

OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE DE HORMÔNIOS EM ÁGUA SUPERFICIAL POR HPLC-DAD

Nádia Hortense Torres^{1}; Juliana Heloísa Pinê Américo²; Carina Nazato³; Lucineide Aparecida Maranhão⁴; Marcia Nalesso Costa Harder⁵; Leila Aparecida Figueiredo⁶; Franz Zirena Vilca⁷ & Valdemar Luiz Tornisielo⁸*

RESUMO – Este trabalho discute a otimização do método de validação por cromatografia líquida dos hormônios estriol (E3), 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2), os quais são encontrados em corpos d'água e efluentes (entre $\mu\text{g/L}$ a ng/L), apresentando sérios riscos aos organismos vivos. Com isto, metodologias para análise destes hormônios por cromatografia líquida têm sido desenvolvidas, utilizando diversos solventes, objetivando maior sensibilidade metodológica. O objetivo deste trabalho foi otimizar o processo de análise dos três hormônios por cromatografia líquida acoplada a detector de arranjo de diodos (HPLC/DAD) e aplicar o mesmo em amostras reais, testando as seguintes condições: fluxo 1 mL min^{-1} , solventes (metanol, acetonitrila e água ultrapura), comprimentos de onda (λ) de 210, 230, 254 e 280 nm. A melhor condição para E3 foi utilizando água pura e metanol (49:51) com tempo de retenção de 9,24 min, para o EE2 o tempo de retenção foi de 53 min e, para o E2 o tempo de retenção foi de 58 min, comprovando-se que o método é capaz de detectar os hormônios estriol, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol. Amostras dos Rios Piracicaba e Corumbataí foram analisadas e não foram detectadas contaminações pelos hormônios E3, E2 e EE2.

ABSTRACT– This paper discusses the optimization of the method validation by HPLC hormone estriol (E3), 17 β -estradiol (E2) and 17 α -ethynilestradiol (EE2), which are found in water bodies and effluents (between $\mu\text{g/L}$ and ng/L), presenting a serious risk to living organisms. With this, methodologies for analysis of these hormones by liquid chromatography have been developed, using various solvents, aiming more sensitive methodology. The objective of this study was to optimize the analysis process of the three hormones by liquid chromatography coupled with diode array detector (HPLC / DAD) and apply it in real samples, testing the following conditions: flow 1 mL min^{-1} , solvents (methanol, acetonitrile and ultrapure water) the wavelength (λ) of 210, 230, 254 and 280 nm. The optimum conditions for E3 was using pure water and methanol (49:51) with a retention time of 9.24 min, EE2 to the retention time was 53 min and E2 to the retention time was 58 min, proving that the method can detect the hormone estriol, 17 β -estradiol and 17 α -

^{1*} Laboratório de Ecotoxicologia; Avenida Centenário, 303, São Judas; CEP: 13.416-000, Piracicaba, Universidade de São Paulo; Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). *E-mail autor correspondente: nadihortense@gmail.com

² Centro de Aquicultura; Rua Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, CEP: 14.884-900, Jaboticabal, Universidade Júlio de Mesquita Filho. Américo.ju@gmail.com

³ Laboratório de Ecotoxicologia; Avenida Centenário, 303, São Judas; CEP: 13.416-000, Piracicaba, Universidade de São Paulo; Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). cnazato@gmail.com

⁴ Laboratório de Ecotoxicologia; Avenida Centenário, 303, São Judas; CEP: 13.416-000, Piracicaba, Universidade de São Paulo; Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). lumaranho@usp.br

⁵ Faculdade de Tecnologia de Piracicaba; Rua Diacono Jair de Oliveira, s/n, Santa Rosa; CEP: 13.414-141, Piracicaba, (FATEC). Marcia.harder@fatec.sp.gov.br

⁶ Laboratório de Ecotoxicologia; Avenida Centenário, 303, São Judas; CEP: 13.416-000, Piracicaba, Universidade de São Paulo; Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). leilaf.82@gmail.com

⁷ Laboratório de Ecotoxicologia; Avenida Centenário, 303, São Judas; CEP: 13.416-000, Piracicaba, Universidade de São Paulo; Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). franz-cena-usp@hotmail.com

⁸ Laboratório de Ecotoxicologia; Avenida Centenário, 303, São Judas; CEP: 13.416-000, Piracicaba, Universidade de São Paulo; Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). vltornis@cena.usp.br

ethynilestradiol. Samples of the Piracicaba and Corumbataí were analyzed and were not detected contamination by hormones E3, E2 and EE2.

