v. 374, pp. 80–90, 2007.

- NIJHUIS, A.; KNAAP, H. C. M. Van der; JONG, S. de; VANDEGINSTE, B. G. M. **Strategy for ruggedness tests in chromatographic method validation**. Anal. Chim. Acta, v. 391, p. 187-202, 1999.
- NIFANT'EVA, T. I.; SHKINEV, V. M.; SPIVAKOV, B. Y.; BURBA, P. **Membrane filtration studies of aquatic humic substances and their metal species: a concise overview. Part 2. Evaluation of conditional stability constants by using ultrafiltration**. Talanta, v. 48, p. 257-267, 1999.
- NOGUEIRA, R. F.; TROVÓ, A. G.; SILVA, M. R.; VILLA, R. D., **Fundamentos e aplicações ambientais dos processos Fenton e foto-Fenton**. Química Nova, 2, 400-408, 2007.
- PEDROSO, R.C.R.; **Desenvolvimento de Métodos de Análise por CLAE-UV para os antimicrobianos tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima utilizando materiais à base de sílica e poliméricos como sistemas de pré-concentração**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.
- PERALTA-ZAMORA, P., **Tratamento por processos oxidativos avançados, uma nova ferramenta para remediação de resíduos, Sanare**. Revista Técnica da Sanepar, 20, p. 42-48, 2003.
- PEREIRA, D. M. C.; ARCOS, M. A. S. V.; AMARANTE Jr., O. P. de; CALDAS, E. P. A. **Comparação de métodos dicromatométricos para determinação de ferro total em minérios de ferro**. Anais Assoc. Bras. Quím., v. 49, n. 4, p. 198-203, 2000.
- PETROVIC, M., S. GONZALEZ, D. BARCELO´, **Analysis and Removal of Emerging Contaminants in Wastewater and Drinking Water**, Resultados da pesquisa Trends in Analytical Chemistry, 22, 10, 685-696, 2003.
- PICCOLO, A. **The supramolecular structure of humic substances**. SoilSci., 166:810-832, 2001.
- POCINHO, M. **Estatística – Teoria e exercícios**. Ed. Local, v. I, 2009.
- PRENESTI, E.; DANIELE, P. G.; TOSO, S.; Anal. Chim. Acta 2002, 459, 323.
- PRETSCH, E., BÜHLMANN, P., BADERTSCHER, M.; **Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data**, 4a edição, Springer Berlin Heidelberg, 2009.
- RAIMUNDO, C. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. 126f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas, Setembro, 2007.

RAMOS, L.A.; CAVALHEIRO, C.C.S. e CAVALHEIRO, E.T.G.; **Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores**; Quim. Nova, Vol. 29, No. 5, 1114-1120, 2006.

RAY, J. A.; KUSHNIR, M. M.; BUNKER, A.; ROCKWOOD, A. L.; MAIKLE, A. W. Direct measurement of free estradiol in human serum by equilibrium dialysis–liquid chromatography–tandem mass spectrometry and reference intervals of free estradiol in women. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, p. 1008-1014, 2012.

REIS FILHO, R.W.; COUTINHO, A. J; VIEIRA, E.M, **Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos**. Química Nova, 29, 817-822, 2006.

RIBANI, M.; et al. **Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos**. Quim. Nova, v. 27, n. 5, 771-780, 2004.

ROCHA, J.C.; SARGENTINI Jr, É.; ZARA, L.F.; ROSA, A.H.; SANTOS, A.; BURBA, P.; **Reduction of mercury (II) by tropical river humic substances (Rio Negro) – A possible process of the mercury cycle in Brazil**. Talanta, v.53, p.551-559, 2000.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO, A. A. **Introdução à química ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2004. 154 p.

Rodriguez-Mozaz, S.; Alda, M. J. T.; Barceló, D.; J. Chromatogr., A, **Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction–liquid chromatography–mass spectrometry** 2004, 1045, 85.

ROMÃO, L. P. C.; ARAÚJO, A. B.; ROSA, A. H.; ROCHA, J. C. **Redução de crômio hexavalente por substâncias húmicas aquáticas imobilizadas em amino propil sílica**. Eclét. Quím., v. 27, p. 383-391, 2002. Número especial.

ROMÃO, L. P. C.; CASTRO, G. R.; ROSA, A. H.; ROCHA, J. C.; PADILHA, P. M.; SILVA, H. C. **Tangential flow ultrafiltration: an alternative methodology for determination of complexation parameters in organic matter from waters and soils samples from Brazilian regions**. Anal. Bioanal. Chem., v. 375, p. 1097-1100, 2003.

ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; FURLAN, M.; **Substâncias húmicas de turfa: estudo dos parâmetros que influenciam no processo de extração alcalina**. Química Nova, v. 23 (4), p. 472-476, 2000.

ROSA, A. H.; SIMÕES, M. L.; OLIVEIRA, L. C.; ROCHA, J. C.; MARTIN NETO, L.; MILORI, D. P. M. B. **Multimethod study of the degree of humification of humic substances extracted from different tropical soil profiles in Brazil's Amzonian region**. Geoderma, v. 127, p. 1-10, 2005.

SANTOS, T. C. R.; ROCHA, J. C.; BARCELÓ, D. **Multiresidue analysis of pesticides in water from rice cultures by on-line solid phase extraction followed by LC-DAD.** Int. J. Environ. Anal. Chem., v. 70, n. 1/4, p. 19-28, 1998.

SCHERR, F. F.; SARMAH, A.K.; DI, H.J.; CAMERON, K.C., **Degradation and metabolite formation of 17 $\beta$ -estradiol-3-sulphate in New Zealand pasture soils.** Environment International, 35, 291-297, 2009.

