



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

LÚCIA GUÊZO ALMEIDA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO PARA ANÁLISE DE 17 α -
ETINILESTRADIOL E BISFENOL-A EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS POR
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

São Luís - MA
2012

LÚCIA GUÊZO ALMEIDA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO PARA ANÁLISE DE 17 α -
ETINILESTRADIOL E BISFENOL-A EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS POR
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão, requisito exigidos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação

Orientadora: Profa. Dra. Natilene Mesquita Brito

São Luís - MA
2012

LÚCIA GUÊZO ALMEIDA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO PARA ANÁLISE DE 17 α -
ETINILESTRADIOL E BISFENOL-A EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS POR
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão, requisito exigidos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Natilene Mesquita Brito - IFMA

Profa. Dra. Raimunda Nonata Fortes Carvalho Neta

Profa. Dra. Gilda Vasconcellos de Andrade

“À João Gabriel, razão da minha vida.”

RESUMO

Este trabalho visou desenvolver um método de extração eficiente para possibilitar a identificação e quantificação de dois compostos que estão em crescente estudo no meio científico, o Bisfenol-A (BPA) e o 17 α -etinilestradiol (EE2) em organismos de girinos utilizados em testes ecotoxicológicos. Para isso, a técnica utilizada foi a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O BPA é uma substância amplamente utilizada durante os processos industriais como monômero na produção de policarbonatos, polímeros, resinas epóxi e resinas de poliéster-estireno insaturadas, além de ser utilizado como revestimento interno nas latas de alumínio usadas em bebidas, como selante dentário, como antioxidante, dentre outras. O EE2 é um hormônio estrogênio muito usado em pílulas anticoncepcionais que possui efeitos muito parecidos com os do BPA com potencial de distúrbios hormonais, capazes de provocar efeitos adversos à saúde de animais e do ser humano. Para a otimização dos procedimentos realizou-se 4 testes de extração que variaram segundo estudos relatados na literatura. Dos procedimentos realizados, o que melhor ofereceu recuperação foi o teste 4 que obteve 52% para o BPA e 32% para o EE2, sendo portanto, aceitável apenas para análise do BPA. Este teste foi realizado em quatro etapas utilizando de dispersão em fase sólida com hexano e extração líquido-líquido com acetonitrila, finalizando a extração com a total evaporação e restituição da amostra com 2 ml de acetonitrila. Animais oriundos de ensaios ecotoxicológicos com o BPA foram analisadas sendo submetidos aos procedimentos descritos no teste 4, onde os mesmos não apresentaram a presença do composto.

Palavras-chave: Desreguladores Endócrinos, Testes de Extração, CLAE-Fluorescência, Anfíbios.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Propriedades físico-químicas e outras características do EE2.	17
Tabela 2.	Estrutura química, propriedades físico-químicas e outras características do BPA.	19
Tabela 3.	Métodos de extração e técnicas de análise do EE2 e do BPA mais utilizados.	23
Tabela 4.	Procedimentos dos ensaios de extração realizados.	27
Tabela 5.	Condições Cromatográficas Seleccionadas.	29

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me mostrar todos os dias, que o mundo pode ser muito melhor, e que a vida vai muito além do que pensamos, por me dar o maior título que poderia atingir na vida, o título de mãe.

À minha orientadora Prof^a.Dr. Natilene Mesquita Brito, não só por sua orientação e dedicação a este trabalho, mas pelo respeito nos momentos em que precisei.

Ao professor Ozelito Possidônio de Amarante Junior, pela constante orientação, eterno mestre.

Ao Laboratório de Herpetologia da UFMA, em especial à professora Gilda V. Andrade e à bióloga Aline Magalhães pela parceria nos trabalhos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação pela assistência e acompanhamento disponibilizados aos alunos do curso.

À Ana Lúcia, secretária do mestrado em Biodiversidade e Conservação, pela gentileza, afetividade e dedicação em atender as necessidades de todos os alunos.

Ao IFMA, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, por permitir o uso do laboratório de Análises Químicas, assim como professores e funcionários que sempre auxiliam em todo o processo.

À minha família: meus queridos pais, responsáveis por minha criação e por quem faço tudo; aos meus amados irmãos: pelos momentos de descontração e felicidade.

À Gabriel Moura, amor da minha vida, que nesse período tornou-se meu marido e me presenteou com o maior milagre da vida, João Gabriel, nosso filho.

À Karla Caroline, pelas impagáveis horas ao meu lado. Apoiando-me em todos os momentos da vida, sejam eles profissionais ou pessoais.

À querida amiga Suzy, por sempre estar ao meu lado desde que nos conhecemos. Sua ajuda foi indispensável durante todo esse período, me apoiando como amiga e orientadora.

À todos os amigos que conquistei no curso de mestrado, que muito contribuíram com minhas inquietações na busca desta pesquisa.

À muitos outros que foram grandes motivadores nesta instituição; funcionários, colegas de curso, professores, pesquisadores, dentre outros.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Algumas glândulas do sistema endócrino. Fonte: Adaptado de Visible Body 2.	14
Figura 2.	Modos de interferência dos disruptores endócrinos no sistema endócrino	15
Figura 3.	Cromatograma da solução-padrão Bisfenol A na concentração 1 mg.L ⁻¹ e EE2	30
Figura 4.	Curva analítica para o composto BPA.	31
Figura 5.	Curva analítica para o composto EE2	31
Figura 6.	Cromatograma da injeção da acetonitrila do produto do Teste 4.	34
Figura 7.	Comparação dos valores de recuperação entre os quatro ensaios de Extração (T ₁ , T ₂ , T ₃ e T ₄).	34
Figura 8.	Cromatograma da injeção da amostra real.	35

LISTA DE SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPA	Bisfenol-A
C18	Sílica modificada com Silano contendo o Grupo Octadecil
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo
CG	Cromatografia a Gás.
CLAE	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência .
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
DE	Desregulador Endócrino
EE2	17 α -etinilestradiol
EFS	Extração em Fase Sólida
FL	Fluorescência
MeOH	Metanol
VTG	Vitelogenina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo Geral	13
2.2	Objetivos Específicos	13
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
3.1	Desregulação Endócrina	14
3.1.1	17 α -etinilestradiol	17
3.2	Estudos Ecotoxicológicos	20
3.3	Técnicas Analíticas e Métodos de Extração para Análise de BPA e EE2	22
3.3.1	Técnicas Analíticas	22
3.3.2	Extração	23
4	METODOLOGIA	25
4.1	Obtenção da amostra	25
4.2	Materiais Utilizados	25
4.3	Preparo da amostra	26
4.4	Teste de Otimização	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
5.1	Ensaio Ecotoxicológicos com Bisfenol A e 17 α -etinilestradiol	28
5.2	Otimização das Condições Cromatográficas para BPA e EE2	29
5.3	Curvas Analíticas	31
5.4	Aplicação do Método de Extração em Amostras Reais	32
6	CONCLUSÃO	35

1 INTRODUÇÃO

A ampla exposição de organismos a agentes químicos com poder de desregulação endócrina, largamente utilizados na produção plásticos, remédios, embalagens de alimentos, cosméticos, dentre outros produtos, vem progressivamente preocupando a sociedade científica, já que tais compostos provocam efeitos que têm sido relatados todos os anos em organismos de diversas espécies, em regiões de todo o planeta.

O avanço tecnológico trouxe consigo facilidades e inovações para o atual modelo de desenvolvimento, portanto, trouxe também produtos à base de substâncias químicas agressivas e que são inseridas em nosso meio, sem advertências ou sem as devidas pesquisas adequadas que relatem os possíveis danos causados. Atualmente, mais de 100.000 substâncias químicas utilizadas na agricultura, em aplicações domésticas e industriais, chegam ao ambiente contaminando-o com compostos que pertencem aos grupos de fármacos, produtos de higiene pessoal e um novo grupo designado desreguladores endócrinos (DEs) (BIRKETT e LESTER, 2003).

Os DEs são substâncias químicas que alteram as funções do sistema endócrino mimetizando a ação dos hormônios naturais nos organismos vivos (atividade estrogênica) e podem ser naturais ou sintéticos. As alterações provocam desde distúrbios comportamentais até doenças como o câncer e, em alguns casos, causam a morte da prole de espécies contaminadas (BIKETT e LESTER, 2003). Em geral, os desreguladores endócrinos são compostos muito estáveis e lipofílicos. A função hormonal mais afetada por estes agentes é o mecanismo de regulação dos esteróides, que determina especialmente as características sexuais e comportamentais das espécies (NOGUEIRA, 2003). Muitos estudos estão sendo realizados a fim de descobrir os efeitos causados por essas substâncias em diversos organismos, dentre eles, destacam-se os roedores, diferentes espécies de peixes e alguns anfíbios, alguns trabalhos já relataram efeitos em organismo humano.

A metamorfose de anfíbios serve como importante modelo de estudo para a ação dos hormônios em nível celular, sendo assim, a ação dos desreguladores endócrinos pode ser observada com a metamorfose dos anfíbios, o que torna a

utilização desses organismos de grande importância ecotoxicológica, já que são animais suscetíveis à liberação de uma série de substâncias químicas no ambiente e se torna possível verificar efeitos dessas substâncias nos seres vivos (BLAUSTEIN, 1994).

Segundo Melo (2011) no Maranhão são poucas as pesquisas que trabalham com quantificação de desreguladores endócrinos, assim como efeitos em organismos vivos, com exceção do trabalho publicado em 2010 por Verbinnen, Nunes e Vieira quando analisaram água potável, entretanto, análises químicas com a quantificação desses compostos em organismos vivos não foram publicadas ainda.