Palavras-Chave – cromatografia líquida; hormônios
INTRODUÇÃO

Alguns fármacos, como os estrógenos e progestógenos, são considerados contaminantes emergentes, dos quais não é possível determinar os seus efeitos no ambiente, não havendo leis que vigorem sobre os valores máximos permissíveis em diversas matrizes ambientais (Kuster *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2012).

Após sua administração, os hormônios são excretados via urina e fezes, quer como substância inalterada ativa ou metabólitos, podendo ser encontrados em ambiente aquático, uma vez que o processo de tratamento da água nas estações de tratamento de águas residuárias (ETE) nem sempre é eficiente (Gros, 2009), podendo chegar ainda às águas subterrâneas por meio da lixiviação (Farré *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008). Isto ocorre devido aos tratamentos convencionais não conseguirem removê-los do corpo hídrico (Gros *et al.*, 2009; López-Serna *et al.*, 2010; Verlicchi *et al.*, 2010; Köck-Schulmeyer *et al.*, 2011)

Os esteróides naturais e sintéticos 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol (EE2) são dispostos em corpos d'água e efluentes (Diniz *et al.*, 2010) e o estriol (E3), particularmente, em quantidades entre 0,1-1 ng/L, ele pode apresentar sérios riscos para a vida aquática e humana (Bila e Dezotti, 2007; Farré *et al.*, 2008; Kuster *et al.*, 2010; López-Serna *et al.*, 2010). Em países como os Estados Unidos, Canadá, Alemanha e Espanha foram encontrados compostos 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol na concentração de $0,5 \text{ ng L}^{-1}$, ao passo que no Brasil foram encontrados em concentrações 1000 vezes superiores (Torres *et al.*, 2012). Em amostras de água potável, dados da literatura demonstram concentrações de $2,1 \text{ ng L}^{-1}$ e $0,5 \text{ ng L}^{-1}$ para o estradiol e etinilestradiol (Bodzek; Dudziak, 2006).

Com isso, o desenvolvimento progressivo de novos métodos e de técnicas analíticas sensíveis utilizando análises multiresíduos por cromatografia (em concentrações da ordem de ng L^{-1}), auxiliam na detecção e quantificação destes compostos nos corpos d'água naturais (Ginebreda *et al.*, 2010). As técnicas analíticas mais utilizadas são a extração em fase sólida (SPE) (López-erna *et al.*, 2010) e também a combinação de SPE com a técnica de detecção por espectrometria de massas (MS) (Farré *et al.*, 2008; Serna *et al.*, 2010). Análises destes compostos também podem ser feitas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a detector de arranjo de diodos (DAD) (Almeida; Nogueira, 2006).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi otimizar o processo de validação do 17 β -estradiol (E2), estriol (E3) e 17 α -etinilestradiol (EE2) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (HPLC/DAD) de modo a torná-lo eficiente para as análises de amostras reais para a verificação de contaminação por estes fármacos.

METODOLOGIA

Reagentes e solventes

Foram utilizados os solventes metanol (MTedia Company, EUA), acetonitrila (MTedia Company, EUA) e água ultrapura (Pura-Q). Os padrões analíticos empregados foram o hormônio estriol E3 (pureza 99,0%), hormônio 17 α -etinilestradiol EE2 (pureza 98,5%) e 17 β -estradiol E2 (pureza 99,0%), obtidos da Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanha).

HPLC/DAD

Neste trabalho foram empregadas as seguintes condições e equipamentos: cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD, modelo 1200, Agilent Technologies), coluna Kromasil 100 C18 (5 μ m x 4,6 x 250 mm), fluxo 1 mL min⁻¹, comprimentos de onda (λ) testados foram de 210, 230, 254 e 280 nm e solventes água ultrapura, metanol e acetonitrila. Nesta etapa foram utilizadas soluções de 10 ppm contendo os três analitos E3, E2 e EE2 diluídos em metanol.

Seleção do modo de eluição e solventes

As fases móveis utilizada para os testes por cromatografia líquida do E2, E3 e EE2, é acetonitrila com água (Magnér *et al.*; 2010) e metanol e água (Diniz *et al.*; 2010). Partindo-se de condições de eluição apresentadas na literatura (Almeida; Nogueira, 2006; Wang *et al.*, 2008) as condições foram otimizadas de modo a obter a melhor resolução possível entre os analitos. Para tanto, foram utilizados os padrões separadamente na concentração de 10 mg L⁻¹. Os testes foram realizados de modo que os analitos apresentassem picos com alta resolução, de acordo com os comprimentos de onda testados.

