



AVALIAÇÃO DE HORMÔNIOS EM ÁGUAS DE ABASTECIMENTO NO VALE DO PARAÍBA, SP⁵

JULIANA IKEBE OTOMO¹
ELÂINE ARANTES JARDIM MARTINS²
HÉLIO AKIRA FURUSAWA³
MARIA APARECIDA FAUSTINO PIRES⁴

INTRODUÇÃO

Abastecimento público, industrial, agrícola e geração de energia, são atividades que requerem múltiplos usos da água e, para que se desenvolvam de forma segura aos seus usuários, é fundamental que os recursos hídricos apresentem qualidade e quantidade adequadas (GHISELLI, 2007). Por outro lado, o resultado dessas atividades, destacando-se a geração de esgoto doméstico e industrial, são as principais fontes de alteração da qualidade das águas superficiais, devido à deficiência no sistema de tratamento desses efluentes, principalmente em regiões em desenvolvimento onde não há 100% de coleta do esgoto e apenas uma pequena fração do esgoto coletado chega a receber tratamento antes de ser lançado nos corpos hídricos (LIBÂNIO, 2008).

Frente a este cenário, a preocupação com a caracterização das águas destinadas ao abastecimento público vem crescendo nas últimas décadas, principalmente no que diz respeito aos micropoluentes os quais mesmo em concentrações de μg e ng.L^{-1} causam efeitos adversos aos organismos a eles expostos. Esses poluentes abrangem os disruptores endócrinos e os poluentes orgânicos persistentes (POPs) entre outros. Os compostos estudados neste trabalho estão na classe dos disruptores



endócrinos, e são os hormônios femininos naturais estrona, estradiol e progesterona, e os hormônios sintéticos etinilestradiol e norgestrel. Os estrógenos em especial são compostos potencialmente ativos no sistema biológico e estão relacionados à origem de diversos tipos de cânceres por terem melhor conformação com os receptores (GIROTTI, 2007; GHISELLI, 2007; BILA, 2007).

A ocorrência de maior efeito relacionada aos disruptores endócrinos em humanos durante os anos de 1940 a 1970, em que mulheres grávidas foram medicadas com DES (dietilestilbestrol). Anos mais tarde as filhas dessas mulheres desenvolveram um tipo de câncer vaginal e outros problemas no sistema reprodutivo (GHISELLI, 2007).

Os disruptores endócrinos são substâncias químicas sintéticas ou naturais, que possuem a capacidade de agir sobre o sistema endócrino de seres humanos e animais através da mimetização de um hormônio natural, estimulando respostas diferentes; bloqueando os receptores nas células e impedindo a produção de respostas corretas; estimulando a produção de quantidades maiores que a necessária ou inibindo a produção de hormônios naturais causando deficiência destes (USEPA, 1998; OTOMO, 2010).

A área estudada foi a Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul, localizada no sudeste brasileiro compreendendo três importantes estados de significativo destaque econômico, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. A rápida expansão urbana e industrial na bacia resultou na degradação da qualidade da água e redução da disponibilidade hídrica. A poluição proveniente de esgoto doméstico é a mais crítica na região, os dados que representam a situação de saneamento básico são apresentados na Figura 1 (GRUBEN, 2002; OTOMO, 2010).

