

MONITORAMENTO DE HORMÔNIOS EM ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ÁGUAS NO VALE DO PARAÍBA, SP. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

Juliana Ikebe Otomo¹; Elâine Arantes Jardim Martins¹; Hélio Akira Furusawa¹; Marycel Elena Barboza Cotrim¹; Maria Aparecida Faustino Pires¹

¹Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN – CNEN/SP; Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, São Paulo, SP, Brasil CEP 05508-900
E-mail: julianaikebe@gmail.com

RESUMO

O aumento das atividades antrópicas com conseqüente degradação da qualidade das águas tem gerado, nas últimas décadas, um aumento nos estudos que avaliam principalmente micropoluentes presentes em águas superficiais e de abastecimento. Os disruptores endócrinos são substâncias químicas, sintéticas ou naturais, pertencentes à classe dos micropoluentes capazes de interferir no sistema endócrino de seres humanos e animais. Os hormônios destacam-se dentre os disruptores endócrinos por serem compostos potencialmente ativos no sistema biológico e estarem relacionados à origem de diversos tipos de cânceres. Este trabalho tem como objetivo apresentar metodologia analítica que foi desenvolvida e validada para determinar hormônios, considerados disruptores endócrinos, e sua aplicação em amostras de água bruta e tratada da região da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul utilizando a técnica de cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas. Pelo processo de validação, a

metodologia desenvolvida pode ser considerada seletiva, robusta, exata, linear e precisa para a análise proposta. Aplicando o procedimento analítico validado nas amostras coletadas, alguns dos compostos estudados puderam ser detectados tanto em água bruta como em água tratada permanecendo abaixo do limite de quantificação, observando-se indícios de contaminação principalmente nas épocas secas.

Descritores: *disruptores endócrinos, validação de metodologia, GC-MS.*

ABSTRACT

The increase of human activities with consequent degradation of water quality has generated at recent decades, many studies which evaluate mainly micro pollutants in surface and supply water. Endocrine disruptors are chemicals, synthetic or natural, from micro pollutants class which can interfering at the humans and animals endocrine system. The hormones stand out among the endocrine

disruptors because they are potentially active in biological systems and are related to the origin of several cancers types. This paper aims to present an analytical methodology developed and validated to determine hormones, considered endocrine disruptors, in drinking water and raw water at Paraíba do Sul River region, using gas chromatography with mass spectrometry detector. By the validation process, the proposed methodology can be considered selective, robust, accurate, linear and precise for the analysis. Applying the validated analytical procedure at samples, some of these compounds were detected at drinking water and raw water below limit of quantization, but were noted signs of contamination at dry season principally in raw water.

Keywords: *endocrine disrupters, validation, GC-MS.*

INTRODUÇÃO

Com o consumo crescente de produtos industrializados e o crescimento populacional, a atividade antrópica passou a representar uma das principais fontes de alteração da qualidade e disponibilidade das águas superficiais, sendo a geração de esgoto doméstico e industrial apontada como principal fator na formação desse cenário de degradação. Isso ocorre devido à deficiência no sistema de tratamento desses efluentes, principalmente em regiões em desenvolvimento onde dificilmente a coleta do esgoto gerado atinge 100% e apenas uma pequena porcentagem desse esgoto coletado chega a receber tratamento antes de ser lançado nos corpos hídricos [1].

Nas últimas décadas, tem crescido a preocupação com a caracterização das águas, visando avaliar sua qualidade e composição, pois a presença de algumas substâncias, mesmo em concentrações baixas ($\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1}), são potencialmente prejudiciais ao ambiente e aos seres vivos. Entre essas substâncias estão presentes os disruptores endócrinos que atuam sobre o sistema endócrino humano e dos animais, mimetizando, bloqueando e/ou interferindo, de alguma maneira, com as instruções naturais dos hormônios às células [2][3][4].

As substâncias alvo deste trabalho são os hormônios naturais femininos estrona, estradiol e progesterona. Os disruptores endócrinos são compostos potencialmente ativos no sistema biológico e estão relacionados à origem de diversos tipos de cânceres. A detecção dessas substâncias em efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) e em águas superficiais e de abastecimento é um forte indicio de ocupação urbana e ineficiência do tratamento oferecido, tanto em ETE's como em ETA's (estações de tratamento de água), além de serem constantemente introduzidas no ambiente [2][3][4].

