

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação dos hormônios sintéticos 17 α -etinilestradiol e levonorgestrel em águas superficiais

Development and validation of analytical methodology for determination of synthetic hormones 17 α -ethynylestradiol and levonorgestrel in surface water

Bruna dos Reis Monteiro, Sandro José de Andrade

^{1,2} Instituto de Física e Química, Universidade Federal de Itajubá, MG, BRASIL

Resumo

A sociedade moderna adotou um sistema de desenvolvimento que não tem levado em conta os impactos ao meio ambiente. Recentemente, muitas substâncias lançadas nos corpos d'água têm sido estudadas devido a sua capacidade de causar alterações nos sistemas endócrinos dos seres vivos. Uma destas substâncias é o hormônio sintético 17 α -etinilestradiol, reconhecidamente um potente disruptor endócrino. Este hormônio é usualmente utilizado como um dos princípios ativos das pílulas anticoncepcionais, muitas vezes, associado ao levonorgestrel. Como essas substâncias são descartadas em corpos d'água, uma metodologia analítica confiável se faz necessária para quantificação destas espécies. Diante disso, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para determinar os hormônios sintéticos 17 α -etinilestradiol e levonorgestrel em águas superficiais, utilizando a técnica cromatografia líquida de alta eficiência. Para a validação do método os seguintes parâmetros foram avaliados: seletividade, precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Resultados satisfatórios foram obtidos nos ensaios de recuperação com amostras de água fortificadas com os analitos. A metodologia desenvolvida e validada se mostrou apropriada quando testada com amostras do Rio Sapucaí na cidade de Itajubá (MG).

Palavras-chave: Validação. Metodologia analítica. Águas superficiais. Hormônios sintéticos. Rio Sapucaí

Abstract

The modern society has adopted a development system that has not taken into account the impacts on the environment. Recently, many substances discharged into bodies of water have been studied due to its capacity to cause changes in the endocrine system of living beings. One of these substances is the synthetic hormone 17 α -ethynylestradiol, admittedly a powerful endocrine disruptor. This hormone is commonly used as one of the active ingredients of birth control pills, often associated with levonorgestrel. As these substances are disposed in bodies of water, a reliable analytical methodology is needed to quantify these species. Thus, this study aimed at the development and validation of an analytical methodology to determine the synthetic hormones 17 α -ethynylestradiol and levonorgestrel in surface waters, using the high performance liquid chromatography technique. For the method validation the following parameters were evaluated: selectivity, precision, accuracy, linearity, limit of detection, limit of quantification and robustness. Satisfactory results were obtained in recovery studies with water samples fortified with the analytes. The developed and validated methodology was proved appropriate when tested with samples from the Sapucaí River in the city of Itajubá (MG).

Keywords: Validation. Analytical methodology. Surface water. Synthetic hormones. Sapucaí River

1 Introdução

A poluição do ecossistema aquático é um assunto alvo de um grande número de pesquisas, devido à necessidade e escassez da água potável (GORGA et al., 2015). Com o crescimento da economia e desenvolvimento urbano, um grande número de rios enfrenta sérios problemas de poluição, proveniente, principalmente, da indústria, agricultura, hospitais e residências (HUANG et al., 2015; KUMAR et al., 2014). Dentre os poluentes estudados, os hormônios pertencem a uma categoria que necessita uma atenção especial. Essas substâncias, apesar do potencial dano que podem causar ao ecossistema aquático, não apresentam legislação específica, ou seja, não são regulamentadas (JARDIM et al., 2012). A presença de estrogênios em ambientes aquáticos pode causar inúmeros problemas à biota, como feminilização, infertilidade e anomalias físicas em peixes (BELHAJ et al., 2015; GORGA et al., 2015; HUANG et al., 2015). Devido aos problemas desencadeados pela presença desses micropoluentes, atualmente são desenvolvidos inúmeros métodos para a remediação e monitoramento dos mesmos no ambiente aquático (GAVRILESCU et al., 2015; LI et al., 2014).

Hormônios são substâncias secretadas por glândulas e responsáveis por coordenar diversas funções do corpo humano, como homeostase, reprodução, desenvolvimento e comportamento (ARIS et al., 2014; GHISELLI e JARDIM, 2007). Tais substâncias também podem ser sintéticas, como o 17α -etinilestradiol (EE2) e o levonorgestrel (LNG) (Tabela 1), usadas na pílula anticoncepcional e terapias de substituição hormonal (HAMID e ESKICIOGLU, 2012). Desse modo, o destino desses hormônios tanto ingeridos, como produzidos pelo próprio organismo é o esgoto e, conseqüentemente, o ambiente aquático.

De acordo com muitos trabalhos, a remoção destas substâncias é ineficiente na maioria das Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs) (MOON et al., 2008), como resultado, os mesmos são encontrados em águas superficiais e também em água potável utilizada para

abastecimento público (AL-ODAINI et al., 2010; PESSOA et al., 2014).

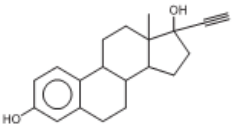
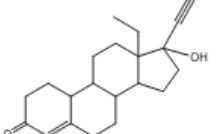
O desenvolvimento da instrumentação e das metodologias analíticas permite que essas substâncias sejam determinadas, atualmente, em níveis de traços (ZAFRA-GÓMEZ et al., 2008; SODRÉ et al., 2010).