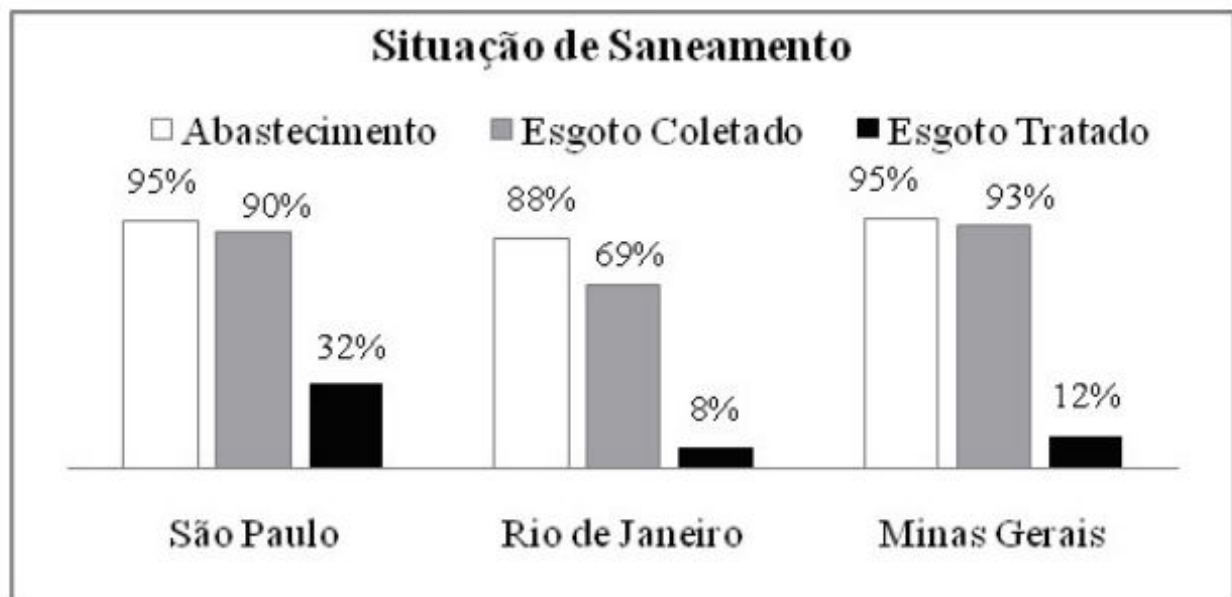


Figura 1. Situação de saneamento básico na bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul



Neste contexto, o presente trabalho é de grande importância por apresentar metodologia validada para determinar hormônios, considerados disruptores endócrinos, em amostras de água bruta e tratada, a fim de realizar o diagnóstico ambiental, contribuindo com o plano de gestão de recursos hídricos da região estudada, subsidiando ações para melhorar seu gerenciamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem e Procedimento

Foram coletadas amostras de água bruta e tratada diretamente das estações de tratamento de água (ETA) de 4 municípios do estado de São Paulo: São José dos Campos, Taubaté, Pindamonhangaba e Guararema. A coleta e preservação das amostras foi realizada de acordo com as recomendações do Guia de coletas da CETESB (1987). Em laboratório, essas amostras foram filtradas ($0,45\mu\text{m}$) e acidificadas a pH 3. Em seguida submetidas à extração e concentração em fase sólida, utilizando cartuchos SPE preenchidos com octadecil (C18). Inicialmente o cartucho foi condicionado com metanol, seguido da solução de metanol/ H_2O (10:90,v/v). Percolou-se 1L de amostra acidificada sem etapa de clean up. Para remoção da água, o cartucho foi seco sob vácuo, seguido de centrifugação por 30 minutos a 2.500 rpm. Para eluição dos analitos utilizou 5mL de diclorometano/metanol (60:40,v/v). O extrato foi evaporado em fluxo suave de N_2 até 1mL.

A análise das amostras foi realizada em cromatógrafo gasoso com detecção por espectrometria de massas (GC/MS) e os parâmetros definidos no equipamento foram: temperatura do injetor a 265°C ; temperatura da interface a 270°C ; rampa de aquecimento da coluna de 80°C a 250°C com isotermas em 215°C , 243°C e 248°C ; fluxo na coluna de $1,6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; injeção de $1\mu\text{L}$ do extrato, utilizando coluna capilar DB-5 e aquisição de dados no modo SIM monitorando cinco fragmentos de massa de cada composto.

Validação da metodologia

Para garantir a qualidade e confiabilidade nos resultados obtidos, a etapa de validação da metodologia é imprescindível no processo de desenvolvimento de um método analítico. Com base no guia de orientação sobre validação de ensaios químicos do INMETRO (2007) foram avaliados os seguintes parâmetros: Seletividade, Linearidade, Limite de Detecção, Limite de Quantificação, Exatidão, Precisão e Robustez. Foram realizados ensaios em matriz de água tratada, água bruta e somente nos solventes.

Para a avaliação da seletividade, além da análise cromatográfica da solução mix no método definido, foi utilizado o teste F-Snedecor e o teste t-Student (teste



de homogeneidade das variâncias e de significância da diferença das médias) afim de verificar o efeito das matrizes sobre o método. O parâmetro linearidade foi avaliado pelas curvas analíticas, considerando-se os coeficientes de determinação das retas (r^2), obtido pela regressão linear de cada composto em cada um dos ensaios; a análise de resíduos pelo teste t (Student); os gráficos dos resíduos e probabilidade normalizada. Para os testes estatísticos foi considerado $n=7$ e 95% de confiança.

A exatidão foi avaliada pelo índice z Score, utilizando material de referência, onde os valores obtidos foram comparados com os valores certificados. A precisão foi determinada pela repetitividade e reprodutibilidade das medições dos analitos em concentrações diferentes, dias diferentes e injeções sucessivas (7 replicatas). Foi analisada pelo cálculo de desvio padrão de repetitividade para cada concentração, pelo cálculo do limite de repetitividade (r) e pela estimativa do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) (RIBANI et al., 2004; OTOMO, 2010).