Considerando a situação apresentada e para contribuir com novas pesquisas no Maranhão envolvendo DEs, o estudo em questão é parte de um projeto maior, descrito posteriormente, que envolve, além de análises químicas, estudos ecotoxicológicos com anfíbios da região. Portanto, propôs-se estudar dois desreguladores endócrinos que são o estrogênio sintético 17 α -Ethinilestradiol e o monômero de plástico Bisfenol A nos organismos de sapos utilizados em ensaios ecotoxicológicos. A etapa de determinação dos compostos nos organismos compreende este estudo e a etapa de ensaios ecotoxicológicos foi realizada juntamente com a equipe do laboratório de ecologia e herpetologia aplicada da Universidade Federal do Maranhão, que dividiu os trabalhos em dois projetos diferentes, um para cada substância.

Neste trabalho, quatro procedimentos de extração são testados a fim de se obter a melhor metodologia para a análise em sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver metodologia de extração do hormônio estrógeno sintético 17 α -Ethinilestradiol (EE2) e o xenoestrogênio Bisfenol A (BPA) em amostras de girinos da espécie *Physalaemus cuvieri* para posterior detecção e/ou quantificação utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Fluorescência (CLAE-FL).

2.2 Objetivos Específicos

- a. Determinar um método de separação cromatográfica para os disruptores endócrinos (DEs) EE2 e BPA empregando um sistema de CLAE/FL
- b. Desenvolver procedimento de extração das amostras, mediante a realização de ensaios de recuperação por procedimentos de dispersão em fase sólida (DFS) e extração líquido-líquido (ELL) com detecção e/ou quantificação final por CLAE/FL;
- c. Determinar e/ou quantificar a presença dos DEs EE2 e BPA em indivíduos utilizados anteriormente em testes ecotoxicológicos, via CLAE/FL.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Desregulação Endócrina

O sistema endócrino é composto por um mecanismo complexo constituído por combinações de glândulas e hormônios que coordena e regula a comunicação entre células, sendo responsável pelas funções biológicas normais como reprodução, crescimento, desenvolvimento embrionário e metabolismo (NOGUEIRA, 2003). Como pode ser observado na Figura 1, ele é formado por um conjunto de glândulas localizadas em diferentes áreas do corpo, como as gônadas, a tireóide, e as glândulas supra-renais, e pelos hormônios por elas sintetizados, tais como a adrenalina, tiroxina, os estrogênios, progestagênios e a testosterona (GHISELLI e JARDIM, 2007).

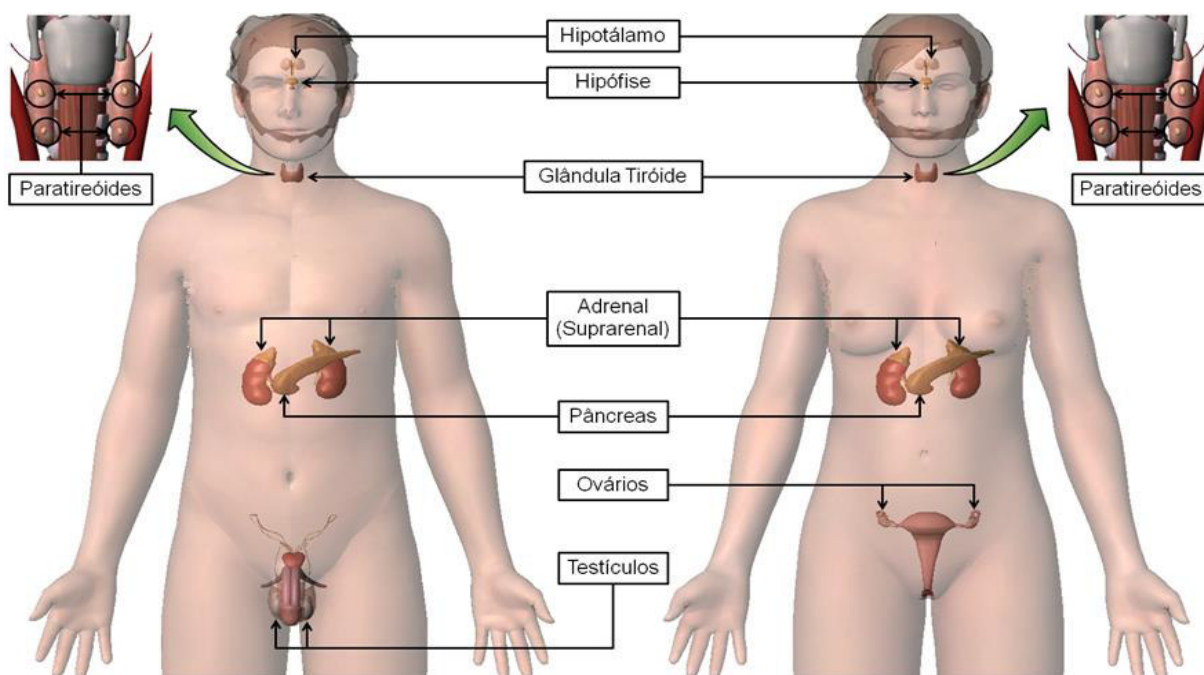


Figura 1. Algumas glândulas do sistema endócrino. Fonte: Adaptado de Visible Body 2.

Cada órgão que o compõe, tem uma característica fundamental que é segregar certo tipo de hormônio. Cada hormônio tem suas funções que são principalmente de efeito regulador em outros órgãos (GUIMARÃES, 2008). Os hormônios são mensageiros químicos que respondem pela comunicação entre

diferentes tipos de células. As células identificam os hormônios através de receptores que são estruturas proteicas especializadas em reconhecimento molecular (SIMMONDS, 1992). Depois da aproximação e interação (hormônio-receptor), uma série de reações bioquímicas ocorre levando respostas biológicas específicas (Figura 2a) (SOLOMONS, 2000).

Recentemente, estudos mostraram mudanças na reprodução de animais e seres humanos, possivelmente devido à presença de alguns tipos especiais de micropoluentes em águas superficiais e subterrâneas denominados de desreguladores endócrinos (DEs) (FERREIRA, 2008). Segundo Bisket e Lester (2003), tais compostos desregulam o funcionamento do sistema endócrino de diversos organismos, uma vez que interferem na dinâmica dos hormônios endógenos, mimetizando-os ou inibindo-os, alterando as funções normais do organismo (Figura 2).

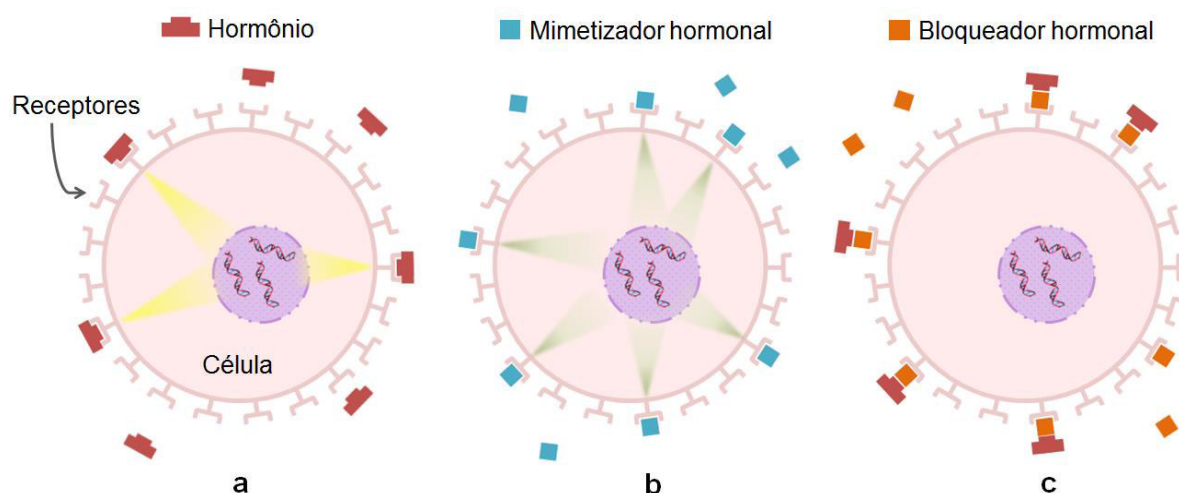


Figura 2. Modos de interferência dos disruptores endócrinos no sistema endócrino. a) Resposta natural; b) Efeito agonista e c) Efeito antagonista. Fonte: Adaptador BISKET e LESTER, 2003.

A Figura 2a, mostra o mecanismo de resposta natural do organismo, onde ocorre o envio da mensagem biológica por meio de sinais bioquímicos através da interação entre o hormônio endógeno e o receptor celular. Já a Figura 2b, demonstra um agente exógeno agonista (mimetizador hormonal) interagindo com o receptor celular gerando uma mensagem biológica diferenciada e/ou excessiva, e a Figura 2c, representa um agente exógeno antagonista (bloqueador hormonal) interferindo

no mecanismo de mensagem biológica enviada pelo hormônio endógeno por meio do bloqueio do receptor celular.

Várias são as substâncias que possuem essa capacidade de afetar o sistema endócrino, tais como: alquilfenóis, pesticidas, policlorados de bifenilas, algumas substâncias farmacêuticas, dentre outras (CASTRO, 2002). Muitos DEs são persistentes no ambiente, são facilmente transportados a longas distâncias pela atmosfera de suas fontes acumulando-se no solo e no sedimento de rios. Podendo, acumulassem também ao longo da cadeia trófica, representando um sério risco à saúde daqueles que se encontram no topo da cadeia alimentar, ou seja, os seres humanos (MEYER, 1999).