As técnicas cromatográficas, tais como cromatografia à gás (CG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são as mais utilizadas para a análise dessas substâncias. No entanto, devido à baixa concentração dessas substâncias nas águas superficiais (na ordem de ng L^{-1}), uma técnica de concentração dos analitos da amostra geralmente precede a análise cromatográfica (WANG et al., 2006). A extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) é atualmente a técnica mais utilizada como pré-tratamento para extração e enriquecimento de analitos em matrizes ambientais aquosas (RUBIO e PEREZ-BENDITO, 2009; LIN et al., 2013).

Uma etapa indispensável para a utilização de uma metodologia analítica é a validação da mesma. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), “a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004). Os parâmetros analíticos normalmente estudados na validação de métodos cromatográficos são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez. Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito (RIBANI et al., 2004; RIBANI et al., 2014).

Neste trabalho foi desenvolvido um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação dos hormônios sintéticos 17α -etinilestradiol e levonorgestrel em águas superficiais. Na validação do método foram estudados os parâmetros seletividade, precisão (intra e interensaio), exatidão, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas das substâncias estudadas

| | 17α -etinilestradiol | levonorgestrel |
|---|---|--|
| CAS | 57-63-6 | 797-63-7 |
| Fórmula molecular | $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_2$ | $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_2$ |
| Massa molecular (g mol^{-1}) | 296,41 | 312,44 |
| Estrutura química |  |  |

Fonte: Modificado de GHISELLI e JARDIM, 2007

2 Material e Método

2.1 Equipamentos, materiais, reagentes e solventes

Os padrões dos hormônios utilizados na pesquisa foram 17α -etinilestradiol (Fluka) e levonorgestrel (European Pharmacopeia), ambos com pureza superior a 99%. As soluções-estoque utilizadas foram preparadas em metanol na concentração de 100 mg L^{-1} . Todos os solventes utilizados foram de alta pureza com grau espectroscópico ou grau HPLC. Água deionizada foi obtida de um sistema Direct-Q (Millipore). Para filtração da água foram utilizados filtros de éster de celulose de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ de poro (Millipore). Para a extração em fase sólida foram usados cartuchos C-18 ($500 \text{ mg}/6\text{mL}$) do fabricante Macherey-Nagel e um sistema *Vacuum Manifold* (Supeco). O sistema cromatográfico utilizado neste trabalho foi um cromatógrafo modelo Infinity 1260 da Agilent Technologies, composto de uma bomba quaternária, um injetor automático, um módulo de aquecimento de coluna, um detector ultravioleta e um detector de fluorescência. A coluna cromatográfica utilizada foi uma Eclipse Plus C8 ($4,6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm} - 5 \text{ }\mu\text{m}$), também da Agilent Technologies.

2.2 Desenvolvimento e validação da metodologia analítica

No desenvolvimento da metodologia analítica as condições ótimas encontradas foram as seguintes:

Fase móvel: acetonitrila:água (60:40) – modo isocrático;

Vazão da fase móvel: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$;

Volume de injeção: $10 \text{ }\mu\text{L}$;

Temperatura da coluna cromatográfica: $45 \text{ }^\circ\text{C}$;

Comprimento de onda do detector UV: 240 nm ;

Comprimentos de onda do detector de fluorescência: $\lambda_{\text{ex}} - 230 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{ex}} - 310 \text{ nm}$.

Nessas condições cromatográficas, utilizando o sistema cromatográfico descrito anteriormente, os tempos de retenção para o 17α -etinilestradiol e levonorgestrel foram aproximadamente de 5,25 e 7,00 minutos, respectivamente. Esta metodologia analítica foi validada de acordo com o trabalho de Ribani e colaboradores (RIBANI et al., 2004). Os parâmetros seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão (intra e interensaio) e robustez foram avaliados.

2.2.1 Seletividade

Cartuchos de extração em fase sólida foram condicionados com 5 mL de metanol. Por esse cartucho foi percolado 1 L de água deionizada (com $\text{pH}=4$ ou $\text{pH}=8$). Na seqüência procedeu-se o processo de eluição com 5 mL de metanol ou 5 mL de acetato de etila numa vazão de 5 mL min^{-1} ou 10 mL min^{-1} . O extrato obtido em cada um dos casos foi deixado em banho-maria até secar e posteriormente dissolvido em 1 mL da mistura

acetonitrila:água (60:40), filtrado e injetado no sistema CLAE.

2.2.2 Linearidade

A linearidade foi verificada a partir da diluição da solução-estoque para concentrações de 10, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 e $1000 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. A diluição foi realizada no mesmo solvente da fase móvel (acetonitrila:água na proporção de 60:40). A equação da reta e o coeficiente de determinação (r^2) foram obtidos para os dois analitos (EE2 e LNG).

2.2.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

As soluções preparadas para o teste de linearidade foram utilizadas para a determinação do LD e do LQ. O LD e o LQ foram determinados pela razão sinal/ruído (S/R). Foi considerado como LD do método a razão S/R igual a 3,3 e LQ do método a razão S/R igual a 10.