SHIMADA, K.; MITAMURA, K.; HIGASHI, T.; **Gas chromatography and high liquid chromatography of natural steroids,** *J. Chromatogr., A.* , 935, 141-172, 2001.

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

SILVA, C. R.; GOMES, V. S.; KULKAMP, I. C. e KANIS, L.A.; **Método espectroscópico para determinação de cumarina em xarope de *Mikania glomerata* Sprengel;** Revista Brasileira de Farmacognosia, Brazilian Journal of Pharmacognosy, 18(4): 594-599, Out./Dez. 2008.

SILVERSTEIN, R. M.; et al. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SNYDER, S.A., KEITH, T.L., VERBRUGGE, D.A., SNYDER, E.M., GROSS, T.S., KANNAN, K., and GIESY, J.P.: **Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures.** Environ. Sci.Technol. 33, 2814–2820, 1999.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental.** 5a ed. São Paulo: Editora Bookman /Artmed S.A, 2002.

SOARES, M. F. L. R.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; GRANJEIRO-JÚNIOR, S.; SILVA, K. E. R.; ROLIM-NETO, P. J.; **Métodos de Determinação do Ornidazol em Comprimidos Revestidos: Desenvolvimento, Validação e Comparação Estatística** Lat. Am. J. Pharm., 27, 688, 2008.

SODRÉ F. F., LOCATELLI M. A. F., E JARDIM, W. F. **Sistema limpo em linha para extração em fase sólida de contaminantes emergentes em águas naturais.** Quim. Nova; Vol. 33, No. 1, 216-219, 2010.

SODRÉ, F.F.; LOCATELLI, M.A.F.; MONTAGNER, C.C.; JARDIM, W.F. **Caderno temático, volume 6:** Origem e destino de interferentes endócrinos em águas naturais. Laboratório de Química Ambiental - Universidade Estadual de Campinas, 2007.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C.; **Química Orgânica,** 7a ed., LCT: Rio de Janeiro, 2000.

- STEHLICKOVA, J.; SVAB, M.; WIMMEROVA, L.; KOZLER, J. **Intensification of phenol biodegradation by humic substances**. *Int. Biodet. Biodegr.*, v. 63, p. 923-927, 2009.
- STEINBERG, C. E. W.; PAUL, A.; PFLUGMACHER, S.; MEINELT, T.; KLOCKING, R.; WIEGAND, C. **Pure humic substances have the potential to act as xenobiotic chemicals – a review**. *Fresenius Environ. Bulletin*, v. 12, p. 391- 401, 2003.
- STEVENSON, F.J.; **Humus Chemistry: Genesis, Composition and Reaction**, 2<sup>a</sup> Ed., John Wiley & Sons, New York, 1994.
- STRUYK, Z. & SPOSITO, G. **Redox properties of standard humic acids**. *Geoderma*, 102:329-346, 2001.
- TANAKA, T.; TAMURA, T.; ISHIZAKI, Y.; KAWASAKI, A.; KAWASW, T.; TERAGUCHI, M.; TANIGUCHI, M. **Enzymatic treatment of estrogens and estrogen glucuronide**. *Journal of Environmental Sciences*, v. 21, p. 731–735, 2009.
- TERNES, T. A.; STUBER, J.; HERRMANN, N.; MCDOWELL, D.; RIED, A.; KAMPMANN, M.; TEISER, B., **Ozonation: a Tool for Removal of Pharmaceuticals, Contrast Media and Musk Fragrances from Wastewater?**, *Water Research*, 37, 8, 1976–1982, 2003.
- TERNES T.A.; STUMPF M.; MUELLER J.; HABERER K.; WILKEN R. D.; SERVOS M. **Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants**. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *The Science of the Total Environment* , v. 225, p.81-90, 1999.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. **Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis**. *PureandAppliedChemistry*, Oxford, v.74, n.5, 835-855, 2002.
- TORRES, N. H.; **Monitoração de resíduos dos hormônios 17  $\alpha$ -etinilestradiol e estriol em águas de abastecimento urbano da cidade de Piracicaba, SP.**; Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (83 f.), 2009.
- TREVISAN, M. G. e POPPI, R. J.; **Química Analítica de Processos**; *Quím. Nova*, Vol. 29, No. 5, 1065-1071, 2006.
- URASE, T.; KIKUTA, T.; **Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process**; *Water Research*, Vol. 39; p. 1289-1300, 2005.

VERBINNEN, R.T.; NUNES, G.S.;VIEIRA, E. M.; **Determinação de hormônios em água potável usando CLAE-DAD**; Quím. Nova, v. 33, n.9, pp. 1837-1842, 2010.

USEPA – ENVIRONMENTAL AGENCY. **Soil Screening Guidance: User's Guide**. United States Office of Solid Waste and Publicationa 9355, p. 4-23, Second Edition,1996.

WERSHAW, R. L. **Model for humus in soils and sediments**. Environ. Sci. Technol., v. 27, n. 2, p. 814-816, 1993.

YAKABE, C; HONDA, A. M; MAGALHÃES, J. F. **Determinação do 17b-estradiol nas formas farmacêuticas gel e adesivo transdérmico**. Rev. Bras. Cienc. Farm. Vol.41 no.3 São Paulo July/Sept. 2005.

YING G-G, KOOKANA RS, RU Y-J.: **Occurrence and fate of hormone steroids in the environment**.Environment International28: 545-551, 2002.

ZHANG, Y. P.; ZHOU, J. L., **Removal of estrone and 17β-estradiolfrom water by adsorption**. Water Research, 39, 3991-4003, 2005.

ZHOU Y.; WANG Z.; JIA N. **Formation of multiple trimethylsilyl derivatives in the derivatization of 17α-ethinylestradiol with BSTF or MSTFA followed by gas chromatographymass spectrometry determination**. Journal of Environmental Sciences.