Pesquisas relacionadas à suposição de que substâncias químicas no ambiente podem estar ligadas a efeitos estrogênicos vêm sendo relatados desde o ano de 1923 (BAKER, 2001). Entretanto, nos últimos 10 anos a preocupação de ambiental em torno dos DEs tornou-se mais evidente. Em função disso, foram desenvolvidos vários trabalhos com o objetivo de avaliar os efeitos adversos dessas substâncias à saúde humana e animal (REIS FILHO et al, 2006)

Efeitos como desenvolvimento sexual anormal, redução da fertilidade masculina, alterações nas glândulas tireóides, supressão imunológica, efeitos neurocomportamentais, além de desenvolvimento de câncer de próstata ou mama, podem ser observados em diversos organismos, destacando-se, também, a feminização de alguns peixes (GUIMARÃES, 2005)

Bhatt (2000) relata a exposição constante a compostos com atividade estrogênica causam efeitos adversos a saúde reprodutiva. Os DEs estão cada vez mais relacionados com a infertilidade, irregularidade menstrual e abortos espontâneos, além de efeitos anormais em bebês e câncer de mama (HESS, 2010).

Um exemplo que tais compostos poderiam estar induzindo a um fenômeno chamado de “estrogenização” dos seres vivos foi a ocorrência determinada da disfunção erétil em trabalhadores agrícolas expostos a pesticidas organoclorados e solventes (OLIVA et al, 2002).

Em relação aos efeitos de fármacos DEs, tem-se como exemplo o estrógeno sintético 17 α -etinilestradiol (EE2) que é amplamente usado na medicina em terapias de métodos contraceptivos, destacando-se por possuir alto potencial

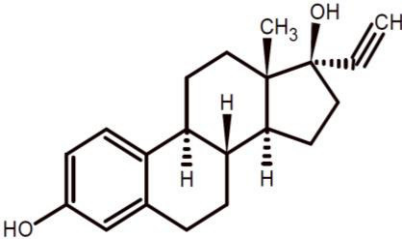
estrogênico, tem sido classificado como um dos maiores responsáveis em provocar alterações endócrinas em organismos expostos a águas superficiais contaminadas (GOMES et al, 2003)

Outro composto com atividade estrogênica comprovada é o monômero de plastificantes chamado de Bisfenol A (BPA). Ele pode ser encontrado em diversos materiais, como em embalagens de alimentos, selantes dentários, mamadeiras e brinquedos infantis (WILKINSON e LAMB, 1999). Estudos demonstraram que resíduos de BPA podem ser encontrados em alguns alimentos devido a sua migração das embalagens (KUO & DIN, 2004).

3.1.1 17 α -Ethinilestradiol (EE2)

O EE2 é formado por uma estrutura principal chamada de ciclo [a]fenantreno e caracterizado pela tripla ligação (etnil) no carbono 17, e é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal. Ele pode ser descrito como um pó branco e sem odor característico. Suas propriedades físico-químicas e algumas outras características estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas e outras características do EE2

Parâmetro	17 α -Ethinilestradiol
Nome IUPAC	17 α -Etil-1,3,5(10)-Estratriene-3,17 β -diol
Fórmula Molecular	C ₂₀ H ₂₄ O ₂
Formula estrutural	
Número CAS	53-16-7
Massa Molar	296,4 g.mol ⁻¹
Ponto de Ebulição	°C
Solubilidade em água à 25 °C	483 μ g.L ⁻¹
Log Kow (coeficiente de partição octanol-água)	3,67
Parâmetro	17 α -Ethinilestradiol
pKa	10,7
Tempo de meia-vida em água	4 a 6 (dias)

Fonte: FENG et al (2005); YING et al (2002); LAI et al (2000).

O EE2 é o principal estrogênio sintético, sendo encontrado nas pílulas anticoncepcionais e aplicado em terapias de reposição hormonal. Segundo Gray et al. (2000), ele possui a melhor conformação reconhecida pelos receptores e, portanto, resultam em respostas máximas, sendo considerados como responsáveis pela maioria dos efeitos perturbadores gerados pela disposição no ambiente.

O EE2 é um dos desreguladores endócrinos mais importantes encontrado no ambiente aquático, por ser altamente estrogênico e resistente à biodegradação. Snyder et al. (1999) expõe que o EE2 foi muito mais persistente à biodegradação em estações de tratamento de efluentes do que os estrogênios naturais devido à presença do grupo etinil.

Em estudo realizado na Suécia para avaliar os efeitos de fármacos no ambiente, foram selecionados vinte e sete ingredientes ativos, concluiu-se que os hormônios estradiol e EE2 apresentam maiores riscos ao ambiente aquático. Os critérios de escolha para avaliar os microcontaminantes foram: estatística de venda, meia vida, biodegradabilidade e ocorrência no meio ambiente (CARLSSON et al., 2006).

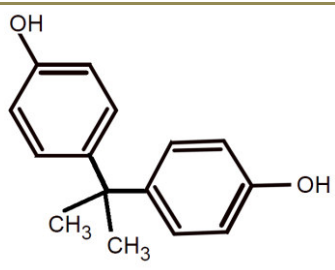
Apesar do grande número de pesquisas pelo mundo, no Brasil ainda são recentes os estudos em relação aos desreguladores endócrinos, principalmente envolvendo os hormônios sexuais estrogênios que também são considerados poluentes orgânicos com grande potencial poluidor. Segundo Johnson e Williams et al. 2004, até 40% das doses de estrogênios sintéticos administrados nas pacientes podem ser depositadas no ambiente aquático.

3.1.2 *Bisfenol A (BPA)*

Bisfenóis são compostos com estrutura química de difenilalcanos hidroxilados, que contêm dois anéis aromáticos conectados por uma ligação carbono-carbono (Tabela 2). Bisfenóis com grupo OH na posição *para*, e configuração angular, como o BPA, são adequados a fazerem ligações de hidrogênio com os sítios receptores estrogênicos (RODRIGUES, 2007).

O BPA é um produto muito comercializado para utilizado para fabricação de plásticos policarbonatos. Ele pode é encontrado sob a forma de flocos sólidos ou pó, com coloração variando de branco a marrom claro e sem odor característico (CETESB, 2005). A estrutura química, as propriedades físico-químicas e algumas outras características do BPA estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Estrutura química, propriedades físico-químicas e outras características do BPA

Parâmetro	Bisfenol A (BPA)
Nome IUPAC	2,2-bis-4-hidroxifenil propano
Fórmula Molecular	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Formula estrutural	
Número CAS	80-05-7
Massa Molar	228,29 g.mol ⁻¹
Ponto de Ebulição	157 °C
Solubilidade em água à 25 °C	300 µg.L ⁻¹
Densidade relativa a 25°C	1,195
Log Kow (coeficiente de partição octanol-água)	2,5 – 3,3
pKa	9,6
Tempo de meia-vida em água	1 a 150 (dias)

Fonte: STAPLES (1998) CETESB (2005); LIBARDI JUNIOR (2010).

Os dados toxicológicos para o BPA são: dose letal para 50 % (LD₅₀) para ratos de 3,300 mg.kg⁻¹ via oral; LD₅₀ para camundongos de 2,500 mg.kg⁻¹ via oral e de 150 mg.kg⁻¹ via dérmica (intra-peritonal); LD₅₀ para coelhos de 2,230 mg.kg⁻¹ via oral; LD₅₀ para mamíferos de 6,500 mg.kg⁻¹ via oral. Este composto é irritante para o nariz, garganta, olhos e pele (CETESB, 2005).

A atividade estrogênica do BPA foi descoberta ocasionalmente. Pesquisadores da Universidade de Stanford identificaram uma proteína ligadora de estrogênio em levedura e, posteriormente, estudaram a existência de um ligante endógeno acoplado a esta proteína. Depois do primeiro relato de que a levedura

produzia E2, esses autores verificaram que a atividade estrogênica não era proveniente da levedura, mas sim do meio de cultura preparado com água autoclavada em frasco de polycarbonato. A substância foi purificada e identificada como BPA. Aproximadamente 2 a 3 mg.L⁻¹ foram detectados em água autoclavada. A seguir, foi demonstrado que o BPA satisfaz todos os critérios para substância estrogênica, com dose mínima efetiva de 10 a 20 nM (GOLOUBKOVA; SPRITZER, 2000).

O interesse ambiental e de saúde pública com relação à presença de BPA no ambiente baseia-se no fato de que este composto pode apresentar efeitos endócrinos em concentrações menores que 1mg.L⁻¹ (WATABE, 2004).

3.2 Estudos ecotoxicológicos

O conceito de Ecotoxicologia foi proposto por Blaise em 1984 que a define como a ciência que estuda os efeitos dos poluentes aos organismos e como esses interagem com seus habitats, permitindo avaliar os danos ocorridos nos diversos ecossistemas após a contaminação e também prever impactos futuros.

A presença de substâncias desreguladoras endócrinas no ambiente, mesmo em baixas concentrações, apresenta um grande impacto negativo para populações em desenvolvimento, podendo colocar em risco a saúde humana, e a de várias espécies de animais. Como um todo, as alterações em animais já relatadas incluem feminilização de machos, masculinização de fêmeas, redução da fertilidade, redução da viabilidade da prole, aumento da secreção hormonal, aumento da atividade hormonal e alteração do comportamento sexual (HIRSOVA, 2012).

Uma pesquisa realizada em 2005 observou que a exposição de células do pâncreas a 10 ng L⁻¹ de BPA por 24 horas foi capaz de provocar a secreção de insulina acima do seu nível normal (ADACHI et al., 2005). No mesmo período, Canesi et al. (2005) relatou desregulação celular no organismo de mexilhões da espécie *Mytilus hemocytes* em experimentos realizados com o composto.