2.2.4 Precisão (intra-ensaio e interensaio)

Para a determinação da precisão intra-ensaio, um analista preparou, a partir das soluções-estoque, 6 soluções de concentração $400 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ dos dois analitos (EE2 e LNG). Estas soluções foram injetadas no mesmo dia no sistema CLAE. Para a verificação da precisão interensaio, outro analista, em um dia diferente, executou o mesmo procedimento realizado para a determinação da precisão intra-ensaio.

2.2.5 Exatidão

Como não havia disponibilidade de material de referência certificado (CRM, do inglês Certified Reference Material) de água contaminada com EE2 e LNG, foram preparadas, em triplicatas, soluções em três níveis de fortificação ($0,2$, $0,4$ e $0,6 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) desses dois analitos. A exatidão do método foi avaliada pela recuperação (R) em triplicata, em cada nível de concentração e os resultados foram expressos em porcentagem.

2.2.6 Robustez

A robustez foi determinada utilizando-se soluções de concentração $400 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, variando-se em $\pm 5\%$, o volume de injeção, a temperatura do módulo da coluna e a composição da fase móvel. Os valores obtidos foram comparados com as condições normais da metodologia desenvolvida.

2.3 Amostragem e preparo das amostras

O município de Itajubá está localizado ao sul do estado de Minas Gerais e contém uma população de aproximadamente 90.000 habitantes (Figura 1). A área territorial do município é de $294,835 \text{ km}^2$ (IBGE, 2015). A cidade está localizada na bacia hidrográfica do Rio Sapucaí. A bacia hidrográfica do Rio Sapucaí integra a bacia do Rio Grande. O rio Sapucaí nasce na Serra da Mantiqueira, na cidade de Campos de Jordão (SP), a

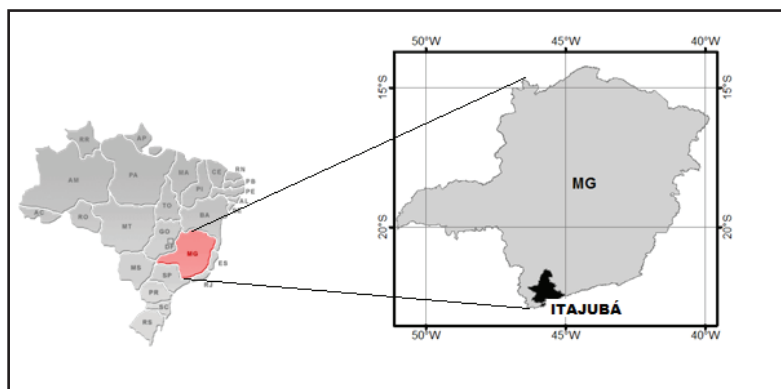


Figura 1: Localização do município de Itajubá.

uma altitude de 1650 m e deságua no lago de Furnas a 780 m de altitude, atravessando aproximadamente 343 km (34 km dentro do estado de São Paulo e 309 km em Minas Gerais). A parte mineira da bacia do Rio Sapucaí abrange um total de 40 municípios, possui uma população estimada de 530 mil habitantes e uma área drenada de aproximadamente 9 mil quilômetros quadrados (IGAM, 2015). Diante disso, um estudo sobre a qualidade das águas do Rio Sapucaí nessa região se faz necessário. A amostragem foi realizada na região urbana de Itajubá, abrangendo todo o perímetro urbano da mesma, como mostrado na Figura 2. A Tabela 2 apresenta as coordenadas georreferenciadas dos cinco pontos de coleta.

Os locais de amostragem foram escolhidos mediante fatores que potencialmente poderiam influenciar,

diretamente ou indiretamente, de forma significativa, a qualidade do corpo d’água, incluindo descargas, tanto pontuais quanto difusas. A amostragem foi realizada no período chuvoso (dezembro/2014). Toda a amostra coletada foi mantida refrigerada até o procedimento de extração. A extração e a análise cromatográfica foram realizadas o mais rápido possível para evitar eventuais degradações. A quantificação dos analitos se deu pelo o método de padronização externa, no qual as concentrações dos hormônios nos extratos foram determinadas pela substituição da área do pico na equação da reta, do tipo $y = ax + b$ (y = área do pico e x = concentração do analito), obtida pela injeção de concentrações conhecidas dos padrões dos analitos correspondentes.