A área de estudo se refere a quatro cidades pertencentes à Bacia Hidrográfica do rio Paraíba do Sul, que abrange três importantes estados brasileiros de grande participação econômica para o país que são os Estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. Essa região passou a ser densamente ocupada por indústrias e cidades, restringindo a Mata Atlântica original a parques e unidades de conservação, predominando as áreas devastadas que são ocupadas, em maior parte, pela pecuária [5][6].

Essa grande expansão na bacia levou a uma rápida degradação da qualidade da água além da redução de sua disponibilidade hídrica. Os dados que representam a situação de saneamento básico contribuem com o cenário de degradação da região, como pode ser observado na figura 1.

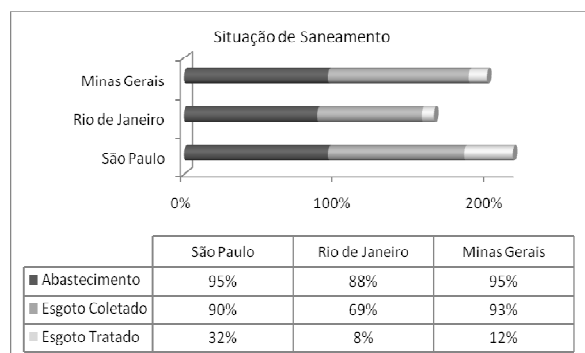


Figura 1. Gráfico da situação de saneamento básico na bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul [4].

Assim, este trabalho tem como objetivo apresentar a metodologia analítica que foi desenvolvida e validada para determinação dos compostos estrona, estradiol e progesterona em amostras de água tratada e bruta, coletadas em quatro ETAs da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul.

MATERIAIS E MÉTODOS

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizados reagentes e solventes de grau analítico e cromatográfico e padrões analíticos, com certificado de pureza de procedência *Aldrich Chemical Co.*

A técnica analítica utilizada para a determinação dos compostos foi a cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas. Para a

preparação e extração das amostras e das matrizes de validação foi utilizado um sistema de filtração e um sistema simples de extração em fase sólida ambos a vácuo.

As amostras de água tratada e água bruta foram coletadas nos municípios de São José dos Campos, Taubaté Guararema e Pindamonhangaba, conforme o Guia de coletas da CETESB (1987)[7], utilizando frascos de vidro âmbar de 1L devidamente lavados e descontaminados.

Para garantir a confiabilidade dos resultados é imprescindível a realização do processo de validação de métodos analíticos, que foi realizado seguindo as recomendações de INMETRO-DOQ CGCRE 008 sobre Validação de Ensaio Químicos.

As amostras foram filtradas em membranas de 0,45 μ m e acidificadas a pH 3 antes da extração em fase sólida. Para a extração foram utilizados cartuchos SPE do tipo C₁₈ de capacidade para 6mL. A percolação de 1L da amostra foi realizada a um fluxo médio de 6mL.min⁻¹. Para eliminação da água nos cartuchos, esses foram centrifugados por 30 minutos a 2500 rpm. Em seguida, foi feita a eluição com 5mL de uma mistura de diclorometano e metanol na proporção de 60:40 (v/v). Por fim, a solução obtida foi concentrada a 1mL por evaporação em fluxo suave de N₂.

Experimentalmente foram definidas as seguintes condições para o método cromatográfico: 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 mL.min⁻¹; injeção de 1 μ L do extrato, utilizando coluna capilar DB-5 e aquisição de dados

no modo SIM monitorando cinco fragmentos de massa de cada composto.

Nos cálculos estatísticos para avaliação dos parâmetros de validação, apresentados a seguir, foram utilizados os dados das áreas obtidas em 3 ensaios: água

tratada, água bruta e sem matriz (somente no solvente). Essas áreas utilizadas nos estudos estatísticos correspondem a sete replicatas de 8 níveis de concentrações diferentes para cada composto, conforme a tabela 1, em cada um dos ensaios.

Tabela 1: Concentrações das soluções de trabalho para cada composto

Composto	Concentração $\mu\text{g.mL}^{-1}$								
Estrona	0,46	0,92	1,15	1,38	1,61	1,84	2,07	2,30	
Estradiol	0,40	0,80	1,00	1,20	1,40	1,60	1,80	2,00	
Progesterona	0,40	0,80	1,00	1,20	1,40	1,60	1,80	2,00	

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados resultados obtidos para os parâmetros de validação citados anteriormente e a avaliação sobre a incerteza de medição dos dados gerados pelo método desenvolvido.