Chung et al.(2011) contaminou a espécie de Peixe-zebra com BPA e verificou danos no desenvolvimento cerebral dos animais, mesmo efeito relatado por Hinfray et al. (2010) quando realizou os testes com a mesma espécie de peixes

utilizando o EE2, além deste efeito, o autor enfatiza a síntese de VTG (vitelogenina) em machos, proteína sintetizada apenas por fêmeas. Essa síntese foi observada também por Velasco et al. (2010), quando empregou EE2 em peixes machos, observando diminuição dos órgãos sexuais.

Angus (2005) expôs indivíduos da espécie de peixes *Gambusia affinis* a diferentes concentrações de EE2 na dieta durante o período de maturação sexual, onde uma clara influência inibidora do EE2 sobre o desenvolvimento sexual foi detectada. A proporção de machos em cada grupo de tratamento que não conseguiram completar o desenvolvimento gonopodiais durante o período de observação de 150 dias foi significativamente elevada.

Veiga et al. (2010) expôs ratos machos no período pré-púbere ao BPA, onde identificou sérios danos à estrutura testicular dos roedores, enquanto Cabaton et al. (2010) detectou a diminuição da capacidade reprodutiva de fêmeas roedoras contaminadas com 25 µg kg do composto. Experimentos realizados por Susiarjo (2008) associaram os danos causados pelo BPA em embriões de ratos a um aumento de aneuploidias, um tipo de anomalia encontrada em abortos espontâneos em humanos.

Heimeier (2010) menciona em seu trabalho realizado com sapos da espécie *Xenopus laevis* que a metamorfose desses organismos compartilha similaridade com o período embrionário humano, argumentando possíveis efeitos similares de compostos desreguladores do sistema endócrino em seres humanos.

Manahan (2003) alerta que a principal preocupação ecotoxicológica com os estrogênios implica na alta capacidade de afetar a reprodução das espécies e de colocar em risco o desenvolvimento da prole. Devido a isso, o estágio de desenvolvimento em que a exposição à substância acontece é extremamente importante, pois, em espécies aquáticas onde a fase embrio-larval é crítica, danos irreversíveis podem ser provocados.

Apesar de muitos estudos recentes discutirem os reais efeitos de tais compostos em organismos vivos, ainda se faz necessário quantificar os reais valores desses compostos nos organismos que causam os efeitos relatados, para isto, faz-se necessária a otimização do processo de extração de tais compostos, fazendo o tratamento adequado da amostra para a técnica de CLAE.

3.3 Técnicas Analíticas e Métodos de Extração para Análise de BPA e EE2

3.3.1 Técnicas Analíticas

Muitos trabalhos já foram desenvolvidos com os dois compostos estudados neste projeto. Portanto, as matrizes estudadas em sua maioria são de natureza aquosa, deixando a revisão bibliográfica ainda carente de literatura para amostras biológicas.

A CLAE e a Cromatografia a Gás (CG) são os métodos de separação e determinação mais aplicados na análise de traços por serem sensíveis e capazes de detectar quantidades mínimas de 10^{-12} g e 10^{-9} g, respectivamente.

A CG por um bom tempo foi a técnica mais utilizada na determinação de estrogênios como o EE2 em ambientes aquáticos, porém ela exige que as substâncias sejam voláteis e termicamente estáveis, no caso do EE2 e BPA, que possuem baixa volatilidade, é necessário a derivatização da amostra que pode ocasionar redução da recuperação do analito, além de ser uma técnica laboriosa (GOMES et al, 2003).

Na determinação de estrogênios vários são os detectores utilizados, na CG o espectrômetro de massas é o mais utilizado, já na CLAE são: o ultravioleta com varredura de diodos (UV-DAD), o fluorescência (FL), o eletroquímico e recentemente o espectrômetro de massas (EM) (REIS FILHO et al. 2006). A detecção por fluorescência possui uma excelente seletividade (muitos compostos e impurezas não fluorescem naturalmente, não aparecendo neste detector), além disso, possui uma elevada sensibilidade com frequência que detecta valores inferiores a 10^{-12} gramas (LANÇAS, 2009).

3.3.2 Extração

Pela dificuldade nas análises de matrizes ambientais, pelas concentrações dos analitos a níveis de traço e para não ocorrer interferência e

incompatibilidade da amostra com o equipamento, geralmente se faz antes um preparo da amostra. As técnicas de extração e/ou concentração permitem que a análise seja realizada, pois tem como objetivo isolar e concentrar os analitos a níveis considerados e proporciona limpeza da amostra facilitando a sua análise no equipamento.

As técnicas de extração mais comuns são: extração líquido-líquido, extração em fase sólida (Solid Phase Extration - SPE), e a microextração em fase sólida (Solid Phase Micro-extraction - SPME). A extração líquido-líquido é a técnica mais utilizada quando se trata de amostras de água, porém tem como desvantagens utilizar grandes volumes de solventes orgânicos, introduzir vapores no ambiente, dificuldades de automação e apresentar baixa reprodutibilidade (Lanças, 2004).

Denominada originalmente, Dispersão em Fase Sólida, esta técnica é uma modificação da SPE, foi desenvolvida afim de se trabalhar com amostras sólidas e semi-sólidas tais como matrizes biológicas (Lanças 2009).

A tabela 3, lista alguns trabalhos da literatura com métodos de extração e técnicas de análise do EE2 e do BPA.

Tabela 3. Métodos de extração e técnicas de análise do EE2 e do BPA mais utilizados.

Composto	Matriz	Extração e/ou concentração	Método	Referências
EE2	Urina	SPE	CLAE/MS/MS	Jenny et al., 2009
BPA	Água superficial	ELL/SPE	CG/MS	Ghiselli, 2006
EE2	Urina	SPME	CLAE/DAD	Almeida & Nogueira, 2006
BPA	Alimentos	SPME/Derivatização	CG/MS	Viñas et al. 2010
EE2	Água potável e efluente	SPE	CLAE/DAD/EM	Alda e Barceló, 2000
BPA	Leite	PLE	CLAE/MS/MS	Ferrer et al. 2011
EE2	Efluente e água superficial	Derivatização e SPE	CG/MS e CG/MS/MS	Quintana, 2004
BPA	Água superficial	SPE	cLC	Kozlick et al. 2011
EE2	Água superficial	SPME	CLAE/FL	Wen, 2006
Composto	Matriz	Extração e/ou concentração	Método	Referências
BPA	Amostra Placentária	Extração com solvente	CL/MS/MS	Jiménezdíaz et al. 2011
EE2	Água natural	SPE	CG/EI/MS/MS	Noope, 2005
BPA	Urina Humana	SPE	CE/V	Mei et al, 2011

EE2	Água potável	SPE	CLAE/DAD	Verbinenn, 2009
BPA	Soro Humano	SPE	CG/MS	Dirtu et al, 2008
EE2	Água superficial	SPE	CLAE/MS	Rodriguez, 2004
BPA	Sangue Humano	SPE	CLAE/MS	Shintani, 2001
EE2	Águas residuais	ELL e derivatização	CG/MS	Kolpin, 2002
BPA	Urina Humana	SPE	CLAE/MS	Cantowine et al, 2011
EE2	Água natural	ELL	CLAE/MS/MS	Westerhoff, 2005
BPA	Saliva	ELL	CLAE/MS	Yang et al, 2011
EE2	Tecido de frango	DSPE	CLAE/UV	Wang et al, 2011
EE2	Águas superficiais	SPE	CLAE/ESI/MS	Masunaga, 2000
EE2	Águas estuarinas	SPE	CG/MS	Thomas et al. 2001
EE2	Efluente	SPE	CG/MS	Desbrow et al, 1998
EE2	Águas residuais e superficiais	SPE	CG/MS/MS	Belfroid, 1999
EE2	Água superficial	SPE	CLAE/MS	Barcelo, 2001
EE2	Esgoto doméstico	SPE	CLAE/MS/MS	Baronti, 2000
EE2	Esgoto sintético e esgoto doméstico	SPE	CLAE/DAD e CLAE/FL	Araújo, 2006
EE2	Água	SPE	CLAE/MS	Isobe, 2003
EE2	Água superficial e Efluente	SPE	CG/EM	Jeannot et al, 2002

A determinação direta quando se trata de estrogênios, ou seja, sem as etapas de hidrólise e derivatização, são de grande interesse. Sendo assim, aliando as vantagens da cromatografia líquida com a maior sensibilidade do detector de fluorescência, a determinação de estrogênios por CLAE-FL torna-se uma das melhores opções para este trabalho.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção da amostra

Amostras de sapos da espécie *Physalaemus Cuvieri* provenientes de ensaios ecotoxicológicos realizados no Laboratório de Herpetologia e Ecologia Aplicada à Conservação, da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) foram cedidos ao estudo para a realização dos testes de extração. Para a etapa de otimização da extração, os indivíduos usados nos testes eram do grupo de ensaio controle, onde os mesmos não entraram em contato com qualquer contaminante.

Já na aplicação do método proposto ao fim dos testes, os sapos utilizados no experimento foram resultantes do mesmo ensaio ecotoxicológico onde foram contaminados com uma concentração de $2,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ de BPA.

4.2 Materiais Utilizados

As fases de otimização, extração e aplicação do método dos desreguladores endócrinos estudados foram realizadas no laboratório do Grupo de Estudos Ambientais (GEA) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA) em parceria com o Laboratório de Herpetologia e Ecologia Aplicada à Conservação da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), que cedeu os girinos utilizados na pesquisa.