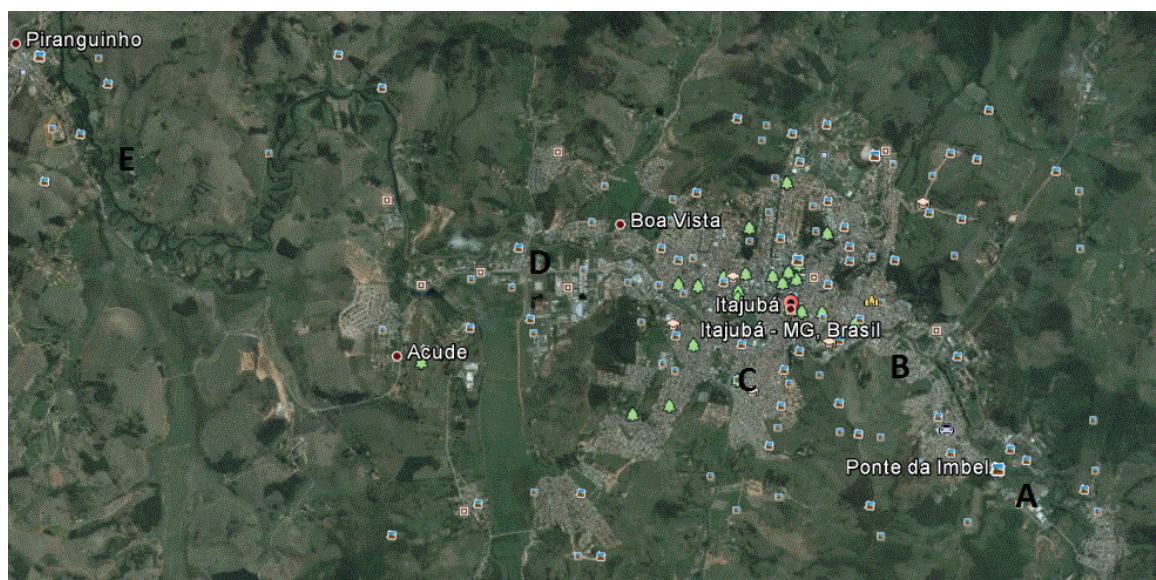


Figura 2 - Localização dos cinco pontos de coleta (Fonte: GOOGLE, 2012)

Tabela 2 - Coordenadas georreferenciadas dos cinco pontos de coleta

| PONTOS | A | B | C | D | E |
|-------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Latitude (Sul) | 22°26'34'' | 22°25'46'' | 22°25'44'' | 22°25'13'' | 22°24'37'' |
| Longitude (Oeste) | 45°25'52'' | 45°26'45'' | 45°27'44'' | 45°28'50'' | 45°31'37'' |
| Elevação (m) | 854 | 852 | 848 | 844 | 842 |

Fonte: GOOGLE, 2012

2.4 Exatidão do método

Com o objetivo de calcular a exatidão do método, foi montado um planejamento de experimento de recuperação no Minitab 16[®] mantendo-se fixo o volume de água (1L) e o solvente de condicionamento do cartucho (5 mL de metanol). Foram alterados o pH da água (4 ou 8), o solvente de eluição (metanol ou acetato de etila) e a vazão do solvente de eluição (5 ou 10 mL min⁻¹). A Tabela 3 mostra o planejamento realizado (planejamento fatorial completo com três níveis e ordem 2).

Cartuchos de SPE foram condicionados com 5 mL de metanol. Por esse cartucho foi percolado 1 L de água deionizada (com pH=4 ou pH=8) fortificada com as soluções estoque dos analitos de maneira a se obter concentração igual 0,5 µg L⁻¹. Na seqüência procedeu-

se o processo de eluição com 5 mL de metanol ou 5 mL de acetato de etila numa vazão de 5 mL min⁻¹ ou 10 mL min⁻¹. Os extratos foram deixados em banho-maria até secar e posteriormente dissolvidos em 1 mL da mistura acetoneitrila:água (60:40), filtrados e injetados no sistema CLAE. Depois de encontrada a melhor condição de extração, o procedimento para a determinação da exatidão do método foi conduzido conforme item 2.2.5.

2.5 Determinação dos hormônios nas águas do Rio Sapucaí

Depois de determinada a melhor condição para o cálculo da recuperação, tal condição foi utilizada para determinar a concentração dos analitos nas águas do Rio Sapucaí, na cidade de Itajubá/MG.

Tabela 3 - Planejamento de experimento de recuperação realizado

| EXPERIMENTO | CONDIÇÕES | | |
|-------------|-------------|----------------------|-----------------------------|
| 1 | -1 (pH = 4) | -1 (metanol) | -1 (5mL min ⁻¹) |
| 2 | 1 (pH = 8) | -1 (metanol) | -1 (5mL min ⁻¹) |
| 3 | -1 (pH = 4) | 1 (Acetato de etila) | -1 (5mL min ⁻¹) |
| 4 | 1 (pH= 8) | 1 (Acetato de etila) | -1 (5mL min ⁻¹) |
| 5 | -1 (pH= 4) | -1 (metanol) | 1 (10mL min ⁻¹) |
| 6 | 1 (pH = 8) | -1 (metanol) | 1 (10mL min ⁻¹) |
| 7 | -1 (pH = 4) | 1 (Acetato de etila) | 1 (10mL min ⁻¹) |
| 8 | 1 (pH = 8) | 1(Acetato de etila) | 1 (10mL min ⁻¹) |
| 9 | -1 (pH = 4) | -1 (metanol) | -1 (5mL min ⁻¹) |
| 10 | 1 (pH = 8) | -1 (metanol) | -1 (5mL min ⁻¹) |
| 11 | -1 (pH = 4) | 1 (Acetato de etila) | -1 (5mL min ⁻¹) |
| 12 | 1 (pH= 8) | 1 (Acetato de etila) | -1 (5mL min ⁻¹) |
| 13 | -1 (pH= 4) | -1 (metanol) | 1 (10mL min ⁻¹) |
| 14 | 1 (pH = 8) | -1 (metanol) | 1 (10mL min ⁻¹) |
| 15 | -1 (pH = 4) | 1 (Acetato de etila) | 1 (10mL min ⁻¹) |
| 16 | 1 (pH = 8) | 1(Acetato de etila) | 1 (10mL min ⁻¹) |
| 17 | -1 (pH = 4) | -1 (metanol) | -1 (5mL min ⁻¹) |
| 18 | 1 (pH = 8) | -1 (metanol) | -1 (5mL min ⁻¹) |
| 19 | -1 (pH = 4) | 1 (Acetato de etila) | -1 (5mL min ⁻¹) |
| 20 | 1 (pH= 8) | 1 (Acetato de etila) | -1 (5mL min ⁻¹) |
| 21 | -1 (pH= 4) | -1 (metanol) | 1 (10mL min ⁻¹) |
| 22 | 1 (pH = 8) | -1 (metanol) | 1 (10mL min ⁻¹) |
| 23 | -1 (pH = 4) | 1 (Acetato de etila) | 1 (10mL min ⁻¹) |
| 24 | 1 (pH = 8) | 1(Acetato de etila) | 1 (10mL min ⁻¹) |