A robustez mede o quanto um método pode ser considerado sensível frente a pequenas e deliberadas variações. Neste trabalho foi aplicado o teste em que a robustez é igual ao planejamento fatorial de 7 variáveis com 8 experimentos (planejamento fracionário saturado) como propõe procedimento INMETRO (2007). Por meio das representações gráficas obtidas com os cálculos, é possível avaliar a robustez do método para as alterações nos parâmetros escolhidos e se os efeitos são ou não significativos nos resultados finais. Os parâmetros selecionados para este teste são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros selecionados para os testes de robustez

Fator	% Solventes da eluição	pH da amostra	T (°C) injetor	T (°C) interface	Fluxo total (mL.min ⁻¹)	Fluxo coluna (mL.min ⁻¹)	Voltagem detector (kV)
Nominal	60 _{DCM} :40 _{MeOH}	3	265	270	28	1,6	2,5
Varição	40 _{DCM} :60 _{MeOH}	Original	240	250	35	2	2,2

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia apresentou excelente separação dos compostos estudados. Na avaliação estatística da seletividade, os valores calculados nos testes F e t, foram comparados com os respectivos valores tabelados e para praticamente todos os compostos e concentrações, os valores calculados se apresentaram superiores ao tabelado, tanto nos ensaios com matriz de água tratada como em água bruta. Esses resultados indicam que as matrizes interferem na precisão das medidas e que os resultados obtidos contra uma curva analítica preparada somente com os solventes serão diferentes se obtidos contra uma curva preparada com uma matriz igual ou



semelhante à amostra. Como os compostos têm comportamento diferente nas matrizes, foi necessário avaliar cada parâmetro em paralelo em cada uma das matrizes.

Na avaliação do parâmetro linearidade, além do teste t foi avaliado o coeficiente de determinação (r^2) obtido pela regressão linear de cada composto nos três ensaios. Todos os compostos estudados apresentaram boa linearidade, com coeficientes de determinação acima de 0,990 nas faixas de trabalho consideradas, sendo um r^2 superior a 0,90 considerado satisfatório para se utilizar a curva analítica na quantificação de amostras (INMETRO, 2007). Na análise do gráfico de resíduos, observa-se uma dispersão maior nas concentrações mais altas, entretanto no gráfico dos resíduos versus a probabilidade normal nota-se uma distribuição que se aproxima muito de uma reta, sem grandes tendências que depreciem o comportamento linear e os dados estão dentro de um intervalo de confiança de ± 2 desvios padrão. Na Figura 2, exemplificando, são apresentados os gráficos de resíduo e probabilidade normalizada para o composto estrona nas matrizes de água tratada e água bruta. Para todos os outros compostos nos ensaios de matriz em água bruta e água tratada foram obtidos gráficos com distribuição semelhante à da estrona.