A seletividade é o parâmetro que avalia a capacidade do método em

distinguir uma ou mais substâncias de interesse de outros componentes presentes na solução analisada [8][9]. A seletividade do método desenvolvido foi realizada inicialmente pela avaliação do cromatograma gerado pela injeção da solução padrão mista dos 3 compostos, figura 2, no qual se pode observar a perfeita separação dos picos.

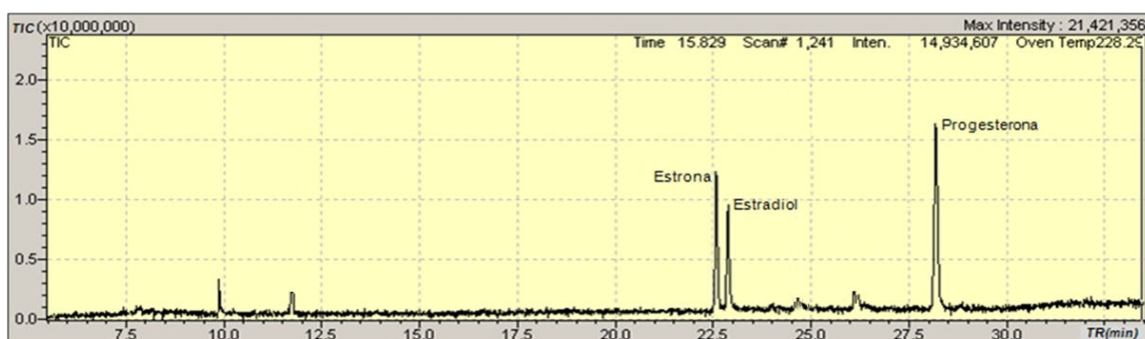


Figura 2. Cromatograma de padrão misto de hormônios obtido em modo SCAN

Outro modo de avaliar a seletividade do método é pela comparação das matrizes por sobreposição das retas obtidas nas curvas analíticas nos três ensaios, realizados conforme procedimento

citado anteriormente. Os gráficos (figura 3) representam as médias das áreas obtidas pelas sete replicatas de cada concentração.