3 Resultados e Discussão

O hormônio EE2 apresentou na detecção por ultravioleta, em 240 nm e no detector de fluorescência com $\lambda_{ex} - 230$ nm e $\lambda_{em} - 310$ nm. O hormônio LNG não apresentou fluorescência. Diante dessas informações, o hormônio EE2 foi determinado por fluorescência e o LNG por ultravioleta.

A seletividade do método foi confirmada, pois os cromatogramas do extrato “branco” (ausência dos analitos) não apresentaram nenhum pico próximo à região do tempo de retenção do EE2 (5,25 minutos) e do LNG (7,00 minutos) como pode ser visualizado nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

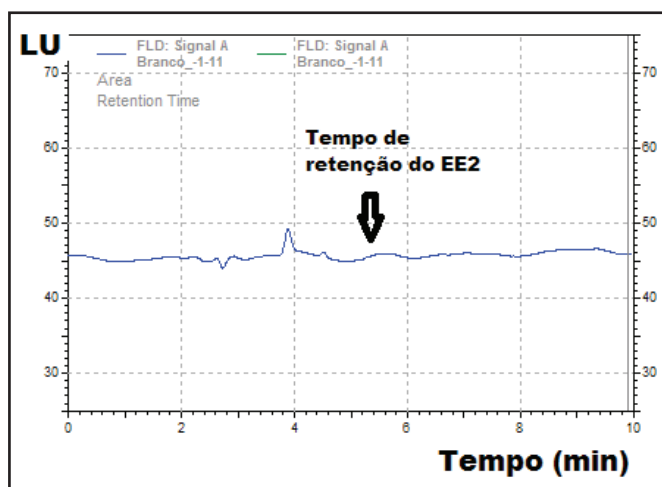


Figura 3 - Cromatograma do “branco” do EE2

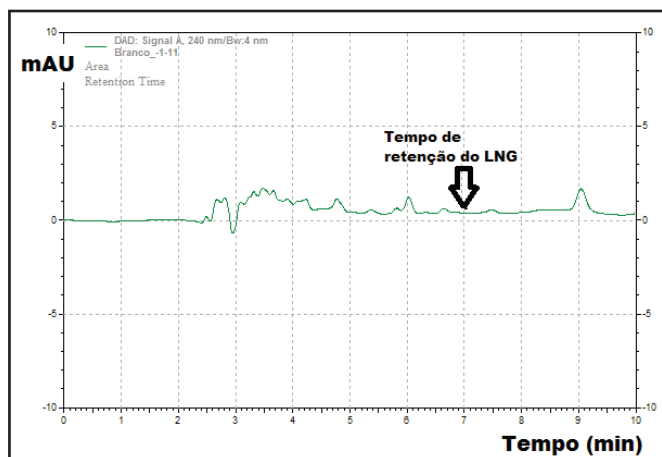


Figura 4 - Cromatograma do extrato “branco” do LNG

A metodologia validada se mostrou linear para ambos os analitos, no intervalo de concentração estudado. O EE2 e o LNG apresentaram coeficiente de determinação (r^2) de 0,9973 e 0,9980, respectivamente. O EE2 se mostrou linear entre 10 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o LNG se mostrou linear na faixa de 25 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, conforme Figuras 5 e 6, respectivamente.

