

I-195 - PROPOSTA DE METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DE INTERFERENTES ENDÓCRINOS EM ÁGUAS DE ABASTECIMENTO UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

Sarah de Abreu Moreira Araújo⁽¹⁾

Química Industrial pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Doutoranda em Saneamento Ambiental na UFC. Professora efetiva do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Campus Sobral (IFCE/Sobral).

André Gadelha de Oliveira

Químico pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Mestre em Saneamento Ambiental pela UFC.

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.

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

Atualmente, frente à percepção do homem sobre a necessidade de se preservar o ambiente e da busca incessante pelo desenvolvimento sustentável, a proteção das fontes de água natural é de longe um dos fatores mais preocupantes para a conservação da vida. O aumento de sensibilidade na detecção de poluentes químicos e seus efeitos biológicos, com o advento de novos métodos, têm chamado a atenção da comunidade científica para os contaminantes que ainda não eram detectados ou considerados de risco. Estes são denominados contaminantes emergentes, os quais têm uso no dia-a-dia e ainda não são regulamentados como poluentes pela legislação. Neste trabalho buscou-se uma metodologia capaz de separar e identificar cinco compostos considerados interferentes endócrinos; cafeína, ciprofloxacina, dietilestilbestrol (DES), 17 α -etinilestradiol e 17 β - estradiol, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD).

PALAVRAS-CHAVE: Interferentes endócrinos, contaminantes emergentes, águas de abastecimento, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD).

INTRODUÇÃO

O aumento de sensibilidade na detecção de poluentes químicos e seus efeitos biológicos, com o advento de novos métodos, têm chamado a atenção da comunidade científica para os contaminantes que ainda não eram detectados ou considerados de risco. Estes são denominados contaminantes emergentes, os quais têm uso no dia-a-dia e ainda não são regulamentados como poluentes pela legislação (ALDA *et al*, 2003).

Dentre os compostos classificados como contaminantes emergentes estão incluídos alguns fármacos de diferentes classes como: analgésicos, antiinflamatórios, drogas psiquiátricas, antipênicos, antibióticos (de uso humano e veterinário), contrastes de raio X, hormônios e esteróides, além de componentes presentes em protetores solares, produtos de higiene pessoal como fragrâncias contendo grupos nitro e ftalatos, inseticidas repelentes e anti-sépticos, bem como os surfactantes amplamente utilizados no consumo doméstico (RAIMUNDO, 2007).

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. Eles constituem uma classe de substâncias não definidas pela sua natureza química, mas pelo seu efeito biológico. São compostos orgânicos hormonalmente ativos que podem causar distúrbios no sistema endócrino mesmo em baixas concentrações (RAIMUNDO, 2007).

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 (SODRÉ *et al*, 2007).

A origem da hipótese da ação dos interferentes endócrinos deve-se a acontecimentos importantes, tais como, o aparecimento de câncer no sistema reprodutivo de filhas de mulheres que usaram DES (dietilestilbestrol) na gravidez, entre os anos de 1940 a 1970 (TERNES, 2001); anomalias no sistema reprodutivo observadas em jacarés que habitavam um lago na Flórida contaminado com o pesticida DDT e seu metabólito DDE3 e um estudo na Dinamarca que relata o declínio da qualidade do sêmen de homens durante aproximadamente 50 anos, entre os anos de 1938 e 1990 (BIRKETT e LESTER, 2003).

Diante da contextualização exposta e tendo em vista a crescente preocupação ambiental dedicada aos “interferentes endócrinos”, principalmente no Brasil, faz-se necessário uma avaliação da ocorrência de interferentes endócrinos nos açudes da Região Metropolitana de Fortaleza, principalmente naqueles destinados ao abastecimento público.

Dessa forma o presente trabalho tenta Propor uma metodologia capaz de separar, identificar e quantificar a cafeína, ciprofloxacina, ofloxacina, dietilestilbestrol, 17 α -etinilestradiol e 17 β -estradiol utilizando cromatografia líquida (HPLC-DAD).

MATERIAIS E MÉTODOS

Até o presente momento, foram realizados experimentos a fim de se desenvolver e otimizar um método que fosse capaz de separar e identificar os cinco compostos escolhidos (cafeína, ciprofloxacina, dietilestilbestrol, 17 α -etinilestradiol e 17 β -estradiol) por HPLC-DAD, figura 1.