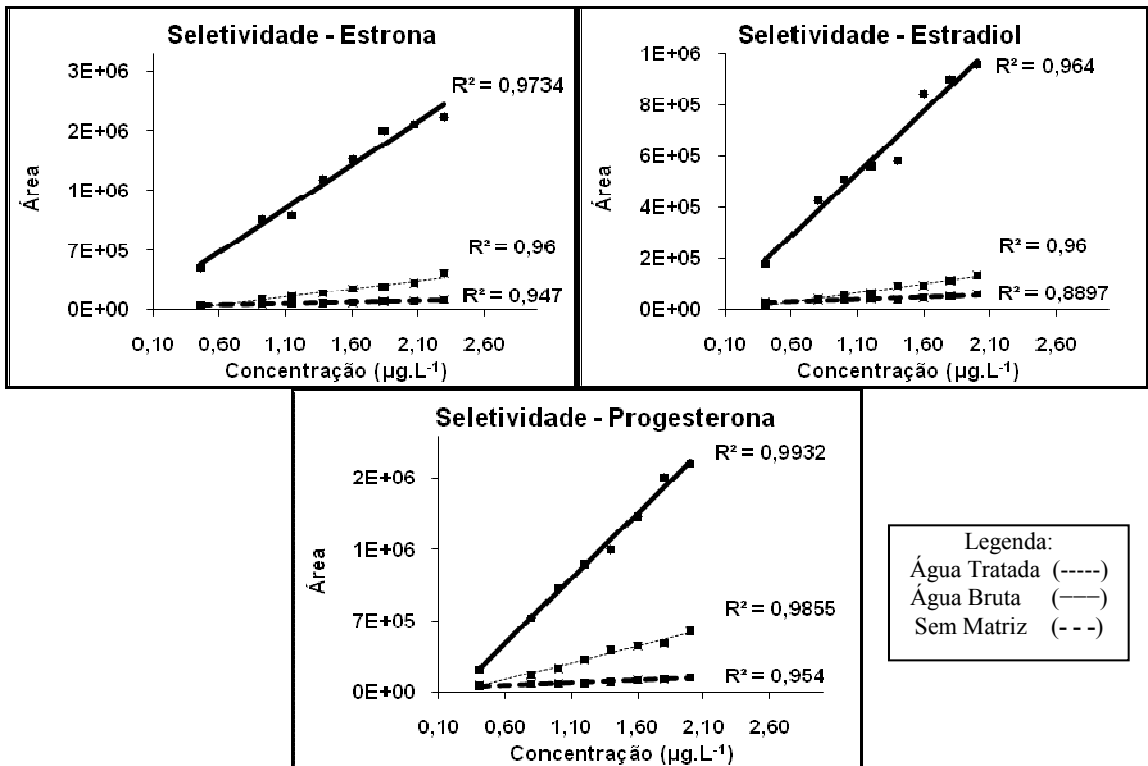


Figura 3. Representação gráfica da seletividade nas matrizes de água tratada, água bruta e sem matriz para os compostos estudados

Complementando o observado na figura 2, onde pode-se constatar que houve separação adequada dos compostos estudados e pela figura 3 conclui-se que existe interferência das diferentes matrizes sobre os compostos alvos, implicando na necessidade de se utilizar uma curva para cada matriz.

A linearidade corresponde à correlação entre uma determinada concentração do analito e o sinal correspondente medido por um método

analítico. Por essa correlação é possível mensurar o analito em uma matriz cuja concentração é desconhecida.

Para a verificação dos desvios da linearidade entre os pontos da curva analítica aplicou-se a análise de resíduos através do teste t (*Student*), além dos gráficos de resíduos e probabilidade normalizada (Figura 4).

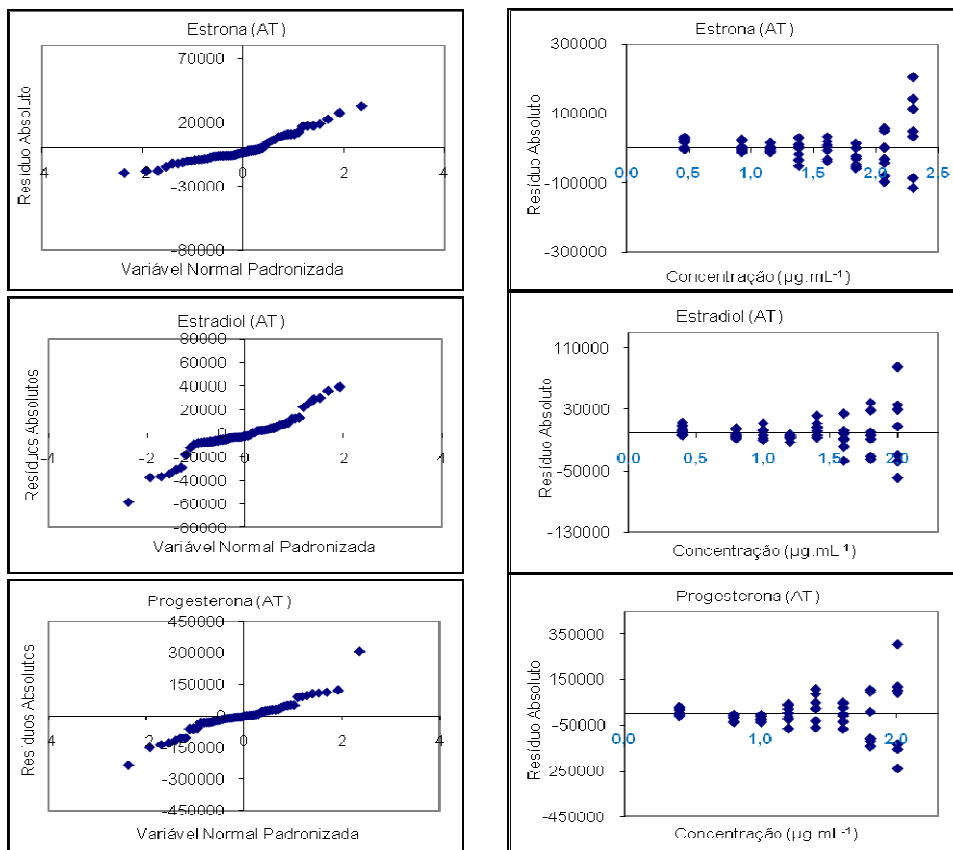


Figura 4. Gráficos e resíduos absoluto e probabilidade normalizada de cada composto estudado