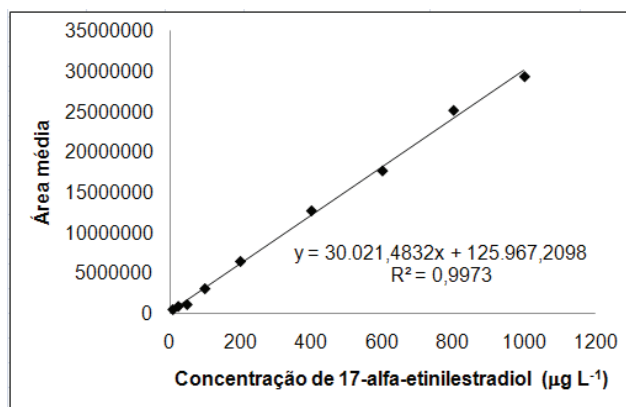


Figura 5 -Linearidade do EE2 na faixa estudada

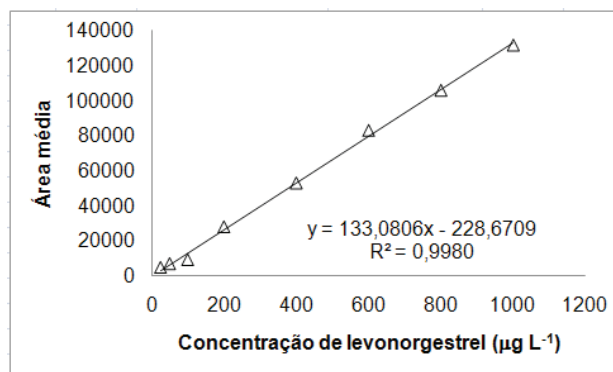


Figura 6 - Linearidade do LNG na faixa estudada

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para o EE2 foram 10 e 30 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Para o LNG, o LD foi de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ e o LQ foi de 75 $\mu\text{g L}^{-1}$. Esses valores são obtidos com a amostra injetada no sistema cromatográfico. No entanto, estas amostras foram concentradas mil vezes (de 1 L de água para 1 mL). Diante disso, a metodologia validada permite quantificar o EE2 numa concentração de 30 ng L^{-1} e o LNG numa concentração de 75 ng L^{-1} de água.

A metodologia validada se mostrou precisa tanto intra-ensaio, quanto no estudo interensaio. Na precisão intra-interensaio obteve-se coeficiente de variação (CV) de 5,5% para o EE2 e de 1,1% para o LNG. Para determinação da precisão interensaio foi utilizado o teste *t de Student*. Os resultados obtidos para $t_{calculado}$ foram comparados com os resultados de $t_{tabelado}$. Os dados se mostraram precisos para uma confiabilidade de 95%.

A exatidão do método foi avaliada em triplicata e em três níveis de concentração (0,2, 0,4 e 0,6 $\mu\text{g L}^{-1}$). A Tabela 4 apresenta uma síntese dos resultados.

Os dados apresentados na Tabela 4 mostram que, para ambos os analitos (EE2 e LNG) a exatidão ficou compreendida entre 90 e 110% com CV inferior a 10%. Esses valores são considerados satisfatórios para esses níveis de concentração.

A robustez do método foi avaliada alterando, pro-

Tabela 4 - Dados de exatidão do método

| Condição cromatográfica alterada | EE2 | | LNG | |
|---|-----------------|--------|-----------------|--------|
| | Recuperação (%) | CV (%) | Recuperação (%) | CV (%) |
| Volume de injeção = 9,5µL | 109,6 | 5,7 | 97,1 | 2,2 |
| | 98,1 | | 97,8 | |
| | 103,4 | | 101,1 | |
| Volume de injeção = 10,5µL | 109,9 | 1,3 | 108,1 | 0,3 |
| | 107,5 | | 107,7 | |
| | 109,4 | | 108,2 | |
| Temperatura da coluna = 42,75 °C | 107,4 | 1,1 | 107,7 | 0,9 |
| | 108,6 | | 106,0 | |
| | 106,4 | | 106,0 | |
| Temperatura da coluna = 42,75 °C | 100,3 | 5,5 | 104,5 | 2,2 |
| | 109,8 | | 107,6 | |
| | 109,8 | | 109,2 | |
| Fase móvel 57% ACN 43% H ₂ O | 107,3 | 1,4 | 104,8 | 0,7 |
| | 110,0 | | 105,7 | |
| | 108,0 | | 106,2 | |
| Fase móvel 63% ACN 37% H ₂ O | 109,7 | 4,5 | 106,9 | 0,7 |
| | 109,6 | | 107,8 | |
| | 101,8 | | 106,3 | |

*concentração na água fortificada e **concentração após concentração de 1000 vezes.

Tabela 5 - Dados de robustez do método

| Condição cromatográfica alterada | EE2 | | LNG | |
|---|-----------------|--------|-----------------|--------|
| | Recuperação (%) | CV (%) | Recuperação (%) | CV (%) |
| Volume de injeção = 9,5µL | 109,6 | 5,7 | 97,1 | 2,2 |
| | 98,1 | | 97,8 | |
| | 103,4 | | 101,1 | |
| Volume de injeção = 10,5µL | 109,9 | 1,3 | 108,1 | 0,3 |
| | 107,5 | | 107,7 | |
| | 109,4 | | 108,2 | |
| Temperatura da coluna = 42,75 °C | 107,4 | 1,1 | 107,7 | 0,9 |
| | 108,6 | | 106,0 | |
| | 106,4 | | 106,0 | |
| Temperatura da coluna = 42,75 °C | 100,3 | 5,5 | 104,5 | 2,2 |
| | 109,8 | | 107,6 | |
| | 109,8 | | 109,2 | |
| Fase móvel 57% ACN 43% H ₂ O | 107,3 | 1,4 | 104,8 | 0,7 |
| | 110,0 | | 105,7 | |
| | 108,0 | | 106,2 | |
| Fase móvel 63% ACN 37% H ₂ O | 109,7 | 4,5 | 106,9 | 0,7 |
| | 109,6 | | 107,8 | |
| | 101,8 | | 106,3 | |