RESULTADOS

Otimização das condições cromatográficas: escolha do comprimento de onda e fase móvel

Os espectros de absorção UV do E3, E2 e EE2 foram obtidos considerando-se que os máximos de absorção para estas substâncias situam-se entre 200 e 280 nm. Por isto, foram testados alguns comprimentos de onda entre estes valores, ou seja, 210, 230, 254 e 280 nm. Este método de análise foi escolhido pois, se uma varredura é realizada, ocorre uma perda de detectabilidade, se comparado ao comprimento de onda fixo. O E3 e o EE2 foram detectados em seus máximos de absorção nos comprimentos de onda de 210 e 280 nm, respectivamente e, portanto, nas condições de detectabilidade máxima.

Para a escolha da fase móvel, cinco tipos de fases móveis foram avaliadas para separação dos hormônios E3 e EE2: a) água/metanol (gradiente isocrático 50% de água e 50% de metanol); b) água/metanol (gradiente isocrático 20% de água e 80% de metanol); c) água/metanol (gradiente isocrático de 80% de água e 20% de metanol); d) água (gradiente isocrático de 100% de água); e) metanol (gradiente isocrático de 100% de metanol); f) água/acetonitrila (0-5 min 70% de água e 30% de acetonitrila; 5-60 30% de água e 70% de acetonitrila) e; g) água/metanol (gradiente 0-12 min 49:51 e de 12-62 min 51:49). Neste teste foram utilizadas uma coluna Kromasil 100 C18 (5µmx 4,6 x 250 mm), comprimentos de onda de 210, 230, 254 e 280 nm, fases móveis metanol, água ultrapura e acetonitrila, volume de injeção de 20 µL e tempo de corrida cromatográfica de 62 minutos em todos os testes realizados.

Extração das amostras

Para a extração dos compostos E2, E3 e EE2 nas amostras a metodologia foi adaptada de Alda e Barceló (2001) em amostras de água bruta e tratada. Para tanto, cartuchos HLB 500 mg (OASIS, Waters Corporation) foram condicionados com 4 mL de metanol e água. Enquanto isto, 200 mL de amostra a ser extraída foi homogeneizada em ultrasom e filtrados em filtro de fibra de vidro (0,45 µm). Em seguida, a amostra foi transferida para os cartuchos. Depois disto os cartuchos foram lavados em duas vezes com 4 mL de água ultrapura e o sistema permaneceu sob vácuo durante 30 min. A eluição dos analitos foi feita utilizando 8 mL de metanol grau HPLC e o eluato foi levado à secura em banho-maria a 40°C com fluxo de gás N₂. O eluato foi ressuspendido com 4 mL de solução (49% de metanol e 51% água ultrapura). Injetou-se 20 µL do extrato por injeção manual.

Validação da metodologia

A validação do método proposto foi obtida por meio da avaliação dos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, repetibilidade e exatidão.

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho para o EE2, sua melhor absorção foi obtida no comprimento de onda (λ) de 280 nm no tempo aproximado de 53 minutos. Com relação ao E3, o tempo de retenção obtido foi de 9,24 minutos no comprimento de onda (λ) de 210 nm.

Diferentemente de Almeida e Nogueira (2006), os quais obtiveram o tempo de retenção de 25,5 min para o EE2, utilizando como fase móvel a solução aquosa de acetonitrila 10% (solvente A) e acetonitrila, como solvente B, em um gradiente linear de 60 minutos, onde o solvente B foi gradativamente aumentando de 0-100%, a comprimento de onda de 200 nm.

A melhor condição de análise foi na qual o uso da fase móvel continha 51% de metanol e 49% de água ultrapura, proporcionando melhor separação dos analitos, sendo considerada adequada à análise. O gradiente utilizado para as análises dos hormônios E2, E3 e EE2, foi até 12 minutos 49% do solvente A e 51% do solvente B; de 12 a 62 minutos, foram utilizados 51% do solvente A e 49% do solvente B. O solvente A foi água ultrapura filtrada o B foi metanol grau HPLC filtrado.

Utilizando também um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a detector de arranjo de diodos (HPLC/DAD), Almeida e Nogueira (2006), expressaram a melhor absorção para o E3 e o EE2 em 200 nm, utilizando água e acetonitrila (50:50 v/v) como fase móvel no modo isocrático. A acetonitrila foi testada, mas não apresentou detectabilidade para os compostos em estudo e, por isto, não foi utilizada para as análises.

