

I-336 - DETERMINAÇÃO DE INTERFERENTES ENDÓCRINOS EM AMOSTRAS DE ÁGUAS UTILIZANDO HPLC - DAD

Sarah de Abreu Moreira Araújo⁽¹⁾

Química Industrial pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Mestre em Saneamento Ambiental pela UFC. Professora efetiva do Instituto Federal do Ceará. Doutoranda em Saneamento Ambiental pela UFC.

Paula Luciana Rodrigues de Sousa

Engenheira de Alimentos pela Universidade Federal do Ceará. Mestranda em Química pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Helena Becker

Doutora em Ecologia e Recursos Naturais pela UFSCAR. Professora efetiva da Universidade Federal do Ceará.

Ronaldo Ferreira do Nascimento

Doutor em Química Analítica pelo Instituto de Química de São Carlos –USP. Professor efetivo da Universidade Federal do Ceará.

Germário Marcos Araújo

Tecnólogo em Saneamento Ambiental pelo Instituto Centro de Ensino Tecnológico do Cariri-CE (CENTEC). Mestre em Engenharia Sanitária pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Professor efetivo do Instituto Federal do Ceará. Doutorando em Saneamento Ambiental pela UFC.

Endereço⁽¹⁾: Av. Humberto Monte, S/N – Campus do Pici. Departamento de Química Analítica e Físico Química- Bloco 940- Laboratório de Análise Traço– Universidade Federal do Ceará – Pici - Fortaleza-CE- CEP: 60455-760- - Brasil - Tel: (85) 3366-9042 - e-mail: sarahbreu@yahoo.com.br

RESUMO

O uso de águas superficiais para tratamento e fornecimento para consumo humano tem sido os principais motivos de preocupação acerca da contaminação das fontes de água. Têm chamado à atenção da comunidade científica os contaminantes que ainda não eram detectados ou considerados de risco (contaminantes emergentes), os quais têm uso no dia-a-dia e ainda não são regulamentados como poluentes pela legislação. Dentre os compostos classificados como contaminantes emergentes estão incluídos alguns fármacos de diferentes classes como: analgésicos, anti-inflamatórios, drogas psiquiátricas, antilipêmicos, antibióticos, dentre outros. Dentre estes, destacam-se alguns compostos chamados interferentes endócrinos (IEs), que são substâncias com propriedades que podem provocar alterações no sistema endócrino de animais e humanos. Para análise destes compostos, uma técnica que vem sendo bastante aplicada é a Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC). Logo, este trabalho teve como objetivo desenvolver metodologia para identificação e análise de compostos emergentes em amostras de água por cromatografia líquida de alta resolução acoplada a um detector de arranjo de diodos (HPLC/DAD).

PALAVRAS-CHAVE: Interferentes endócrinos, contaminantes emergentes, cromatografia (HPLC – DAD).

INTRODUÇÃO

Produtos químicos são amplamente utilizados na sociedade moderna, sendo produzidos mundialmente em larga escala para as mais variadas aplicações. No entanto, uma das desvantagens da produção e utilização destes está nos resíduos que são gerados, sejam eles derivados diretamente das atividades industriais ou produzidos após seu consumo pela sociedade, que podem impactar de forma negativa o meio ambiente.¹

A presença de micropoluentes em águas – poluentes presentes em concentrações de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} – tem despertado o interesse da comunidade científica. Fármacos, interferentes endócrinos (IEs) e poluentes orgânicos persistentes (POP) são as classes mais investigadas pelos efeitos no meio ambiente.²

Os interferentes endócrinos são definidos como agentes exógenos que interferem na síntese, transporte, recepção, ação, ou eliminação dos estrogênios naturais do corpo e abrangem uma grande faixa de classes de estruturas distintas, dentre as quais estão os hormônios estrogênicos ou estrogênios.³⁻⁶

O interesse no estudo dos interferentes endócrinos é relativamente recente e foi motivado a partir de observações sobre a ocorrência de anormalidades no sistema endócrino de animais submetidos à exposição a alguns compostos orgânicos. Alterações crônicas no desenvolvimento e na reprodução de várias espécies presentes em diferentes compartimentos ambientais têm sido atribuídas à ocorrência de uma grande variedade de substâncias químicas, principalmente em sistemas aquáticos naturais. Mesmo em concentrações-traço, alguns compostos exógenos, sintéticos ou naturais, têm sido detectados em amostras de águas superficiais em todos os continentes do planeta, principalmente em função da atividade antrópica.⁷