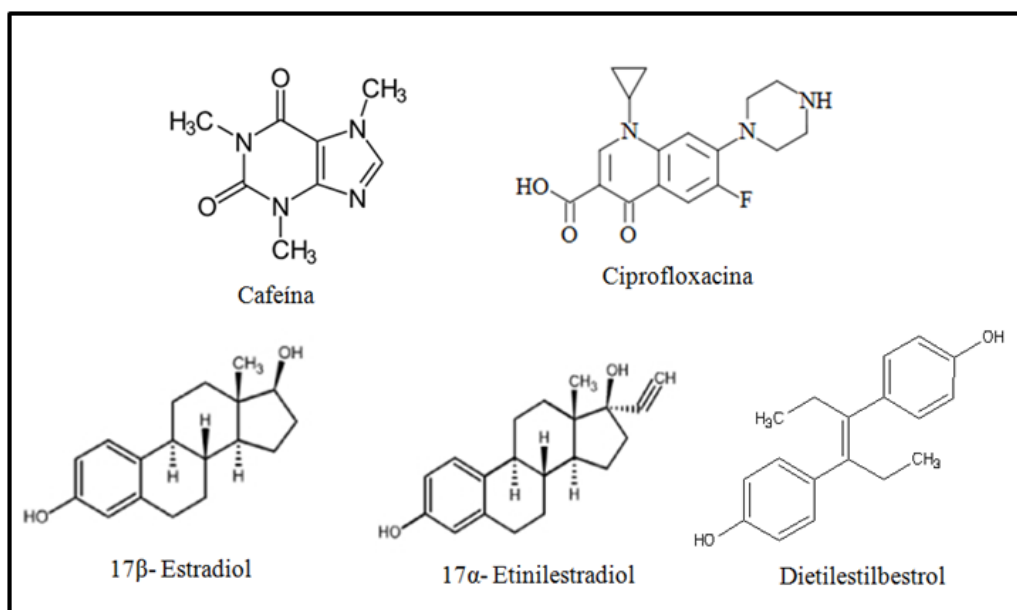


Figura 1 – Estrutura química dos interferentes endócrinos estudados.

REAGENTES E PADRÕES

Foram utilizados padrões de estrogênios e fármacos com pureza mínima de 98%, que foram obtidos da Sigma-Aldrich. Os solventes orgânicos de grau cromatográfico, metanol (MeOH), acetonitrila (ACN) e acetona, foram

obtidos da J.T.Baker. Água desionizada foi obtida a partir do sistema Milli-Q. Para a acidificação da fase móvel, foi empregado ácido fosfórico (H_3PO_4) P.A., da marca Vetec.

Inicialmente foi preparada solução padrão estoque de cada composto na concentração de $1000,0 \text{ mg.L}^{-1}$ em metanol grau HPLC. Em seguida foi preparada uma solução multi contendo os cinco compostos escolhidos numa concentração de $100,0 \text{ mg.L}^{-1}$ em metanol grau HPLC. Também foi preparada uma solução de ácido fosfórico 0,11% (m/v) em água ultrapura Milli-Q.

EQUIPAMENTO UTILIZADO

A separação por HPLC foi realizada em um aparelho Shimadzu, modelo 20A, equipado com uma coluna de separação Hichrom, modelo HI-5C18-250A, de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno. Foi empregado um detector na região do ultravioleta com arranjo de fotodiodo, modelo SPD-M20A. O volume de injeção manteve-se constante e igual a $20,0 \mu\text{L}$ em todas as medidas.

No desenvolvimento da análise cromatográfica foi avaliada inicialmente a eficiência da separação dos cinco compostos da solução multi $100,0 \text{ mg.L}^{-1}$.

Foram testadas como fase móvel (FM): MeOH e H_3PO_4 0,11% e ACN e H_3PO_4 0,11%. Foram testados dois tipos de eluição: isocrática e gradiente.

RESULTADOS PRELIMINARES OBTIDOS

A primeira parte do trabalho consistiu no desenvolvimento de um método analítico que pudesse ser aplicado à determinação simultânea das cinco substâncias escolhidas para serem monitoradas em águas superficiais.

Durante a realização das análises utilizando-se como fase móvel metanol e ácido fosfórico 0,11% observou-se que os compostos apresentavam-se coeluídos. Dessa forma, a FM formada de MeOH e H_3PO_4 0,11% foi descartada dos experimentos.

Nas análises utilizando FM acetonitrila e ácido fosfórico 0,11%, foram testados a eluição isocrática e por gradiente. Dentre essas, a eluição por gradiente se mostrou mais adequada do que a isocrática, uma vez que os picos com eluição isocrática apresentaram-se coeluídos.

Foram testados 11 gradientes de eluição da FM acetonitrila e ácido fosfórico 0,11%, onde a percentagem de ACN em ácido variou de 10 a 100%. Os tempos de análise variaram entre 12 e 42 minutos, as vazões de FM também variaram de 0,8; 1,0; 1,4 e $2,0 \text{ mL.min}^{-1}$ e a temperatura do forno variou entre 28 e 35°C .