Os padrões 17α -etinilestradiol (EE2) e Bisfenol-A (BPA) foram cedidos pelo Laboratório de Química Analítica do grupo GEA do IFMA. O padrão do EE2 marca Aldrich® com 98% de pureza e o BPA era da marca LiChrosolv® Merck na forma de solução na concentração de 1mg L^{-1} .

Os solventes utilizados nas análises foram de grau cromatográfico onde a Acetonitrila (ACN), o N-hexano (HEX) e o Metanol (MeOH) todos da marca LiChrosolv® Merck. A água deionizada utilizada foi obtida pelo sistema Milli-Q® da Millipore.

Deve-se ressaltar que todas as vidrarias utilizadas para manuseio dos padrões, reagentes, solventes e soluções foram previamente lavadas com solução

de Extran[®] alcalino 5% e depois enxaguados com água potável, água destilada e ambientados com o solvente apropriado.

O sistema cromatográfico de CL usado era pertencente à marca Shimadzu[®] LC 20AT Prominence, do modelo DGU-20A com duas bombas de alta pressão acopladas a um detector de FL modelo RF-10AXL também da Shimadzu[®], e injetor com capacidade de 20 µL. Para o controle do equipamento e obtenção dos dados fez-se uso de um microcomputador e do programa LCsolution[®].

4.3 Preparo da amostra

Utilizou-se os tecidos de cerca de 6 animais adultos da espécie *Rhinella Marina* que para preparação da amostra foram macerados, separados em alíquotas de 5 gramas e então congelados.

4.4 Testes de Otimização de Condições Cromatográficas

Inicialmente, desenvolveu-se um método buscando-se otimizar as condições cromatográficas (fase móvel, comprimento de onda (emissão e excitação), fluxo, resolução dos picos cromatográficos) assim como a elaboração dos gráficos analíticos preliminares, onde, foi utilizada uma coluna modelo Luna C₁₈ da marca Phelomenex[®] com 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno, preenchida com C₁₈ quimicamente ligado a sílica com partículas de 5µm. Coluna de guarda C₁₈ com o comprimento de 5 cm, K50-4282 da marca Phelomenex[®].

O aplicativo Microsoft Excel[®] 2010 foi utilizado para a construção das curvas analíticas, cálculos da equação da reta e R².

4.5 Teste de Otimização de Extração Realizados

Para a realização dos processos de recuperação foram adicionados 0,5 mg.L⁻¹ de BPA e EE2 em 5g de amostra anteriormente macerada (fortificação da amostra). Em seguida, acrescentou-se às amostras cerca de 1 gramas de celite para

auxiliar no processo de adsorção, e remoção de possíveis interferentes que não interessam para esta análise, fazendo a homogeneização adequada da porção.

Os métodos utilizados basearam-se em alguns procedimentos proposto por alguns autores com modificações, com o uso de diferentes solventes e técnicas, a fim de adequar as características complexas da matriz em estudo.

Realizou-se quatro procedimentos de extração, designados de T₁, T₂, T₃ e T₄. No procedimento T₁ a amostra foi fortificada somente com BPA e os procedimentos T₂, T₃ e T₄ foram utilizados o BPA e o EE2.

Na tabela 4, observam-se os procedimentos dos ensaios de extração realizados que serão discutidos nos resultados.

Tabela 4. Procedimentos dos ensaios de extração realizados

ETAPAS	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
Extração em Dispersão em fase sólida	Eluição com 5x5 mL de ACN; Filtração com lã de vidro e Celite 545	Eluição com 9x5 mL de ACN; Filtração com lã de vidro e Celite 545	Eluição com 5x5 mL MOH; Filtração com lã de vidro e Celite 545	Eluição com 5x5 mL HEX; Filtração com lã de vidro e Celite 545
Secagem	Rotaevaporação a 70°C	Rotaevaporação a 70°C	NR	
Restituição 1 da amostra	2 mL de ACN	4 mL de MeOH	NR	
Extração Líquido-líquido	NR	5x1,5 mL (7,5 mL) de HEX	5x10 mL (50 mL) de HEX	5x10 mL (50 mL) de ACN
Secagem	NR	Rotaevaporação a 70°C		
Restituição 2 da amostra	NR	2 mL de MeOH	2 mL de ACN	2 mL de ACN
Análise cromatográfica	Injeção de 20 µL; Fase Móvel ACN/Água (50/50, v/v); λ_{ex} : 230 nm; λ_{em} : 320 nm			

NR: Procedimento não realizado

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Ensaios Ecotoxicológicos com Bisfenol A e 17 α -etinilestradiol

O direcionamento das pesquisas ainda se concentra na determinação destes compostos em diferentes matrizes ambientais, porém ensaios *in vivo* que demonstrem a potência dos desreguladores diante dos organismos, incluindo o homem, ainda não são conclusivos. No Brasil são poucos os trabalhos que têm abordado o efeito destas substâncias correlacionando quantidade encontrada no ambiente, com efeitos sob organismos nestas concentrações.

Sendo assim, este trabalho é parte de um projeto maior que visa avaliar os efeitos tóxicos causados por desreguladores endócrinos em anfíbios e detectar estes compostos no habitat natural destas espécies (poças). Um ensaio preliminar envolvendo a contaminação de girinos por hormônios sintéticos já foi realizado e obteve resultados indicando a toxicidade destes compostos mesmo em baixas concentrações (5,300 e 2,500 ng.L⁻¹) provocando deformidades e mortalidade nos animais. Ainda são necessários mais análises para investigar feminilização e possíveis alterações nos órgãos internos.

5.2 Otimização das Condições Cromatográficas para BPA e EE2

Melo (2011) desenvolveu um método para análise dos dois compostos em estudo para matrizes aquosas e estabeleceu parâmetros de análises, onde os compostos poderia ser analisados em uma mesma injeção. Este trabalho adapta as condições descritas pela autora visto que tempo de retenção encontrada pela mesma é considerado baixo para matrizes biológicas onde se há uma série de interferentes que são detectados nos primeiros minutos da corrida cromatográfica.

A fim de se obter menor tempo de análise e resolução dos picos otimizou-se as condições cromatográficas como: proporção de fase móvel, fluxo e comprimentos de onda. O trabalho objetivou o desenvolvimento de um método multirresidual, utilizando os mesmos parâmetros para o BPA e o EE2. Após testes, as melhores condições para análise dos compostos foram: fase móvel ACN/H₂O

(50/50; v/v), em modo isocrático, fluxo 1 mL.min⁻¹, λ_{ex} =230 nm e λ_{em} =320 nm, como visto na tabela 5. Estes parâmetros ofereceram cromatogramas com picos definidos e com um bom tempo de retenção visto que, em uma amostra biológica vários interferentes são visualizados no início da corrida cromatográfica, o que pode reagir e interferir na saída do composto de interesse.

Tabela 5: Condições Cromatográficas Seleccionadas.

Itens	Condições cromatográficas
Coluna	Luna C ₁₈ da marca Phenomenex® com 250 mm x 4,6 mm, preenchida com C ₁₈ quimicamente ligado a sílica com partículas de 5 µm
Pré-coluna	A coluna de guarda utilizada foi C ₁₈ de 5 cm de comprimento, K50-4282 da Phenomenex®
Eluente A	Água
Eluente B	Acetonitrila
Proporção (A:B)	50:50 (v:v)
Fluxo	1 mL min ⁻¹
Volume de injeção	20µL
Comprimentos de onda	λ_{ex} =230 nm λ_{em} =320 nm
Itens	Condições cromatográficas
Tempo de retenção do BPA	8,0 ± 0,2 minutos
Tempo de retenção do EE2	11,9± 0,2 minutos
Tempo total da análise	15 minutos

Abaixo, o cromatograma referente às injeções realizadas com padrões os de BPA e EE2 com as condições seleccionadas em sobreposição (Figuras 3).

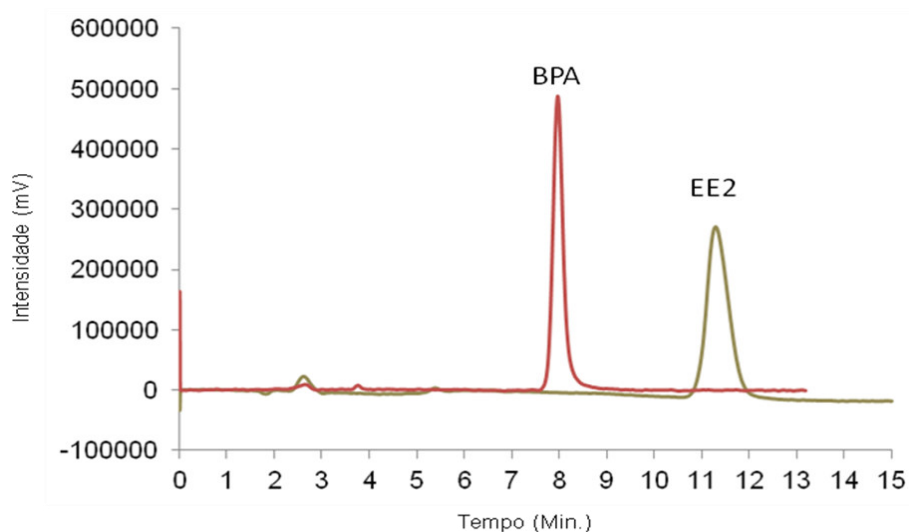


Figura 3. Cromatograma da solução-padrão Bisfenol A na concentração 1 mg.L^{-1} e EE2 em $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$. Condições cromatográficas: fase móvel ACN/H₂O (50:50, v:v), modo isocrático, fluxo 1 mL min^{-1} , $\lambda_{\text{ex}}=230 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}}=320 \text{ nm}$.