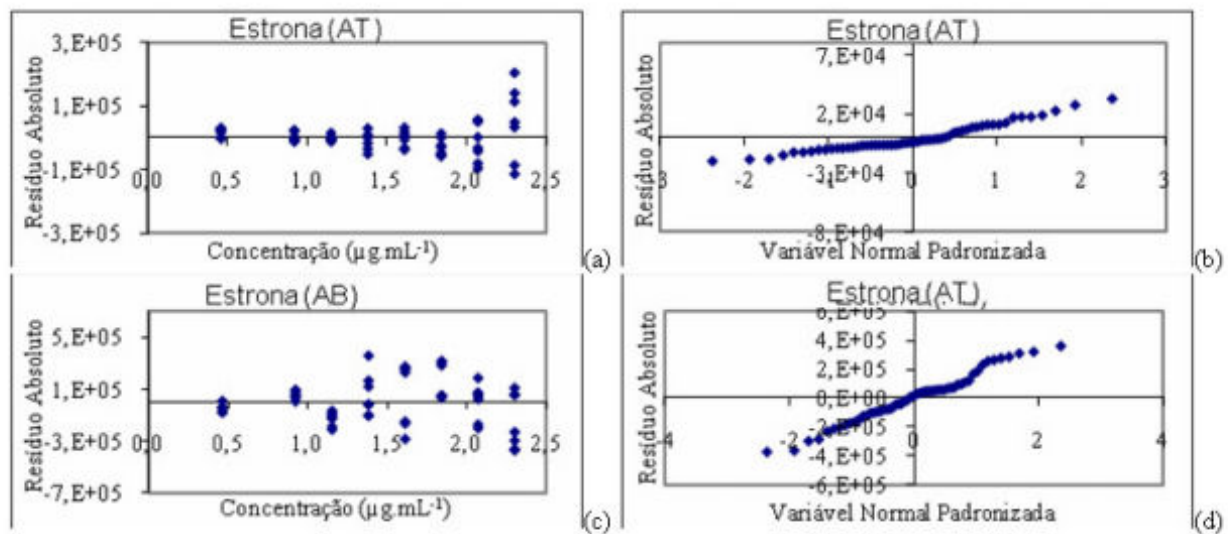


Figura 2. (a) e (c) Gráfico de resíduo; (b) e (d) probabilidade normalizada do composto estrona nas matrizes de água tratada (AT) e água bruta (AB)

O limite de quantificação (LQ) foi obtido pela média das replicatas da menor concentração do analito que pode ser avaliada com segurança mais cinco vezes o desvio padrão obtido dessas replicatas para essa concentração. O limite de detecção foi calculado pela média das replicatas da menor concentração mais o valor da abscissa t(Student) para (n-1) graus de liberdade com 100% de confiança multiplicado pelo desvio padrão obtido dessas replicatas para essa concentração (OTOMO, 2010). Os valores de LQ e LD são apresentados na Tabela 2.



Composto	Matriz de água tratada		Matriz de água bruta	
	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Estrona	0,864	0,193	0,561	0,072
Estradiol	0,876	0,216	0,552	0,089
Etinilestradiol	0,865	0,219	0,567	0,047
Norgestrel	0,845	0,212	0,556	0,061
Progesterona	0,696	0,124	0,525	0,065

Nos resultados de exatidão, avaliada pelo índice z-Score, onde $|z| < 2$ é considerado satisfatório, observou-se que todos os valores estão dentro do limite satisfatório para todos os compostos nas diferentes matrizes na faixa de trabalho adotada.

A avaliação dos resultados da repetitividade teve base nos valores do limite de repetitividade (r) obtidos para três concentrações, baixa, média e alta. Para a metodologia proposta, observou-se que nenhum dos compostos teve diferença entre os valores das replicatas maior do que o valor de r obtido, além disso, o desvio padrão relativo (DPR) para análises traços é aceito em até 20%, e os resultados para todos os compostos nas diferentes matrizes ficou abaixo deste valor em todas as concentrações de trabalho, portanto considera-se boa a precisão da metodologia.

Na Figura 3, exemplificando os tipos de resultados obtidos, são apresentados os gráficos dos efeitos das variações no ensaio de robustez para a estrona e para a progesterona, e mostram a influência que cada fator tem sobre o método desenvolvido.

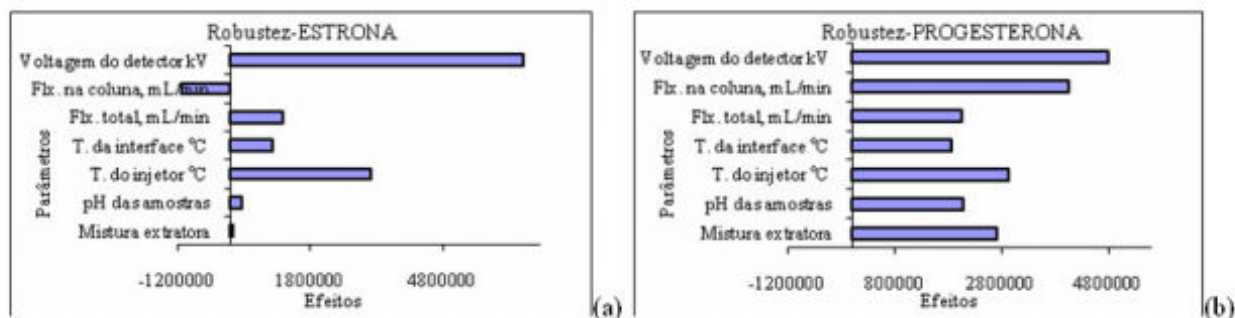


Figura 3. Gráficos para estrona (a) e Progesterona (b), representando teste de verificação de significância dos efeitos de cada parâmetro

Verifica-se que para a estrona, o fator de maior influência positiva é a voltagem do detector seguido da temperatura do injetor e o fator de influência negativa é o fluxo da coluna. Esse comportamento foi observado também para estradiol e etinilestradiol. Apenas progesterona e norgestrel, apresentaram comportamento diferente, com resultados positivos para todas as variações, embora apresentem bons resultados com os parâmetros originais.