A Figura 2 apresenta o cromatograma obtido quando foi injetado uma solução multi 100 mg.L^{-1} utilizando o seguinte gradiente de eluição: Aumento de 10 até 100% de ACN em 10 minutos, retornando a 10% de ACN em 4 minutos. O fluxo inicial foi de $1,4 \text{ mL.min}^{-1}$ e após 5 minutos de corrida o fluxo foi aumentado para $2,0 \text{ mL.min}^{-1}$. A temperatura do forno mantida em 35°C .

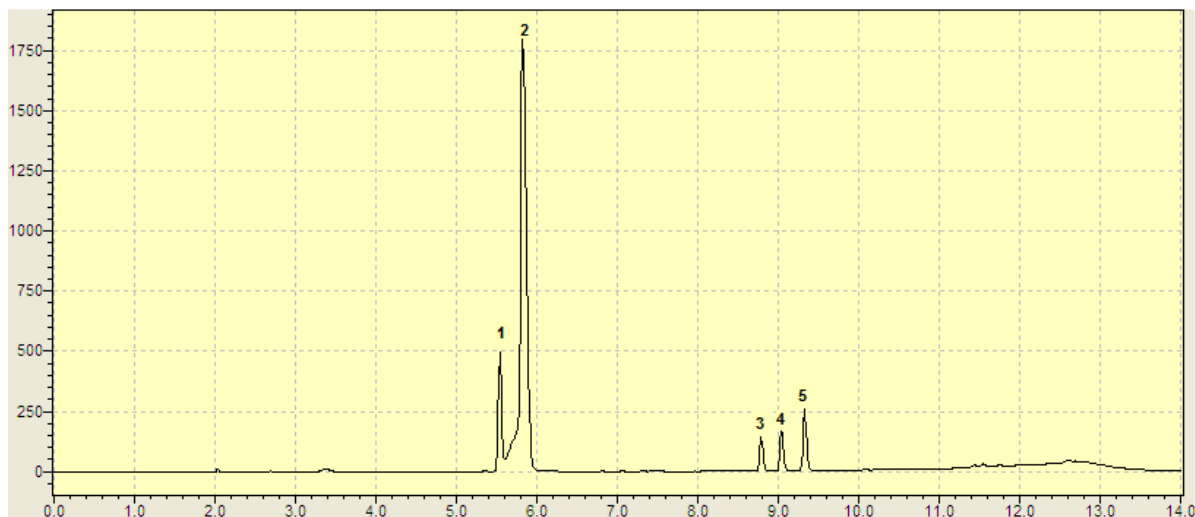


Figura 2- Cromatograma de uma solução multi 100 mg.L⁻¹ contendo os cinco compostos em metanol, FM composta por ACN e ácido fosfórico 0,11%, obtido por HPLC-DAD com absorção em 280 nm.

Como pode ser observado na figura 2, os compostos 1, 2, 3, 4 e 5 podem ser detectados, separadamente, quando se utiliza esse gradiente.

Padrões individuais foram analisados nessas condições para se obter a ordem de eluição dos compostos. A figura 3 mostra os cromatogramas dos cinco compostos injetados individualmente, foi utilizado o mesmo gradiente de eluição da solução multi.