Observa-se na figura acima, que o método proposto pode ser considerado multiresidual, visto que o tempo de retenção de cada composto nas mesmas condições de análise não são os mesmos estando o BPA entre em 8,0 minutos e o EE2 com o tempo de 11,8 minutos.

5.2 CURVAS ANALÍTICAS

Segundo o Conama (2005) não há limite de quantidade máxima em águas para os dois compostos estudados na Legislação Brasileira, a linearidade foi estudada iniciando a curva próximo ao limite de detecção e abaixo do limite máximo de fenóis permitidos em águas superficiais, que é de $3 \mu\text{g L}^{-1}$. Em seguida à definição das condições cromatográficas, construiu-se curvas analíticas (Figuras 4 e 5) dos dois compostos a partir de soluções em diferentes concentrações na faixa de $0,005 - 1 \text{ mg.L}^{-1}$.

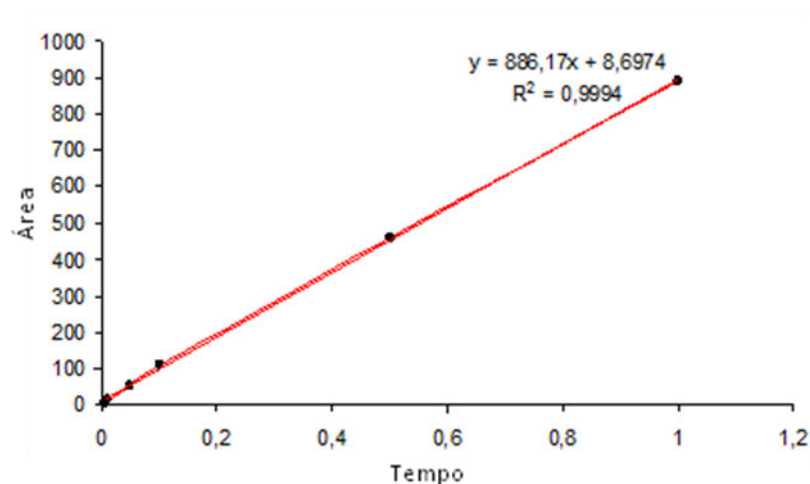


Figura 4. Curva analítica para o composto BPA. Condições cromatográficas: fase móvel ACN/H₂O (50:50, v:v), modo isocrático, fluxo 1mL min⁻¹, λ_{ex}=230 nm e λ_{em}=320 nm.

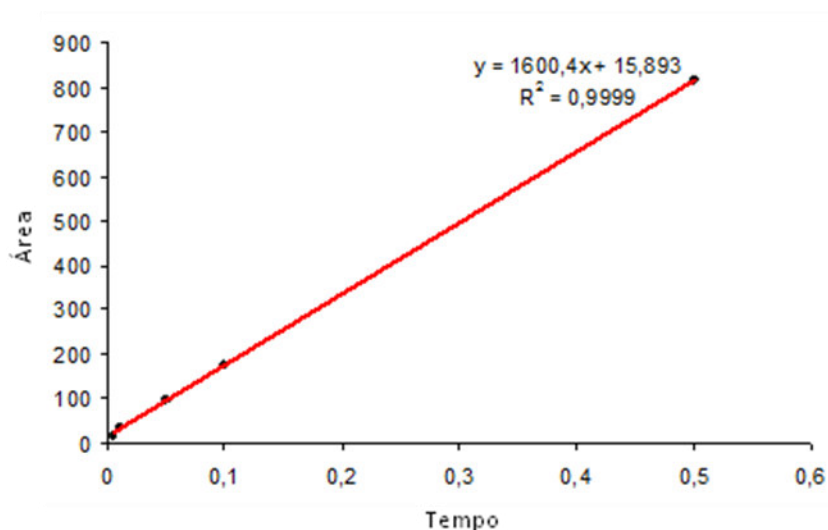


Figura 5. Curva analítica para o composto EE2. Condições cromatográficas: fase móvel ACN/H₂O (50:50, v:v), modo isocrático, fluxo 1mL min⁻¹, λ_{ex}=230 nm e λ_{em}=320 nm.

A linearidade do método, ou seja, a proporcionalidade da quantidade dos compostos foi estabelecida pelo coeficiente de correlação linear (R^2) e a sensibilidade, que é a capacidade de distinção de duas quantidades próximas das substâncias analisadas, foi definida pelo coeficiente angular proveniente da equação da reta das curvas analíticas (LANÇAS, 2009).

As curvas analíticas foram consideradas satisfatórias quanto aos R^2 , pois foram obtidos valores maiores que 0,99 para ambos os compostos. Segundo a ANVISA (2003) estes valores demonstram que a resposta do detector foi linear nos intervalos de concentração estudados, proporcionando ao método linearidade.

5.3 OTIMIZAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

Após as construções das curvas analíticas, iniciou-se os procedimentos de extração das substâncias em estudo a fim de encontrar a melhor maneira de recuperá-los da matriz analisada.

A recuperação está relacionada com a exatidão (BRITO et al, 2003), pois reflete na eficiência da metodologia analítica quanto ao processo de isolamento dos analitos da amostra (LANÇAS, 2009). Neste trabalho, fez-se uso dos procedimentos de dispersão em fase sólida para avaliar a recuperação dos analitos da amostra.

Foram realizados testes com o intuito de estabelecer os melhores parâmetros de recuperação recomendados na literatura. Segundo Ribani (2004), os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Porém, dependendo da complexidade da amostra, que é o caso deste trabalho, este valor pode estar entre 50 e 120%, com precisão de até $\pm 15\%$.

Para a realização dos processos de recuperação foram adicionados 0,5 mg L⁻¹ de BPA e EE2 em 5g de amostra anteriormente macerada (fortificação da amostra). Em seguida, acrescentou-se às amostras cerca de 1 gramas de celite para auxiliar no processo de adsorção, e remoção de possíveis interferentes que não interessam para esta análise, fazendo a homogeneização adequada da porção.

Iniciou-se então, os testes para extração dos compostos de estudo. Os métodos utilizados basearam-se em alguns procedimentos proposto por alguns autores com modificações, a fim de adequar as características complexas da matriz em estudo.

Inicialmente, a pesquisa procurou otimizar um método que fosse o mais simples e eficiente possível, sem grandes e laboriosas etapas a fim de que se obtivesse um procedimento rápido e de baixo custo.

O primeiro teste (T₁), foi considerado o mais simples de todos, pois compreendeu poucas etapas onde utilizou-se a acetonitrila (ACN) tanto para a extração como para a restituição da amostra após a evaporação. Portanto, a

recuperação encontrada foi de apenas 21% para o BPA e como já relatado anteriormente, não houve a contaminação desta amostra com o EE2.

No teste T₂ utilizou-se uma quantidade maior de solvente (ACN) na extração inicial e a amostra foi retomada com o Metanol (MeOH) afim de se verificar a melhor afinidade dos compostos com os diferentes solventes. Já neste teste, foi acrescentada uma etapa de *clean-up* realizada com uma extração líquido-líquido com o N-hexano (HEX), uma evaporação apenas do extrato de MeOH, e então, retomado com 2 mL de MeOH, que após a injeção, verificou-se baixíssima recuperação, ficando abaixo de 1% para ambos os compostos. Mesma recuperação encontrada para o teste 3 (T₃) que consistiu na extração inicial com MeOH e diretamente a extração líquido-líquido com o HEX, em seguida à evaporação do extrato, realizou-se a restituição da amostra com 2 mL de ACN.

Observou-se então, que se fazia necessário trabalhar com um solvente mais forte já na primeira extração, pois poderia ser neste ponto que os compostos não estariam sendo extraídos da amostra. Sendo assim, no quarto teste (T₄), optou-se em fazer a extração inicial com o HEX seguindo de extração líquido-líquido com ACN. Então, ambos os extratos foram evaporados e retomados com 2 mL de ACN cada, finalizando então, na injeção dos mesmos em sistema CLAE. Este teste, apresentou as melhores recuperações para ambos os compostos nas injeções do extrato de ACN (52% para BPA e 32% para EE2), portanto apenas a recuperação do BPA é aceitável para amostras biológicas segundo Ribani (2004). Na figura 6, pode-se visualizar o cromatograma da injeção do extrato do teste 4 que ofereceu melhor desempenho.

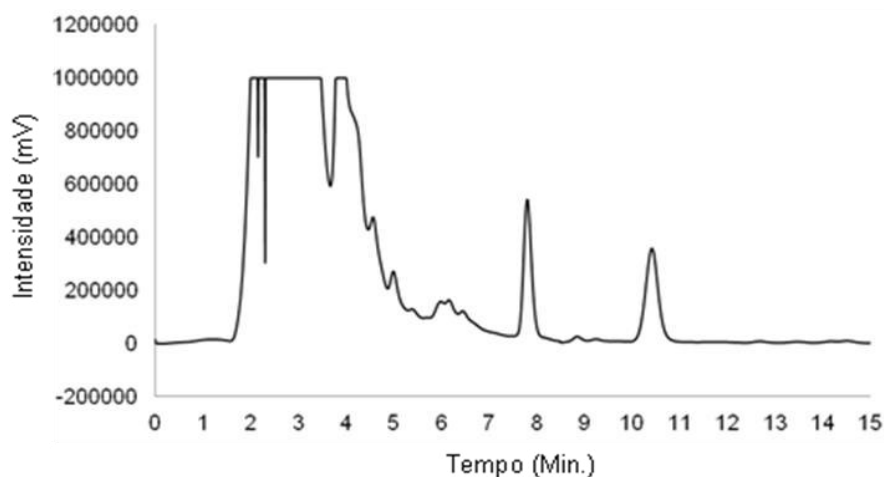


Figura 6. Cromatograma da injeção da acetonitrila do produto do Teste 4. Condições cromatográficas: fase móvel ACN/H₂O (50:50, v:v), modo isocrático, fluxo 1 mL min⁻¹, λ_{ex} =230 nm e λ_{em} =320 nm.