Aplicação da metodologia

Com a metodologia validada, foi possível quantificar com segurança as amostras de água bruta e água tratada dos municípios propostos. Durante a realização deste trabalho, foram amostrados quatro períodos: março e setembro de 2009, fevereiro e junho de 2010 contemplando dessa forma épocas secas e chuvosas.

Tabela 3. Resultados das amostras de água bruta e tratada referentes à 1ª e 2ª coleta

		Água Tratada em $\mu\text{g.L}^{-1} \pm$ incerteza expandida				
		Composto	Pindamonhangaba	Taubaté	São José dos Campos	Guararema
1ª coleta	Estrona	<0,864	<0,864	<0,864	<0,864	<0,864
	Estradiol	<0,876	<0,876	<0,876	<0,876	<0,876
	Etinilestradiol	nd	nd	nd	nd	nd
2ª coleta	Estrona	<0,864	<0,864	<0,864	<0,864	<0,864
	Estradiol	0,892 \pm 0,201	<0,876	<0,876	<0,876	<0,876
	Etinilestradiol	<0,865	<0,865	<0,865	<0,865	<0,865
		Água Bruta em $\mu\text{g.L}^{-1} \pm$ incerteza expandida				
		Composto	Pindamonhangaba	Taubaté	São José dos Campos	Guararema
1ª coleta	Estrona	nd	nd	nd	nd	nd
	Estradiol	<0,552	<0,552	<0,552	<0,552	<0,552
	Etinilestradiol	nd	nd	nd	nd	nd
2ª coleta	Estrona	nd	nd	nd	nd	nd
	Estradiol	<0,552	<0,552	<0,552	<0,552	<0,552
	Etinilestradiol	nd	nd	nd	nd	nd

Na Tabela 3 foram reportados apenas os resultados dos compostos que apresentaram concentração acima do LD em pelo menos uma das amostragens. Os compostos norgestrel e progesterona não foram detectados em nenhuma das coletas. Na 3ª e 4ª coleta não foram detectados nenhum dos compostos.

CONCLUSÕES

- Conforme objetivo proposto, a metodologia desenvolvida demonstrou, através do processo de validação, ser seletiva, linear, exata e precisa e pode ser aplicada à análise proposta.

- Apesar de o teste de robustez indicar melhora na metodologia para o norgestrel e progesterona com a variação proposta, uma alteração não foi necessária uma vez que os mesmos apresentam bons resultados de validação com os parâmetros originais.

- Aplicando-se a metodologia desenvolvida nas amostras da área estudada, é possível observar uma pequena contaminação principalmente em períodos secos (1ª e 2ª coleta).



Os autores agradecem ao apoio financeiro da CNPQ e CAPES. Ao IPEN-CNEN/SP pela oportunidade de desenvolver este trabalho. À SABESP pelas coletas das amostras.

NOTAS

1. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN – CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, CQMA,05508-000, São Paulo, SP, Brasil, julianaibebe@gmail.com, aluna de pós -graduação – autor correspondente
2. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN – CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, CQMA, 05508-000, São Paulo, SP, Brasil, elaine@ipen.br, pesquisadora;
3. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN – CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, CQMA, 05508-000, São Paulo, SP, Brasil, helioaf@ipen.br, pesquisador;
4. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN – CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, CQMA, 05508-000, São Paulo, SP, Brasil, mapires@ipen.br, pesquisadora coordenadora
5. Trabalho extraído de dissertação de mestrado. Entidade financiadora: CNPq e CAPES.

REFERÊNCIAS

BILA, D. M.; DEZOTTI, M.; Fármacos no meio ambiente. *Quim. Nova*, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Guia de coleta e preservação de amostras de água. 1987

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

GIROTTO, G. et al. Estrógenos em água: otimização da extração em fase sólida utilizando ferramentas quimiométricas. *Ecl. Quím.*, v. 32, n. 2, p.61-68, 2007.

GRUBEN, A.; LOPES, P. D.; JOHNSON, R. M. F. A Bacia do rio Paraíba do Sul,

São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais – 2001. Projeto Marca d'água. Relatórios preliminares 2001. 2002.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 02. Jun. 2007

LIBÂNIO, M. Fundamentos de qualidade e tratamento de água. 2.ed. Campinas, SP:Átomo, 2008.

OTOMO, J.I. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de hormônios, considerados disruptores endócrinos, nas águas destinadas ao abastecimento público na região do Rio Paraíba do Sul, SP. Dissertação (mestrado), IPEN/USP, São Paulo, 2010.

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

USEPA-United States Environmental Protection Agency; Research Plan for Endocrine Disruptors, Washington, 1998.