O grande progresso na instrumentação analítica nos últimos anos e o desenvolvimento de técnicas de extração mais robustas possibilitaram a detecção e identificação de novos compostos em faixas de concentração mais baixas, contribuindo, assim, para o melhor entendimento do problema de contaminação do meio ambiente.^{8,9}

Dessa forma os contaminantes emergentes têm sido determinados nas mais variadas matrizes ambientais como águas, efluentes industriais, solos, sedimentos, emissões gasosas, amostras biológicas (urina, sangue, leite, saliva, tecidos, etc), alimentos e até ovos de pássaros,¹⁰ sendo que as matrizes aquosas são as mais analisadas.¹¹⁻¹³

Os analitos que mais têm chamado atenção da comunidade científica e, por isso, são os mais estudados, são os princípios ativos de fármacos, substâncias classificadas como interferentes endócrinos e substâncias contidas em produtos de higiene pessoal, devido ao fato de que até as mais modernas estações de tratamento de água e efluentes não apresentam processos de tratamento capazes de degradá-los ou eliminá-los completamente, principalmente os contaminantes emergentes que apresentam alta solubilidade em água ou são pouco degradáveis, como fármacos polares.^{2,14,15}

O presente trabalho tem por objetivo desenvolver metodologia para a validação de um método capaz de analisar os compostos emergentes em amostras de água por cromatografia líquida de alta resolução acoplada a um detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD).

MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente foi realizado um procedimento para a separação e quantificação dos cinco compostos escolhidos empregando HPLC-DAD, em seguida, foram avaliados métodos de extração dos analitos baseados em extração em fase sólida SPE.

Foram utilizados padrões de estrogênios (dietilestilbestrol, 17 α -etinilestradiol e 17 β -estradiol) e fármacos (cafeína, ciprofloxacina) com pureza mínima de 98%, que foram obtidos da SIGMA-ALDRICH, Figura 1.

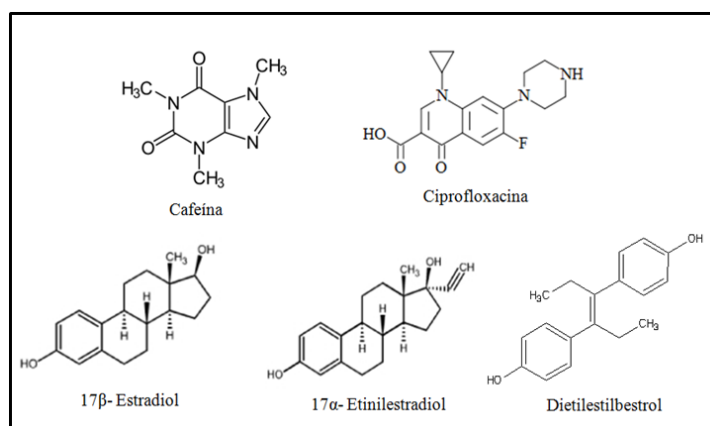


Figura 1: Estrutura química dos compostos estudados.

Os solventes orgânicos de grau cromatográfico, metanol (MeOH), acetonitrila (ACN) e acetona foram obtidos da J.T.BAKER. Água deionizada foi obtida a partir do sistema MILLI-Q. Para a acidificação da fase móvel, foi empregado ácido clorídrico (HCl) P.A., da marca VETEC.

Soluções estoque de 1000 mg/L dos compostos cafeína, ciprofloxacina, 17 β -estradiol, 17 α -estradiol e dietilestilbestrol foram preparadas através da dissolução de 10 mg do analito em 10 mL de MeOH grau HPLC. Solução multielementar de concentração 10,0 mg/L foi preparada em metanol grau HPLC, a partir das soluções individuais, e diluídas para as concentrações requeridas.

Os parâmetros utilizados para validação do método foram: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e eficiência da extração em fase sólida.

A linearidade foi avaliada pela resposta em função da concentração do analito, a qual foi estudada em um intervalo de concentração que variou de 0,01 a 1,0 $\mu\text{g/mL}$ para a cafeína e 0,005 a 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para a cipro, E2, EE2 e DES. A linearidade foi determinada pelo coeficiente de correlação (r^2), obtido pelo gráfico relacionando a resposta do equipamento em função de 7 concentrações do analito. Para estimar os coeficientes das curvas analíticas, utilizou-se o método da regressão linear.