Tabela 6 - Dados obtidos com as amostras coletadas no Rio Sapucaí

| PONTO DE AMOSTRAGEM | AMOSTRA | CONCENTRAÇÃO DE EE2 (ng L ⁻¹) | CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE EE2 (ng L ⁻¹) | CV (%) |
|---------------------|---------|---|---|--------|
| P1 | 1 | 54,4 | 67,4 | 19,3 |
| | 2 | 80,4 | | |
| | 3 | 67,4 | | |
| P2 | 1 | 64,3 | 72,8 | 11,0 |
| | 2 | 80,3 | | |
| | 3 | 74,0 | | |
| P3 | 1 | 83,6 | 94,7 | 29,9 |
| | 2 | 126,8 | | |
| | 3 | 73,6 | | |
| P4 | 1 | 68,5 | 99,1 | 27,7 |
| | 2 | 121,5 | | |
| | 3 | 107,4 | | |
| P5 | 1 | 111,5 | 94,0 | 27,1 |
| | 2 | 64,8 | | |
| | 3 | 105,7 | | |

positadamente, o volume de injeção, a temperatura do compartimento da coluna e a composição da fase móvel. A alteração foi de $\pm 5\%$. A Tabela 5 apresenta uma síntese dos resultados obtidos na robustez.

A partir dos dados apresentados na Tabela 5 pode-se verificar que a metodologia se mostrou robusta com as alterações propostas. A recuperação ficou entre 90% e 110% e o CV inferior a 10%. Nesse nível de concentração, esses resultados podem ser classificados como satisfatórios.

Na determinação dos analitos na água do Rio Sapucaí, o hormônio EE2 foi encontrado em todas as amostras e o LNG não foi detectado em nenhuma amostra. A Tabela 6 apresenta uma síntese dos resultados obtidos para as amostras de água superficial no Rio Sapucaí. Apesar dos valores de CV (%) apresentados na Tabela 6 se mostrarem altos, para esse nível de concentração (ng L⁻¹), os mesmos podem ser considerados normais de acordo com a Trombeta de Horwitz (HARRIS, 2001).

Percebe-se pela concentração média de EE2 apresentada na Tabela 6 um ligeiro aumento nos pontos de amostragem P3 e P4. Os dados sugerem que ocorre um aumento da concentração do analito a partir do ponto P1, culminando no ponto P4 que está à jusante da Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) de Itajubá, reduzindo novamente nos ponto P5, que está localizado já no município de Piranguinho/MG.

A Figura 7 apresenta um perfil dos cromatogramas obtidos para o EE2 e a Figura 8 um perfil dos cromatogramas obtidos nas condições de análise para o LNG.

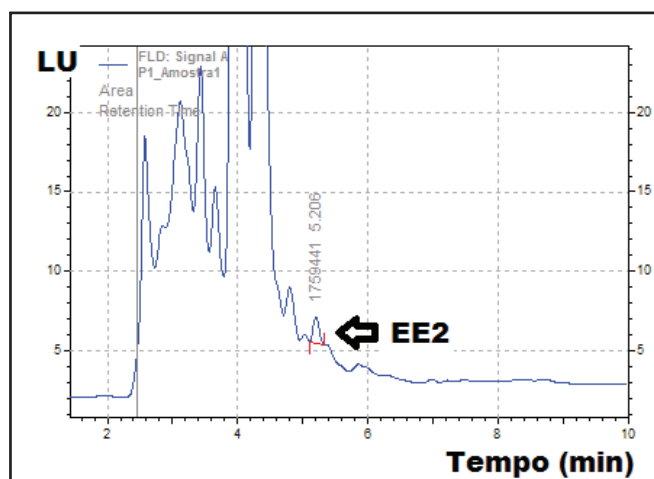


Figura 7 - Perfil do cromatograma do EE2

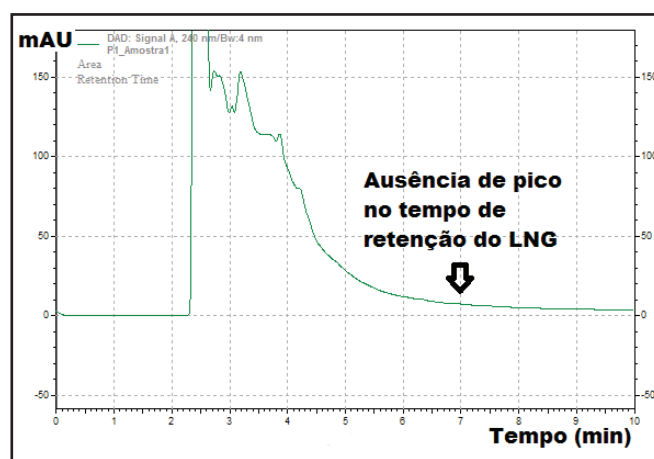


Figura 8 -Perfil do cromatograma do LNG

4 Conclusões

O método desenvolvido e validado mostrou-se apropriado para a determinação e quantificação dos hormônios 17α -etinilestradiol e levonorgestrel em águas superficiais. O teor de EE2 nas amostras de água do Rio Sapucaí se mostrou acima da média encontrada na literatura. No entanto, o LNG não foi encontrado em nenhuma amostra do Rio Sapucaí, provavelmente por estar abaixo do limite de detecção do método.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq (Processo: 409943/2013-4), à FAPEMIG e à Rede Mineira de Química (RQ-MG) pelo suporte financeiro ao projeto.