Na figura 7 abaixo, visualiza-se um comparativo das recuperações encontradas nos testes realizados.

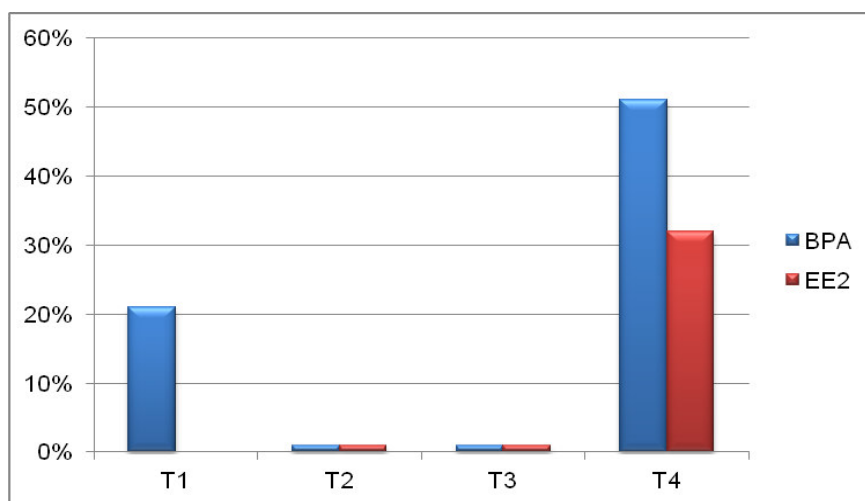


Figura 7. Comparação dos valores de recuperação entre os quatro ensaios de Extração (T₁, T₂, T₃ e T₄).

Dos quatro testes concretizados apenas o T₄ apresentou boa recuperação para um dos compostos que foi o Bisfenol A. Em função dos demais ensaios apresentarem percentuais de recuperação baixos, este trabalho passou então para a etapa de análise da amostra real oriunda dos testes ecotoxicológicos realizados por Magalhães (2012) onde os animais foram contaminados apenas com o BPA.

5.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO EM AMOSTRAS REAIS

Magalhães (2011) realizou ensaios ecotoxicológicos utilizando girinos da espécie *Physalaemus cuvieri*, empregando o BPA como contaminante. O trabalho evidencia que a presença do composto influencia significativamente na sobrevivência até a metamorfose e na biomassa produzida de *P. cuvieri*.

Indivíduos resultantes desses testes foram cedidos ao trabalho para que fossem analisados, onde, os animais utilizados foram contaminados com uma concentração de $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de BPA. As amostras foram então para tratamento de extração descritos no teste 4 e posteriormente injetadas em sistema cromatográfico. A injeção do extrato da amostra real pode ser vista na figura a seguir.

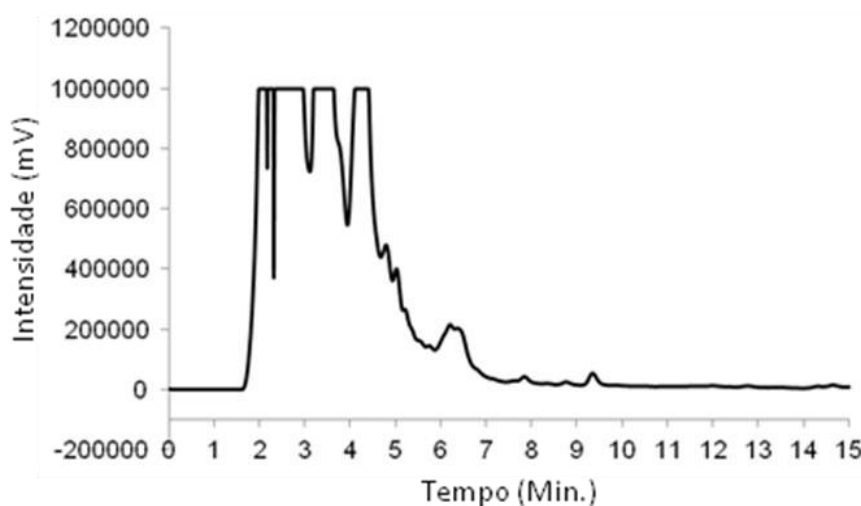


Figura 8. Cromatograma da injeção da amostra real. Condições cromatográficas: fase móvel ACN/H₂O (50:50, v:v), modo isocrático, fluxo 1mL min^{-1} , $\lambda_{\text{ex}}=230\text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}}=320\text{ nm}$.

Após as injeções cromatográficas, conclui-se que os indivíduos não apresentaram quantidades identificáveis de BPA em seus organismos. Diversas hipóteses explicam essa ausência do composto nas amostras analisadas. Segundo Raloff (1996) o tempo de meia vida do BPA no organismo é de apenas 6 horas, e em solução pode ficar até 180 dias. O que pode explicar o resultado das análises, visto que houve um longo tempo de espera para as análises (cerca de 8 meses). Isso ocasionaria na transformação do BPA em seus compostos de degradação que segundo Kolsek et al. (2012) são denominados 3-hydroxy-bisphenol-A (3-OH-BPA) e

bisfenol A-3,4-quinone (BPAQ). A presença destes compostos nas amostras não seria identificada no estudo porque o método proposto não analisou os mesmos. Como já citado, o tempo de meia vida do composto no organismo não passa de poucas horas, visto que logo é excretado, principalmente quando se trata de animais como os sapos que possuem grande capacidade de excreção. Acredita-se também que, a quantidade que possivelmente seria encontrada nestas porções estaria abaixo do limite de detecção e quantificação do método proposto, o que impediria o seu aparecimento nas análises. Além de tudo isso, supõe-se também que ao entrar no organismo dos animais, o BPA pode ter sofrido reações diversas com substâncias naturais do sistema e se transformado em novas substâncias que não seriam identificadas.

6 CONCLUSÃO

Dos testes realizados no trabalho, o T₄ que utiliza o N-hexano como solvente extrator e em seguida, um processo de extração líquido-líquido com Acetonitrila foi o que gerou melhores resultados com relação à presença do BPA pois ofereceu melhor recuperação (52%). Os testes T₁, T₂ e T₃ tiveram recuperações bem abaixo do indicado para amostras biológicas (<1%), mesmo considerando a complexidade da amostra. Nenhum procedimento adotado revelou boa recuperação para o EE2.

Das hipóteses discutidas para os resultados da análise da amostra real, discute-se para que seja realizada uma análise confiável e estabelecer melhores discussões, é preciso que a amostra seja analisada poucas horas após a exposição dos anfíbios aos compostos para que seja possível identificar a presença dos analitos, além disso, deve-se levar em consideração a excreção dos animais assim como os compostos de degradação dos DEs estudados.

REFERÊNCIAS

ADACHI, T.; YASUDA, K.; MOKI, C; YOSHINAGA, M; AOKI, N; TSUJIMOTO, G. Food Chem. Toxicol. Vol. 43, p. 713-719, 2005.

ANGUS, R. A., STANKO, J., JENKINS, R. L., WATSON, R. D. Effects of 17 α -ethynylestradiol on sexual development of male western mosquitofish (*Gambusia affinis*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C 140, 330 – 339, 2005.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE, nº 899, 2003.

ARAÚJO, J. C. **Estudo de eficiência do tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara-SP na remoção de hormônio sexuais**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Carlos, 2006.

BAKER, V. A. “Endocrine Disrupters - Testing Strategies to Assess Human Hazard”, *Toxicology in Vitro*, v. 15, pp. 413–419, 2001.

BHATT, R. V. Environmental influence on reproductive health. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, v.70, p.69-75, 2000.

BIRKETT, J. W; LESTER, J. N. Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes. Boca Raton, Florida, USA: IWA Publishing and Lewis Publishers, 2003.

BLAUSTEIN, A. R; WAKE, D. B; SOUSA, W. P. Amphibian Declines: Judging Stability, Persistence, and Susceptibility os Populations to Local and Global Extinctions. *Conservation Biology*. v. 8, p. 60-71. **1994**.

BLAUSTEIN, A.R., JOHNSON, P.T. The complexity of deformed amphibians. **Frontiers in Ecology and the Environment** 1, 87–94, 2003.

BLOOM, M. S.; KIM, D.; VOM. S., FREDERICK S. ; TAYLOR, J. A.; CHENG, G.; LAMB, J. D.; FUJIMOTO, V.Y. **Fertility and Sterility**, 2011, Vol.96(3), pp.672-677.e2

BRITO, N.M; AMARANTE JUNIOR, O.P; POLESE, L; RIBEIRO, M, L. Pesticida Revista Ecotoxicol. E Meio Ambiente, Vol. 13, 129-146, 2003.

CAJTHAML, T., KRĚSINOVÁ, Z., SVOBODOVÁ, K., MÖDER, M. Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. **Chemosphere**, v. 75, p. 745–750, 2009.