Pelos gráficos de resíduos (Figura 4) pode-se observar que, para todos os compostos, existe uma flutuação maior entre as replicatas das concentrações mais altas. Esse comportamento foi semelhante nos ensaios com água bruta e sem matriz. Entretanto, ao analisar o comportamento dos pontos no gráfico de variável padronizada, observa-se que a maioria dos pontos está distribuída no intervalo de probabilidade de -2 a $+2$, ou seja, dentro de ± 2 desvios padrão, com 95% de confiança. Além disso, a distribuição se aproxima de uma reta, sem grandes tendências que prejudiquem o comportamento linear do método.

A determinação do LD, menor concentração do analito que pode ser detectado com certa confiabilidade, foi feita pela multiplicação do desvio padrão das 7 replicatas de menor concentração da curva analítica pela abscissa t (Student) para $(n-1)$ graus de liberdade com 95% de confiança. O LQ, a menor concentração do analito que pode ser quantificada com segurança, foi obtido pela média de 7 replicatas do primeiro ponto da curva analítica mais seis vezes o desvio padrão obtido das mesmas [9][10]. Os LQ e LD obtidos para as diferentes matrizes estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Limites de quantificação e detecção do método para cada composto em matriz de água tratada e água bruta

Composto	Água Tratada		Água Bruta	
	LQ	LD	LQ	LD
	$\mu\text{g.L}^{-1}$	$\mu\text{g.L}^{-1}$	$\mu\text{g.L}^{-1}$	$\mu\text{g.L}^{-1}$
Estrona	0,86	0,19	0,56	0,07
Estradiol	0,88	0,22	0,55	0,09
Progesterona	0,70	0,12	0,52	0,06

Para cada composto foi obtido um LD e um LQ diferente, pois cada composto apresenta uma sensibilidade distinta no equipamento.

O parâmetro exatidão, essencial em um processo de validação, representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um ensaio definido e o valor de referência aceito como verdadeiro. Para a avaliação da exatidão utiliza-se o índice *z Score*, que consiste na comparação dos valores obtidos pelo material de referência com os valores certificados de acordo com a equação 7, usando como critério:

$|z| \leq 2$, o resultado está satisfatório;
 $2 < |z| < 3$, o resultado é questionável e
 $|z| \geq 3$, o resultado é insatisfatório [9][10].

Tabela 6. Resultados do teste *z Score* para os compostos estudados nas matrizes de água bruta (AB), tratada (AT) e no ensaio sem matriz, no intervalo de concentração baixa

Composto	<i>z Score</i>		
	AB	Sem matriz	AT
Estrona	1,59	0,12	0,12
Estradiol	0,81	0,04	0,40
Progesterona	0,33	0,18	0,83

Na tabela 6 é apresentado o resultado obtido nos três ensaios, onde pode ser observado que nenhum composto apresentou valor de *z* superior a 2, o que significa que o método possui exatidão.

A precisão avalia a dispersão dos valores em amostras medidas em replicatas de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões nas condições estabelecidas. Para verificar a precisão do método, foram realizadas repetições de análises de concentrações diferentes, realizadas no mesmo dia e em dias diferentes e, a partir dos dados obtidos, calculou-se o limite de repetitividade (*r*) em 3 níveis de concentrações, baixa, média e alta, como demonstrado na tabela 8 (ensaio com água tratada e com água bruta).

Tabela 8 - Resumo dos resultados do teste de repetitividade para os compostos estudados na matriz de água tratada e bruta.

Composto	Água Tratada		
	Valores de <i>r</i>		
	Baixa	Média	Alta
Estrona	0,1637	0,1397	0,8405
Estradiol	0,2192	0,2510	0,9660
Progesterona	0,1232	0,0764	0,8673
Composto	Água Bruta		
	Valores de <i>r</i>		
	Baixa	Média	Alta
Estrona	0,0756	0,1031	0,2847
Estradiol	0,0880	0,3826	0,1769
Progesterona	0,0596	0,1497	0,4845

Para considerar a precisão do método, a diferença entre as replicatas não deve ser superior ao valor de r obtido, resultado este que foi observado neste estudo [9].