A determinação da linearidade das curvas analíticas foi feita a partir de padrões analíticos preparados em metanol, nas concentrações de 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 0,8 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ para cafeína e 0,005; 0,008; 0,01; 0,05; 0,1 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para cipro, E2, EE2 e DES e injetadas em triplicata. Após as injeções foram calculados a média das áreas, a estimativa do desvio-padrão (s), o coeficiente de variação (CV) e a equação da regressão linear da curva analítica para cada analito.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados a partir do método baseado em parâmetros da curva analítica, uma vez que esse método é considerado de maior confiabilidade, pois leva em consideração o intervalo de confiança da regressão linear.¹⁸ As equações utilizadas para o cálculo do LD e LQ são apresentados nas Equações 1 e 2.

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC} \quad (2)$$

Onde, DP_a é a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação; e IC é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica.¹⁶

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade através do cálculo da estimativa do coeficiente de variação (CV) para um número de sete repetições, de acordo com a Equação 3.

$$CV (\%) = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração Média}} \times 100 \quad (3)$$

No estudo de extração dos compostos foram testados três cartuchos comerciais: HyperSep C18 (Thermo Scientific), HLB (Oasis) e DVB (Supelco) de 500 mg/6 mL cada. A extração foi realizada percolando 250 mL de água Milli-Q fortificada com 0,04 $\mu\text{g/mL}$ dos cinco padrões nos cartuchos HLB e DVB, no cartucho C18 a água foi fortificada com 0,4 $\mu\text{g/mL}$ dos padrões. Os cartuchos foram previamente condicionados e o fluxo foi mantido em 2 mL/min durante toda a extração. As amostras pré-concentradas foram injetadas em duplicatas no cromatógrafo líquido (HPLC-DAD). A Tabela 1 mostra as condições utilizadas na metodologia de extração dos cinco compostos.

Tabela 1: Testes de extração preliminares para definição da metodologia.

Cartucho	Dopagem	Condicionamento	Eluição
C18	0,4 µg/mL	5 mL ACN + 5 mL MeOH + 5 mL H ₂ O	1 x 3 mL MeOH + 1 x 2 mL MeOH
HLB	0,04 µg/mL	5 mL ACN + 5 mL MeOH + 5 mL H ₂ O	1 x 3 mL MeOH + 1 x 2 mL MeOH
DVB	0,04 µg/mL	5 mL ACN + 5 mL MeOH + 5 mL H ₂ O	1 x 3 mL MeOH + 1 x 2 mL MeOH

A avaliação dos cartuchos foi realizada em termos de recuperação (%) dos IEs.

O método para a determinação dos compostos cafeína, ciprofloxacina, 17β-estradiol, 17β-estradiol e dietilestilbestrol em água foi otimizado utilizando Cromatógrafo Líquido de Alta Resolução (HPLC), marca Shimadzu, modelo 20 A. Foi empregado um detector na região do ultravioleta com arranjo de diodos (DAD), modelo SPM-M20A. Para separação foi utilizada a coluna CLC – ODS (M), de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno. O volume de injeção manteve-se constante e igual a 20,0 µL em todas as medidas.

RESULTADOS

O gradiente de concentração e as condições cromatográficas utilizadas no método estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Gradiente de concentração do método empregado para análise dos 5 compostos de interesse. Comprimento de onda igual a 280 nm.

Tempo	Solv. A (%)*	Solv. B (%)**	Fluxo
0 min.	90	10	1,0
10 min.	50	50	1,0
10,5 min.	50	50	2,0
17 min.	20	80	2,0
19 min.	90	10	1,0
25 min.	FIM	FIM	FIM

* Água MILI-Q pH 2,0; ** Acetonitrila grau HPLC.

Inicialmente foram injetadas soluções individuais dos compostos (10,0 mg/L) para determinação do tempo de retenção de cada composto e em seguida uma solução multielementar (5,0 mg/L) para verificar a separação dos compostos. A Figura 2 mostra o cromatograma obtido na separação dos compostos.