O fato de o composto EE2 apresentar maior tempo de retenção nas condições acima apresentadas deve-se ao fato de haver maior interação com a coluna Kromasil 100 C18 (5 μ m x 4,6 x 250 mm) devido à fase móvel utilizada (metanol e água ultrapura), diferentemente da utilizada por Almeida e Nogueira (2006).

As fases móveis metanol e água ultrapura (49:51) no modo gradiente apresentaram picos bem definidos, isentos de interferência. As demais fases avaliadas não apresentaram picos no tempo de retenção do padrão e nas outras fases móveis não foram identificados picos referentes ao padrão. Os hormônios E2, E3 e EE2 apresentaram absorção em três comprimentos de onda diferentes, mas apresentaram sensibilidade ao utilizar fase móvel metanol e água ultrapura (49:51), no modo gradiente e, por estas razões estes três fármacos foram avaliados nas mesmas fases móveis.

Para avaliação da seletividade, foi feita uma comparação da matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse e deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra. Como resultado obteve-se os tempos de retenção do E3, E2 e EE2, 10 min, 52,8 min e 58,4 min, respectivamente. O método cromatográfico empregado foi, portanto, considerado seletivo, pois o nível de contaminação e/ou interferente presente na amostra branco foi inferior a 30% do limite de quantificação (Torres *et al.*, 2012).

A linearidade para os hormônios avaliados neste trabalho foi observada por meio das equações da reta e os valores dos coeficientes de correlação (r^2). Para tanto, foram utilizadas 5 concentrações injetadas em triplicata, dos quais obteve-se a curva de calibração para cada composto, assim como Wang *et al.* (2008). A linearidade foi observada na faixa entre 0,5 e 4,0 ng L⁻¹ para o método analítico e os coeficientes de correlação foram acima de 0,99 para o E3, E2 e EE2.

Para avaliar a repetibilidade do método cromatográfico, uma mesma amostra do padrão contendo os três compostos a 1,0 ng L⁻¹ foi injetada sete vezes pelo mesmo operador, nas mesmas condições de operação e no mesmo dia. A média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo das medidas do tempo de retenção e da altura dos picos obtidos dos hormônios E3, E2 e EE2, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Repetibilidade do método cromatográfico para a determinação do E3, E2 e EE2.

Hormônio	Parâmetro	Tempo de retenção (min)	Altura (mAu)
E3	Média	10,55	7,14
	Desvio Padrão	11,94	0,39
	Desvio Padrão Relativo	1,81	5,46
E2	Média	52,90	1,93
	Desvio Padrão	8,44	0,21
	Desvio Padrão Relativo	1,09	10,88
EE2	Média	58,46	2,98
	Desvio Padrão	10,59	0,24
	Desvio Padrão Relativo	0,78	8,05

A precisão do método também foi avaliada repetindo-se três vezes a extração seguindo o método já descrito anteriormente e as amostras foram fortificadas em três níveis de concentração (1,0, 2,0 e 3,0 ng L⁻¹), com três repetições cada e injetadas em triplicata. Calculou-se o desvio padrão (s) e o coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (RSD) para cada um dos hormônios. As recuperações variaram de 82 – 112% para o E3, 97 – 100% para o E2 e 65 – 116% para o EE2.

Análise das amostras

As amostras coletadas mensalmente de novembro de 2007 a abril de 2009 (n = 54 amostras), tanto de água tratada, quanto nos pontos de captação (Rios Piracicaba e Corumbataí) das Estações de Tratamento de Água da cidade de Piracicaba. Mas, durante a aplicação da metodologia adaptada e validada, o método não detectou contaminações por nenhum dos hormônios alvo deste estudo (E3, E2 e EE2). Contudo, durante os período de coletas, é possível que as amostras não estivessem contaminadas e o contato da água tratada com o cloro residual proveniente do tratamento, poderia atenuar possíveis contaminantes na água, sabendo-se que o mesmo degrada estas substâncias.

CONCLUSÕES

O método otimizado apresentou características como simplicidade, confiabilidade, baixo custo, baixo consumo de solventes, necessidade de pouca vidraria e resultados satisfatórios para os hormônios E3, E2 e EE2. O método de SPE e HPLC/DAD desenvolvido e validado apresenta valores dos limites de detecção e de quantificação adequados para analisar hormônios nas amostras de água. A metodologia HPLC-DAD nas condições testadas alcançou os objetivos propostos, pois foi demonstrado que representa uma ferramenta valiosa para a utilização da metodologia testada para a monitoração dos hormônios E2, E3 e EE2 em matrizes reais.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à CAPES, CNPq e Fapesp pelo auxílio financeiro.

BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J.M.F. (2006). *“Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection”*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41 (4), pp. 1303-1311.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. (2007) *“Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências”*. Química Nova, 30 (3), pp. 651-666.

BODZEK, M.; DUDZIAK, M. (2006) *“Elimination of steroidal sex hormones by conventional water treatment and membrane processes”*. Desalination, 198 (1-3), pp. 24-32.

DINIZ, M. S.; MAURÍCIO, R.; PETROVIĆ, M.; ALDA, M. J. L.; AMARAL, L.; PERES, I.; BARCELÓ, D.; SANTANA, F. (2010) “*Assessing the estrogenic potency in a Portuguese wastewater treatment plant using an integrated approach*”. *Journal of Environmental Sciences*, 22 (10), pp. 1613-1622.

FARRÉ, M.; PÉREZ, S.; KANTIANI, L.; BARCELÓ, D. (2008) “*Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment*”. *Trends in Analytical Chemistry*, 27 (11), pp. 991-1007.

GINEBREDÁ, A.; MUÑOZ, I.; ALDA, M. L.; BRUX, R.; LÓPEZ-DOVAL, J.; BARCELÓ, D. (2010) “*Environmental risk assessment of pharmaceuticals in river: Relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain)*”. *Environmental International*, 36 (2), pp.153-162.

GROS, M.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. (2009) “*Tracing Pharmaceutical Residues of Different Therapeutic Classes in Environmental Waters by Using Liquid Chromatography/Quadrupole-Linear Ion Trap Mass Spectrometry and Automated Library Searching*”. *Analytical Chemistry*, 81 (3), pp. 989-912.

KUMAR, K. A.; MOHAN, S. V.; SARMA, P. N. (2009) “*Sorptive removal of endocrine-disruptive compound (estriol, E3) from aqueous phase by batch and column studies: Kinetic and mechanistic evaluation*”. *Journal of Hazardous Materials*, 164 (1-2), pp. 820-828.

KUSTER, M.; DÍAZ-CRUZ, S.; ROSSEL, M.; ALDA, M.L.; BARCELÓ, B. (2010) “*Fate of selected pesticides, estrogens, progestogens and volatile organic compounds during artificial aquifer recharge using surface waters*”. *Chemosphere*, 79 (8), pp. 880-886.

KÖCK-SCHULMEYER, M.; GINEBREDÁ, A.; POSTIGO, C.; LÓPEZ-SERNA, R.; PÉREZ, S.; BRUX, R.; LLORCA, M.; ALDA, M. L. A.; PETROVIC, M.; MUNNÉ, A.; TIRAPU, LLUÍS.; BARCELÓ, D. (2011) “*Wastewater reuse in Mediterranean semi-arid areas: The impact of discharges of tertiary treated sewage on the load os polar micro pollutants in the Llobregat river (NE Spain)*”. *Chemosphere*, 82 (5), pp. 670-678.

LÓPEZ-SERNA, R.; PÉREZ, S.; GINEBREDÁ, A.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. (2010) “*Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste by online solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry*”. *Talanta*, 83 (2), pp.410-424.

MAGNÉR, J.; FILIPOVIC, M.; ALSBERG, T. (2010) “*Application of a novel solid-phase-extraction sampler and ultra-performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry for determination of pharmaceutical residues in surface sea water*”. *Chemosphere*, 80 (11), pp.1255–1260.

TORRES, N.H.; ROMANHOLO FERREIRA, L.F.; AMÉRICO, J.H.P.; MOURA-ANDRADE, G.C.R.; FREGUGLIA, R.M.O.; TORNISIELO, V.L. (2012) “*Analysis and occurrence of residues of the hormones estriol, 17 α -ethinylestradiol and 17 β -estradiol in urban water supply by HPLC-DAD*”. *IOSR Journal of Engineering*, 2(5), pp. 984-989.

VERLICCHI, P.; GALLETI, A.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. (2010) “*Hospital effluents as a source of emerging pollutants: An overview of micropollutants and sustainable treatment options*”. *Journal of Hydrology*, 389 (3-4), pp.416-428.

WANG, S.; HUANG, W.; FANG, G.; HE, JINXING.; ZHANG, Y. (2008) “*On-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of estrogens in environment*”. *Analytica Chimica Acta*, 606 (2), pp. 194-201.