A robustez mede o quanto um método pode ser considerado sensível frente a pequenas e deliberadas variações, transmitindo a confiabilidade do método em condições normais de operação, permitindo fixar as tolerâncias dos fatores do método. Assim, um método é considerado robusto quando ele não é afetado por essas variações [8][9][10].

Na avaliação da robustez o INMETRO (2010) recomenda a execução do Planejamento fatorial saturado para avaliação da estimativa do erro da distribuição dos efeitos, onde devem ser consideradas 7 variáveis do método que mais influenciem na resposta da análise o resultado sendo arranjadas em 8 ensaios distintos. Assim, é possível verificar a robustez do método e ordenar a influência de cada variável selecionada [8][10].

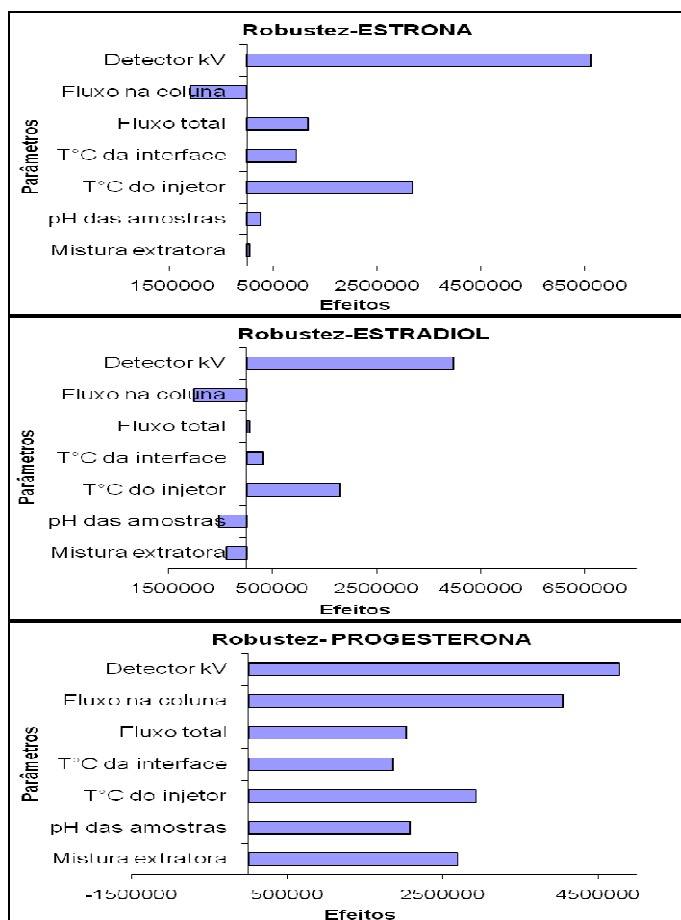


Figura 5. Representação gráfica do teste de verificação de significância dos efeitos no ensaio de robustez para os compostos estudados

Nos gráficos apresentados na figura 5, observa-se que para os compostos estrona e estradiol e o fator de maior influência positiva é a voltagem do detector e a temperatura do injetor e o fator de maior influência negativa é o fluxo da coluna.

Somente a progesterona apresentou influência positiva para todas as variações, significando que as variações possam favorecer este composto na determinação. Entretanto uma alteração na metodologia baseada somente nesse composto não se faz necessária, pois o método proposto apresentou boa reprodutibilidade também para este composto.

Pela avaliação dos gráficos de *rankit* confrontadas com os gráficos de probabilidade normal (figura 6), observa-se que os efeitos das variações aplicadas não afetam de forma significativa os resultados, pois os valores obtidos encontram-se abaixo do limite mais crítico ME (*Margin of Error*), entretanto, mesmo valores muito próximos dessa margem de erro indicam os parâmetros aos quais deve ser dada uma maior atenção durante o procedimento [11][12][13].