Referências

- AL-ODAINI, N.A.; ZAKARIA, M.P.; YAZIZ, M.I.; SURIF, S. Multi-residue analytical method for human pharmaceuticals and synthetic hormones in river water and sewage effluents by solid-phase extraction and liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 6791–6806, 2010.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29/05/2003.
- ARIS, A.Z.; SHAMSUDDIN, A.S.; PRAVEENA, S.M. Occurrence of 17α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environment International*, v. 69, p. 104-119, 2014.
- BELHAJ, D.; BACCAR, R.; JAABIRI, I.; BOUZID, J.; KALLEL, M.; AYADI, H.; ZHOU, J.L. Fate of selected estrogenic hormones in an urban sewage treatment plant in Tunisia (North Africa). *Science of the Total Environment*, v. 505, p. 154-160, 2015.
- HARRIS, D.C. Química Analítica Quantitativa. Rio de Janeiro: LTC, 2001, 862 p.
- GAVRILESCU, M.; DEMNEROVÁ, K.; AAMAND, J.; AGATHOS, S.; FAVA, F. Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New Biotechnology*, v. 32, p. 147-156, 2015.
- GHISELLI, G.; JARDIM, W.F. Interferentes endócrinos no ambiente. *Química Nova*, v. 30, p. 695-706, 2007.
- GOOGLE – Google Earth 6 – Disponível em: <<http://www.google.com/earth/index.html>> Acesso em 23 jun 2012.
- GORGA, M.; INSA, S.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Occurrence and spatial distribution of EDCs and related compounds in waters and sediments of Iberian rivers. *Science of the Total Environment*, v. 503-504, p. 69-86, 2015.
- HAMID, H.; ESKICIOGLU, C. Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. *Water Research*, v. 46, p. 5813-5833, 2012.
- HUANG, B.; SUN, W.; LI, X.; LIU, J.; LI, Q.; WANG, R.; PAN, X. Effects and bioaccumulation of 17β -estradiol and 17α -ethynylestradiol following long-term exposure in crucian carp. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 112, p. 169-176, 2015.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=313240&search=inas-gerais|itajuba>> Acesso em 15 mar 2015.
- IGAM – Instituto Mineiro de Gestão das Águas. Disponível em <<http://comites.igam.mg.gov.br/comites-estaduais/bacia-do-rio-grande/gd5-cbh-do-rio-sapucaí/1188-conheca-a-bacia-gd5>> Acesso em 15 mar 2015.
- JARDIM, W.F.; MONTAGNER, C.C.; PESCARA, I.C.; UMBUZEIRO, G.A.; BERGAMASCO, A.M.D.D.; ELDRIDGE, M.L.; SODRÉ, F.F. An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. *Separation and Purification Technology*, v. 84, p. 3-8, 2012.
- KUMAR, R.; GAURAV, H.; MALIK, A.K.; KABIR, A.; FURTON, K.G. Efficient analysis of selected estrogens using fabric phase sorptive extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1359, p. 16-25, 2014.
- LI, G.; ZHAI, J.; HE, Q.; ZHI, Y.; XIAO, H.; RONG, J. Phytoremediation of levonorgestrel in aquatic environment by hydrophytes. *Journal of Environmental Sciences*, v. 26, p. 1869-1873, 2014.
- LIN, Z.; HE, Q.; WANG, L.; WANG, X.; DONG, Q.; HUANG, C. Preparation of magnetic multi-functional molecularly imprinted polymer beads for determining environmental estrogens in water samples. *Journal of Hazardous Materials*, v. 252/253, p. 57-63, 2013.
- MOON, H.B.; YOON, S.P.; JUNG, R.H.; CHOI, M. Wastewater treatment plants (WWTPs) as a source of sediment contamination by toxic organic pollutants

- and fecal sterols in a semi-enclosed bay in Korea. *Chemosphere*, v. 73, p. 880-889, 2008.
- PESSOA, G.P.; SOUZA, N.C.; VIDAL, C.B.; ALVES, J.A.C.; FIRMINO, P.I.M.; NASCIMENTO, R.F.; SANTOS, A.B. Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, v. 490, p. 288-295, 2014.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p. 771-780, 2004.
- RIBANI, M.; COLLINS, C.H.; BOTTOLI, C.B.G. Desenvolvimento e validação de método para separação de isoflavonas em extrato seco de soja. *Ciência e Natura*, v. 36, p. 501-510, 2014.
- RUBIO, S.; PEREZ-BENDITO, D. Recent advances in environmental analysis. *Analytical Chemistry*, v. 81, p. 4601-4622, 2009.
- SODRÉ, F.F.; PESCARA, I.C.; MONTAGNER, C.C.; JARDIM, W.F. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*, v. 96, p. 92-98, 2010.
- WANG, L.; CAI, Y.Q.; HE, B.; YUAN, C.C.; SHEN, D.Z.; SHAO, J.; JIANG, G.B. Determination of estrogens in water by HPLC-UV using cloud point extraction. *Talanta*, v. 70, p. 47-51, 2006.
- ZAFRA-GÓMEZ, A.; BALESTEROS, O.; NAVALÓN, A.; VÍLCHEZ, J.L. Determination of some endocrine disrupter chemicals in urban wastewater samples using liquid chromatography – mass spectrometry. *Microchemical Journal*, v. 88, p. 87-94, 2008.