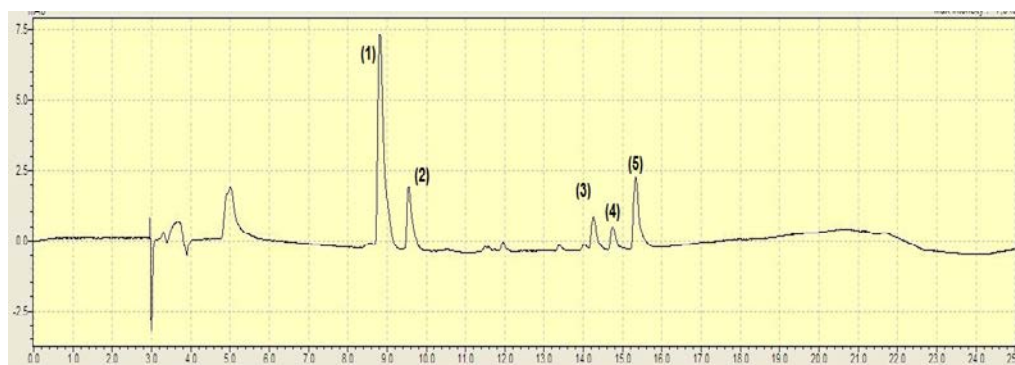


Figura 2 - Cromatograma de uma solução multi (5,0 mg/L) contendo os cinco compostos em MeOH grau HPLC. (1) Cafeína, (2) Ciprofloxacina, (3) 17β-estradiol, (4) 17α-estradiol e (5) Dietilestilbestrol.

Neste trabalho, a padronização externa foi empregada para a quantificação dos compostos de interesse nas amostras de água superficial. Os limites de detecção e de quantificação foram determinados pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica e estão mostrados na Tabela 3 juntamente com a faixa linear de trabalho para cada composto.

Tabela 3: Parâmetros de validação dos interferentes endócrinos cafeína, ciprofloxacina, 17β-estradiol (E2), 17α-etinilestradiol (EE2) e dietilestilbestrol (DES).

Padrão	T _R (min)	Faixa linear (µg/L)	Nº Pontos	Curva	r ²	LD (µg/L)	LQ (µg/L)
Cafeína	8,78	10 – 1000	5	Y = 51046x – 206,49	0,9999	2,078	6,926
Cipro	9,53	5 - 500	5	Y = 26051x – 232,05	0,9990	1,722	5,741
E2	14,24	5 - 500	4	Y = 4022,6x – 47,623	0,9994	2,418	8,060
EE2	14,72	5 - 500	5	Y = 3075,3x + 35,64	1,000	1,850	6,168
DES	15,33	5 - 500	5	Y = 11325x + 975,72	0,9997	4,277	14,256

Legenda:

T_R – Tempo de retenção;

r² – Coeficiente de correlação linear;

LD – Limite de detecção;

LQ – Limite de quantificação.

De acordo com a Tabela 3 observa-se que, dentro das faixas lineares estudadas, o método analítico por HPLC-DAD atendeu as exigências da ANVISA, pois os valores dos coeficientes de correlação (r²) foram superiores a 0,99.

O limite de detecção (LD) obtido pelo método na determinação simultânea dos cinco interferentes endócrinos em estudo variou de 1,722 – 4,2477 µg/L, e o limite de quantificação (LQ) variou de 6,168 – 14,256 µg/L. Não foi encontrado na literatura nenhum estudo que tenha envolvido a determinação simultânea desses cinco compostos em estudo por HPLC-DAD, dessa forma fica difícil realizar algum tipo de comparação quanto aos limites de detecção e quantificação do método proposto.

A precisão do método cromatográfico empregado nesse trabalho foi avaliada por meio da repetibilidade intradia. A precisão intradia foi representada pela concordância entre os resultados de oito medidas sucessivas

do método, efetuadas pelo mesmo analista, sob as mesmas condições de análise, no mesmo instrumento, no mesmo local e no mesmo dia, no intervalo de tempo de horas. A Figura 3 apresenta os valores dos coeficientes de variação para cada um dos compostos estudados.

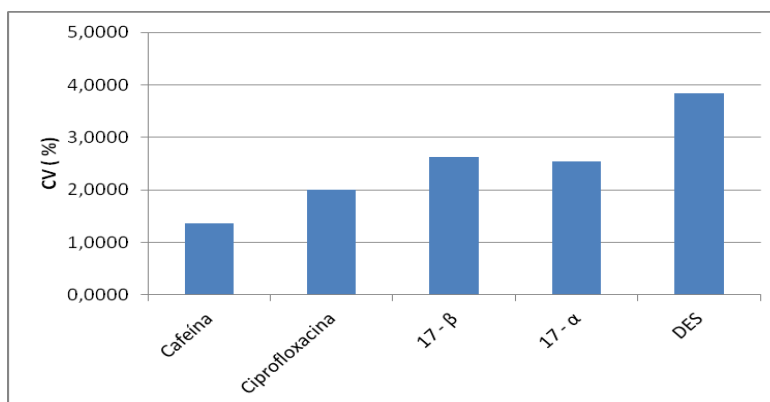


Figura 3 - Repetibilidade dos resultados obtidos para uma solução-padrão contendo 1,0 mg L⁻¹ de cada um dos cinco compostos expressa por meio do coeficiente de variação (CV) para um número de oito repetições realizadas no mesmo dia.