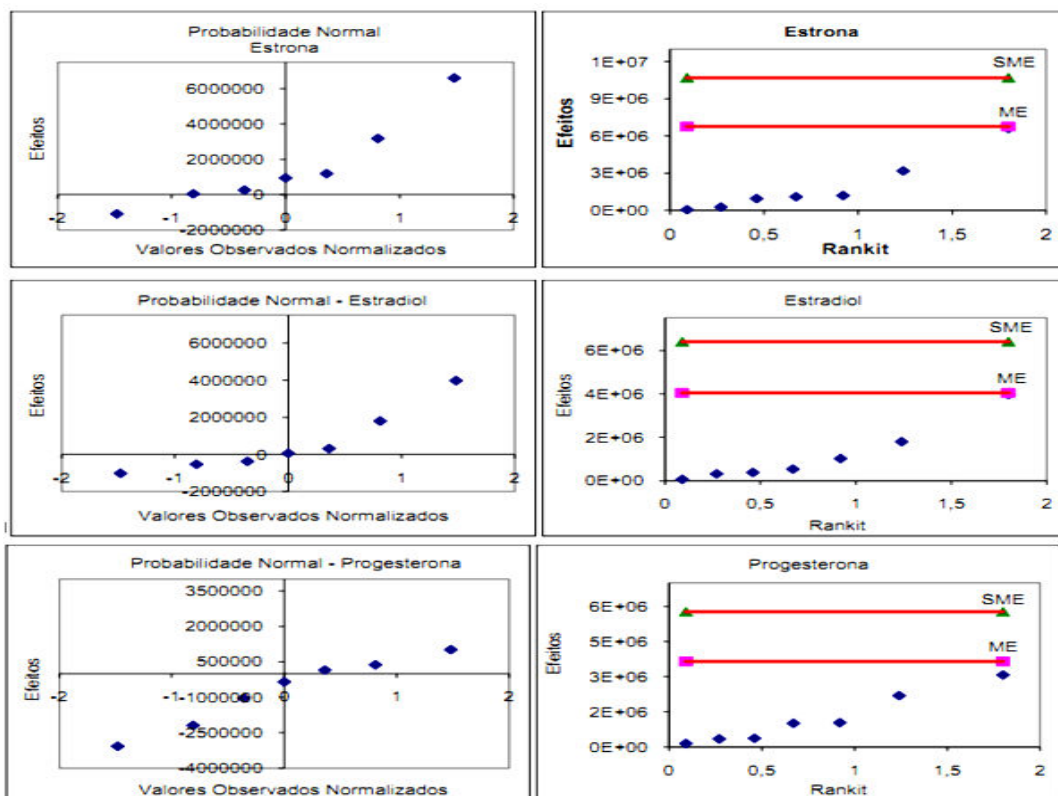


Figura 6. Gráficos de probabilidade normal e rankit para os compostos estudados

Também pela avaliação do gráfico de probabilidade normal pode-se observar que os valores obtidos estão bem distribuídos entre -2 e +2 desvios padrão, o que significa que provavelmente não haja *outliers* e as alterações na metodologia não afetam de forma significativa os resultados.

Para todos os compostos a voltagem do detector é o parâmetro que obteve resultado mais próximo de ME, significando que a este parâmetro deve ser dada uma atenção especial, pois a robustez para ele é mais restrita.

AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS

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 e fevereiro e junho de 2010 contemplando dessa forma épocas secas e chuvosas. Os resultados positivos obtidos são apresentados na tabela 12.

No período correspondente às épocas secas (março e setembro de 2009), foram encontrados resultados positivos na matriz de água tratada e apenas estradiol na matriz de água bruta, porém quase todos abaixo do limite estabelecido pela metodologia. Nas coletas referentes ao período chuvoso (fevereiro e junho/2010), não foi detectada a presença de nenhum dos compostos, sendo, portanto, reportados como menor que o limite de detecção da metodologia.

Tabela 12. Resultados das amostras de água bruta e tratada, referentes às coletas de 2009

Água Tratada em $\mu\text{g.L}^{-1}$					
Período	Composto	Pindamonhangaba	Taubaté	São José dos Campos	Guararema
1ª coleta	Estrona	<0,86	<0,86	<0,86	<0,86
	Estradiol	<0,88	<0,88	<0,88	<0,88
	Progesterona	< LD	< LD	< LD	< LD
2ª coleta	Estrona	<0,86	<0,86	<0,86	<0,86
	Estradiol	$0,89 \pm 0,20$	<0,88	<0,88	<0,88
	Progesterona	<0,70	< LD	< LD	< LD
Água Bruta em $\mu\text{g.L}^{-1}$					
Período	Composto	Pindamonhangaba	Taubaté	São José dos Campos	Guararema
1ª coleta	Estrona	< LD	< LD	< LD	< LD
	Estradiol	<0,55	<0,55	<0,55	<0,55
	Progesterona	< LD	< LD	< LD	< LD
2ª coleta	Estrona	< LD	< LD	< LD	< LD
	Estradiol	<0,55	<0,55	<0,55	<0,55
	Progesterona	< LD	< LD	< LD	< LD