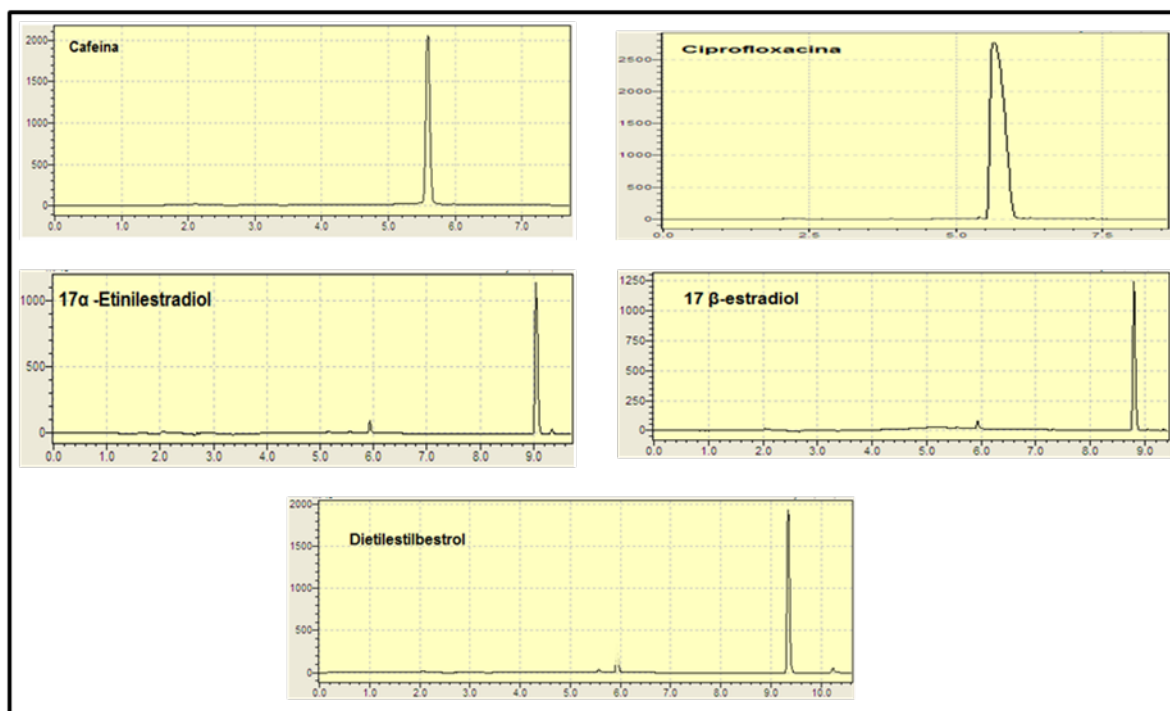


Figura 3- Cromatogramas dos cinco compostos injetados individualmente. Gradiente de eluição: aumento de 10 até 100% de ACN em 10 minutos, retornando a 10% de ACN em 4 minutos. Fluxo inicial de 1,4 mL.min⁻¹ e após 5 minutos, o fluxo foi aumentado para 2,0 mL.min⁻¹. A temperatura do forno mantida em 35°C.

De acordo com a figura 3 podemos concluir que cada composto apresenta um tempo de retenção característico, e dessa forma podemos atribuir nomes aos respectivos números da figura 2. A tabela 1 apresenta os tempos de retenção e o comprimento de onda característico para cada composto analisado.

Tabela 1- Tempos de retenção e o comprimento de onda característico para cada composto analisado.

Composto	Nome	Tempo de Retenção (min)	Comprimento de onda característico (nm)
1	Caféina	5,5	269
2	Ciprofloxacina	5,7	278
3	17 β -estradiol	8,8	280
4	17 α -etinilestradiol	9,0	280
5	Dietilestilbestrol	9,4	270

Com os resultados preliminares apresentados acima, podemos concluir que o método analítico desenvolvido para a separação e identificação dos compostos de interesse pode ser utilizado posteriormente para a quantificação desses compostos, considerados interferentes endócrinos, nas águas dos açudes que abastecem a região metropolitana de Fortaleza. No entanto, pode-se ainda buscar uma otimização do presente método a fim de se conseguir uma melhor separação nos picos da caféina e ciprofloxacina.

Vale salientar ainda que, o gradiente utilizado no desenvolvimento do método permitiu que a análise fosse realizada em apenas 10 minutos, com baixo gasto de ACN, o que vem a ser uma vantagem quando comparado com outros gradientes aqui testados, os quais chegaram a um tempo de análise de 42 minutos.

O trabalho terá continuidade durante os próximos meses no intuito de se realizar a validação do método analítico. Os parâmetros analíticos normalmente utilizados para a validação de métodos de separação são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. (Lanças, 2004)

Tão logo validado, o método será utilizado nas análises das águas dos açudes que abastecem a região metropolitana de Fortaleza.

CONCLUSÕES

Com base nos trabalhos até agora realizados, pode-se concluir que:

Para as análises dos interferentes endócrinos utilizados (caféina, ciprofloxacina, 17 α - etinilestradiol, 17 β -estradiol e dietilestilbestrol) a fase móvel que permite uma melhor separação dos picos é a formada por acetonitrila (ACN) e ácido fosfórico 0,11%;

O tipo de eluição que mostrou-se mais adequada foi a por gradiente;

Dentre os 11 gradientes de eluição testados, o que melhor apresentou a separação e identificação dos compostos de interesse foi o programado como: Aumento de 10 até 100% de ACN em 10 minutos, retornando a 10% de ACN em 4 minutos. O fluxo inicial foi de 1,4 mL.min⁻¹ e após 5 minutos de corrida o fluxo foi aumentado para 2,0 mL.min⁻¹ e a temperatura do forno mantida em 35°C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALDA, M.J.L. de; DÍAZ-CRUZ, S.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Liquid chromatography – (tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. **Journal of Chromatography A**. v. 1000, p. 503-523, 2003.
2. BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process**, 1st ed., Lewis Publishers, 2003.
3. LANÇAS, F. M. Validação de métodos cromatográficos de análise – São Carlos, RiMa, 62p., 2004.
4. 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.
5. 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.
6. TERNES, T. A. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 20, p. 419-434, 2001.