Os coeficientes de variação foram inferiores a 5 % para todos os 5 compostos. A ANVISA não admite valores de CV superiores a 5 % para determinação de fármacos em medicamentos, mas para a determinação destes em amostras mais complexas como soro, sangue ou plasma é permitido CV de até 15 %.¹⁶

Como não há uma legislação específica para a determinação desses fármacos em águas superficiais, os limites admitidos para CV pode variar quando se valida o método com padrões ou avalia a precisão através de uma replicata da mesma amostra de água superficial, sendo que os limites de CV devem ser menos rigorosos para esse último, por se tratar de uma matriz mais complexa.¹⁷

Os ensaios para os testes de recuperação utilizando extração em fase sólida (SPE) estão em andamento até o presente momento.

Os estudos para avaliar a percentagem de recuperação dos analitos foram realizados utilizando cartuchos, C18, DVB e HLB. Um volume de 250 mL de solução aquosa de concentração de 40 µg/L dos interferentes endócrinos foram percolados nos cartuchos DVB e HLB previamente condicionados. No cartucho C18 a concentração utilizada foi de 400 µg/L. A eluição foi feita utilizando 5 mL de MeOH.

A Figura 4 apresenta os percentuais de recuperação dos cinco compostos estudados nos diferentes cartuchos de extração testados.

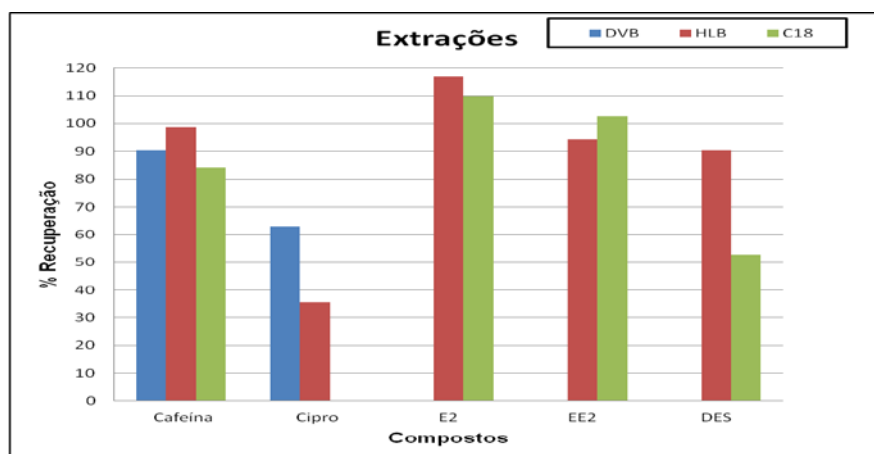


Figura 4 - Teste de recuperação para cinco compostos empregando-se extração em fase sólida em 3 diferentes cartuchos e determinação cromatográfica por HPLC-DAD.

Os valores obtidos para a recuperação da ciprofloxacina (cipro) e do dietilestilbestrol (DES), para o cartucho C18, foram insatisfatórios. O cartucho DVB apresentou resultados satisfatórios para a cafeína (98,6 %) e para a cipro (62,9 %), no entanto, não foram detectadas recuperação dos hormônios (E2, EE2 e DES).

O cartucho Oasis HLB apresentou resultados de recuperação satisfatórios para a cafeína e para os hormônios (E2, EE2 e DES), no entanto, para o fármaco ciprofloxacina a recuperação foi insatisfatória (35,5 %).

Liu *et al.* (2004) analisaram diversos tipos de materiais adsorventes visando um alto valor de recuperação dos contaminantes, sendo que o cartucho que apresentou melhor recuperação foi o Oasis HLB, chegando a um valor de 118% para os estrogênios E2 e EE2.¹⁹

Esse resultado pode ser confirmado por Ghiselli (2006) e por Huang *et al.* (2011), os quais encontraram valores ótimos de recuperação (82-95%) utilizando cartucho Oasis HLB.^{20, 21} Quando grupos hidrofílicos, como *N*-vinilpirolidona, são adicionados aos sorbentes poliméricos, estes tornam o material mais efetivo na retenção do analito, especialmente para amostras ambientais.²² A maior eficiência dos materiais poliméricos pode ser atribuída ao tipo de interação entre o analito e o sorbente. Este fato é atribuído porque a superfície do grupo hidrofílico contém um número maior de sítios aromáticos, o que permite interações do tipo π - π , enquanto que a interação do grupo funcional do analito e a sílica modificada (C-18) seja devido às forças do tipo *van der Waals*.²³

Com os resultados de extração obtidos, optou-se por utilizar o cartucho DVB para a extração da ciprofloxacina e o cartucho HLB para a extração da cafeína e dos hormônios, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e dietilestilbestrol.

CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, concluiu-se que:

Para identificação e quantificação dos compostos por HPLC-DAD foi construído um gradiente de concentração com solução ácida pH 2 (com HCl) e acetonitrila (ACN), programado da seguinte maneira: A proporção de ACN em água variou de 10 até 80 % em 17 minutos. Essa proporção diminuiu para 10% de ACN nos últimos 2 minutos, permanecendo constante até um tempo final de corrida de 25 minutos. O fluxo variou de 1,0 até 2,0 mL min⁻¹ no tempo de corrida de 10 a 17 minutos;

Foram obtidas curvas de calibração com excelentes coeficientes de correlação, $r^2 > 0,999$;

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), bem como a precisão (em termos de repetibilidade) também foram satisfatórios, verificados através dos valores de coeficiente de variação (CV);

O cartucho DVB apresentou melhor percentual de recuperação para a ciprofloxacina, e o cartucho HLB foi escolhido como para a extração dos outros compostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kuster, M.; Azevedo, D. A.; De Alda, M.J.L.; Aquino Neto, F.R.; Barceló, D.; *Environ. Int.* **2009**, *35*, 997.
2. Bila, D. M.; Dezotti, M.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 523.
3. Bila, D. M.; Dezotti, M.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 651.
4. Litelmann, J.; Katayama, A.; Kurihara, N.; Shore, L.; Wenzel, A.; *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 631.
5. Reis Filho, R. W.; Araújo, J. C.; Vieira, E. M.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 817.
6. Ghiselli, G.; Jardim, W. F.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 695.
7. Sodré, F. F.; Locatelli, M. A.; Montagner, C. C.; Jardim, W. F. Origem e destino de interferentes endócrinos em águas naturais. **Caderno Temático**. v. 6, Campinas, Brasil, 2007.
8. Kuster, M.; De Alda, M. J. L.; Hernando, M. D.; Petrovic, M.; Martín-Alonso, J.; Barceló D.; *J. Hydrol.* **2008**, *358*, 112.
9. Sodré, F. F.; Pescara, I. C.; Montagner, C. C.; Jardim, W. F.; *Microchem. J.* **2010**, *96*, 92.

10. Koester, C. J.; *Anal. Chem.* **2005**, 77, 3737.
11. Richardson, S. D.; *Anal. Chem.* **2005**, 77, 3807.
12. Richardson, S. D.; Ternes, T.; *Anal. Chem.* **2007**, 79, 4295.
13. Richardson, S. D.; *Anal. Chem.* **2009**, 81, 4645.
14. Ghiselli, G.; Jardim, W. F.; *Quim. Nova* **2007**, 30, 695.
15. Petrovic, M.; Cruz, H. M. S.; Barceló, D.; *J. Chromatogr., A* **2005**, 1067, 1.
16. ANVISA; Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução - RE nº 475, de 19 de março de 2002.
17. Raimundo, C. C. M. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2007.
18. Ribani, M. *et al. Quím. Nova*, **2004**, 27, 771.
19. Liu, R.; Zhou, J.L.; Wilding, A. *Jour. Chrom. A*, **2004**, 1022, 179.
20. GHISELLI, G. Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP). 2006, 181f. **Tese de Doutorado** – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
21. Huang, B.; Xue-Jun, P.; Xing, W.; Jing-Liang, L.; Shi-Min, Z.; Ping, H.; Fa-Rong, LI. *Chi. Jour. Ana. Chem.*, **2011**, 39, 449.
22. Salvador, A.; Moretton, C.; Piram, A.; Faure, R. *Jour. Chrom. A*, 2007, 1145, 102. Masqué, N.; Marcé, R.M.; Borrull, F. *Tre. Anal. Chem.*, **1998**, 17, 384.
23. Masque, N.; Marce, R.M.; Borrull, F. *Tren. Anal. Chem.*, **1998**, 17, 384.