CONCLUSÃO

Conforme objetivo proposto, a metodologia desenvolvida para determinação dos compostos estrona, estradiol e progesterona em amostras de água bruta e tratada das Estações de Tratamento de Água (ETA) da região da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul, atendeu satisfatoriamente aos parâmetros de validação avaliados, conforme as diretrizes do documento DOQ-CGCRE-008 do INMETRO (2010).

O método desenvolvido é sensível e seletivo, visto que os compostos estudados apresentaram boa separação entre eles e ausência de picos coeluídos. A metodologia possui precisão, repetibilidade e reprodutibilidade, apesar de apresentar pequena dispersão dos resultados entre ensaios repetidos, o que pode ser atribuído à injeção manual. Devido à boa linearidade obtida, o método fornece resultados de área diretamente proporcionais à concentração dos analitos dentro de uma variação estatisticamente aceitável, sendo possível quantificar as amostras de forma segura e confiável.

A metodologia se mostrou estável frente a pequenas alterações para todos os compostos. Embora o ensaio de robustez tenha apontado uma influência positiva de todos os parâmetros para a progesterona, a alteração no método original não foi necessária frente aos resultados satisfatórios de validação com os parâmetros originais para este composto.

Empregando a metodologia validada na avaliação das amostras, foi possível observar que a região estudada apresenta uma pequena contaminação principalmente em períodos secos, o que

pode estar relacionada à pouca diluição dos poluentes nesse período.

AGRADECIMENTOS

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

REFERENCIAS

- [1] LIBÂNIO, M. Fundamentos de qualidade e tratamento de água. 2.ed. Campinas, SP: Editora Átomo, 2008.
- [2] REIS FILHO; R. W.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E.M.. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. *Quím. Nova*. vol.29, nº.4, São Paulo July/Aug., 2006.
- [3] BILA, D. M.; DEZOTTI, M.; Fármacos no meio ambiente. *Quim. Nova*, V. 26, nº 4, p. 523-530, 2003.
- [4] 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 de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/USP, São Paulo, 2010.
- [5] GRUBEN, A.; LOPES, P. D.; JOHNSSON, 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.
- [6] COPPETEC. Associação Pró-Gestão das águas da Bacia Hidrográfica do rio

- Paraíba do Sul – AGEVAP.
Diagnóstico dos recursos hídricos -
Relatório final, 2006.
- [7] CETESB – Companhia de Tecnologia
de Saneamento Ambiental. Guia de
coleta e preservação de amostras de
água. 1987.
- [8] 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.
- [9] INMETRO - Instituto Nacional de
Metrologia. **Orientação sobre
validação de métodos de ensaios
químicos**. Rio de Janeiro. DOQ-
CGCRE-008. Revisão 03. Fev. 2010.
- [10] BUENO, P. C. P.
Desenvolvimento e validação de
metodologia analítica em
cromatografia gasosa para o controle
de qualidade de *Eucalyptus globulus* e
seus produtos: planta desidrata,
extratos, óleo essencial e xarope de
eucalipto. Dissertação (Mestrado) –
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- [11] FURUSAWA, H. A. Validação de
Ensaio Químico. IPEN-CNEN/SP,
(adaptação eletrônica baseada no
documento DOQ-CGCRE-008 de
01/03/2003 do INMETRO). São
Paulo, 2007.
- [12] VANDER HEYDEN, Y.;
NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE,
J.; VANDEGINSTE, B.G.M.;
MASSART, D.L.; Guidance for
robustness/ruggedness tests in method
validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*,
24, 2001.
- [13] ZEAITER, M.; ROGER, J.M.;
BELLON-MAUREL, V.;
RUTLEDGE, D.N.; Robustness of
models developed by multivariate
calibration. Part I: The assessment of
robustness. *Trends Anal. Chem.*, v. 23,
n. 2, 2004.