CANESI, L.; BETTI, M.; LORUSSO, L.; CECILIA; CIACCI, C.; GALLO, G. ‘In vivo’ effects of Bisphenol A in *Mytilus* hemocytes: modulation of kinase-mediated signalling pathways *Aquatic Toxicology*, Vol.71(1), pp.73-84, 2005

CANTONWINE, D.; MEEKER, J. D.; HU, H. , SÁNCHEZ, B. N.; LAMADRID-FIGUEROA, H.; MERCADO-GARCÍA, A.; FORTENBERRY, G. Z.; CALAFAT, A. M.; and TÉLLEZ-ROJO, M. M. Bisphenol a exposure in Mexico City and risk of prematurity: a pilot nested case control study. *Environmental Health*, v. 9, n. 1, p. 62, 2011.

CARLSSON, C.; JOHANSSON, A.-K.; ALVAN, G.; BERGMAN, K.; KU, T. H. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Science of the Total Environment*, v. 364, p. 67-87, 2006.

CARLSSON, C.; JOHANSSON, A.-K.; ALVAN, G.; BERGMAN, K.; KU, T. H. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Science of the Total Environment*, v. 364, p. 67-87, 2006.

CASTRO, C. M. B. de. Perturbadores endócrinos ambiental: uma questão a ser discutida. *Rev. Bras. de Eng. Sanit. e Amb.*, v. 7, p. 4-5, 2002.

Manual de Produtos Perigosos: ficha de informação de produto químico. Disponível em: www.cetesb.sp.gov.br/produtos/ficha_completa.asp?consulta=BIF.. Acesso em 26 de janeiro de 2005.

CHUNG, E.; GENCO, M. C.; MEGRELIS, L.; RUDERMAN, J. V. Effects of bisphenol A and triclocarban on brain-specific expression of aromatase in early zebrafish embryos. *PNAS*, vol.108, n. 43, 2011.

COLBORN, T. et al. O Futuro Roubado. Prefácio de José A. Lutzenberg Porto Alegre: L&PM, 354 f. 2002.

COLBORN, T.; von Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrine-disrupting Chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 1993; 101:378-384.

CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE – CONAMA. 2005. Resolução Conama n. 357. Disponível em:<www.mma.conama.gov.br/conama> Acesso em 10 de setembro de 2012.

DIRTU, A. C.; ROOSENS, L., GEENS, I.; GHEORGHE, A.; NEELS, H. and COVACI, A. Simultaneous determination of bisphenol A, triclosan, and tetrabromobisphenol A in human serum using solid-phase extraction and gas chromatography-electron capture negative-ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 391, n. 4, p.1175-1181, 2008.

FENG, X., DING, S., TU, J., WU, F., DENG, N. “Degradation of Estrone in Aqueous Solution by Photo-Fenton System”, *Science of the Total Environment*, v. 345, pp. 229–237, 2005.

FERREIRA, M. G. M. Remoção Da Atividade Estrogênica De 17β -Estradiol E De 17α - Ethinilestradiol Pelos Processos De Ozonização E O_3/H_2O_2 . Tese de Doutorado. Rio de Janeiro, 2008.

FERRER, E.; SANTONI, E., VITTOR, S.; FONT, G.; MANES, J.; SAGRATINI, G. Simultaneous determination of bisphenol A, octylphenol, and nonylphenol by pressurised liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry in powdered milk and infant formulas. *Food Chemistry* 126 (2011) 360–367, 2011.

GHISELLI, G. Avaliação das Águas Destinadas ao Abastecimento Público na região de Campinas: Ocorrência e Determinação de Interferentes Endócrinos (IE) e Produtos Farmacêuticos e de Higiene Pessoal (PFHP). Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. 2006.

_____, JARDIM, W.F. Interferentes Endócrinos no Ambiente. *Química Nova*, Campinas, Vol. 30, nº 3, p. 695-706, fev. 2007.

GOLOUBKOVA T.; SPRITZER P. M.; *Arq. Bras. Endocrinol Metab.*, 44, 4, 2000.

GOMES R. L; SCRIMSHAW, M. D; LESTER, J. N. Determination os Endocrine Disrupters in sewage treatment and Receiving Waters. *Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 22, n.10, 697-707, 2003.

GRAY, T.P.R.; JOBLING, S.; MORRIS, S.; KELLY, C.; KIRBY, S.; JANBAKHSH, A.; HARRIES, J. E.; WALDOCK, M. J.; SUMPTER, J. P., TYLER, C. R.; *Environmental Science & Technology*, v. 34, p. 1521 – 1528, 2000.

GUIMARÃES, J. R. P. F. Disruptores endócrinos no meio ambiente: um problema de saúde pública e ocupacional. Disponível em: <http://www.acpo.org.br/int_hormonais.htm>. Acesso em: 01 de out. 2008.

HEIMEIER, R. A.; Shi, Y.; Amphibian metamorphosis as a model for studying endocrine disruption on vertebrate development: Effect of bisphenol A on thyroid hormone action. *General and Comparative Endocrinology*, 2010.

HINFRAY, N. ; PALLUEL, O. ; PICCINI, B. ; SANCHEZ, W. ; AÏT-AÏSSA, S. ; NOURY, P.; Endocrine disruption in wild populations of chub (*Leuciscus cephalus*) in contaminated French streams. *Science of the Total Environment*, 2010, Vol.408(9), pp.2146-2154.

HIRSOVA, P.; KOLOUCHOVA, G.; DOLEZELOVA, E. CERMANOVA, J.; HYSPLER, R.; KADOVA, Z.; MICUDA, S. Epigallocatechin gallate enhances biliary cholesterol secretion in healthy rats and lowers plasma and liver cholesterol in ethinylestradiol-treated rats. *European Journal of Pharmacology*, 2012.

IKEZUKI, Y., TSUTSUMI, O., TAKAI, Y., KAMEI, Y. and TAKETANI, Y. Determination of bisphenol-A concentrations in human biological fluids reveals

significant early prenatal exposure. **Human Reproduction** Vol.17, No.11 pp. 2839–2841, 2002.

JENNY, L. C., HENRY T. L, LAURA S. BASSETT D. A.; DRISCOLL, D. A.; CATERINA, Y.; JENNIFER Y. C.; XIAOYUN, Y.; CALAFAT, A. M.; e MICHELS, K. B. Use of Polycarbonate Bottles and Urinary Bisphenol A Concentrations. *Environmental Health Perspectives*, 2009.

JIMÉNEZ-DÍAZ, I.; VELASORIA, F.; ZAFRAGÓMEZ, A.; NAVALÓN, A.; BALLESTEROS, O.; NAVEA, N.; FERNÁNDEZ, M.F.; OLEA, N.; VÍLCHEZ J.L. A new liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of parabens in human placental tissue samples. *Talanta*, v.84 p. 702–709, 2011.

JUNKO S.; KATSUHIRO, T.; JIN, Y. Sensitive method for determination of Bisphenol-A in serum using two systems of high-performance liquid chromatography. *Jornal of Cromatografy*, v.736, p. 255-261. 24 dez. 1999.

KIDD, K. A; BLANCHFIELD, P. J; MILLS, K. H.; PALACE, V. P.; EVANS, R. E., LAZORCHAK, J. M.; FLICK, R. W. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *PNAS*, May 22, vol. 104, no. 21, 8897–8901, 2007.

KODAIRA, T.; KATO, I; LI, J.; MOCHIZUKI, T.; HOSHINO, M.; USUKI, Y.; OGURI, H.; YANAIHARA, N. Novel ELISA for the Measurement of Immunoreactive Bisphenol A. *Biomed Res.* vol.21, n.2, page.117-12, 2000.

KOLSEK, K.; MAVRI, J. DOLENC, M. S.; Reactiving of bisphenol A-3,4, quinine with DNA. A quantum chemical study. *Toxicology in Vitro.* Vol. 26, p. 102-106, 2012.

KOZLÍK, P.; BOSÁKOVÁ, Z.; TESAROVÁ, E.; COUFAL, P.; CABALA, R.; Development of a solidphase extraction with capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of estrogens in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p.2127–2132, 2011.

KUO, H. W.; DIN, W. P.; *Jornal of Chromatografic. A.*, Vol. 1027, p. 67, 2004.

LAI, K. M., JOHNSON, K. L., SCRIMSHAW, M. D., LESTER, J. N. “Binding of Waterborne Steroid Estrogens to Solid Phases in River and Estuarine Systems”, *Environment Science Technology*, v. 34, pp. 3890-3894, 2000.

LANÇAS, F. M. *Extração em Fase Sólida (EFS)*. São Carlos, SP. Rima, 2004.

LANÇAS, F. M. *Cromatografia Líquida Moderna (HPLC/CLAE)*. Campinas, SP. Átomo, 2009.

LIBARDI JUNIOR, N.; *Estudo De Lacases Fúngicas Para Degradação De Compostos Interferentes Endócrinos*. Dissertação de Mestrado. Programa de Mestrado em Engenharia de Processos da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, 2010.

LIU, B., LIU, X. "Direct Photolysis of Estrogens in Aqueous Solutions", *Science of the Total Environment*, v. 320, pp. 269-274, 2004.

LUTZENBERG, J. *Fim do Futuro: manifesto Ecológico Brasileiro*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.

MACKEY, M.J., BOONE, M.,. Single and interactive effects of malathion, overwintered green frog tadpoles, and cyanobacteria on gray treefrog tadpoles. *Environmental Toxicology & Chemistry* 28, 637–643, 2009.

MAGALHÃES, A. N., Efeitos do Bisfenol A sobre girinos de *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leiuperidae) em Ambientes Temporários e Permanentes. Dissertação de Mestrado. Programa de Mestrado em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão, 2012.

MANAHAN, S.E.; *Toxicological Chemistry and Biochemistry*, 3rd ed., Lewis Publishers: Boca Raton, 2003.

MEI, S.; WU, Da., JIANG, M.; LU, Bin.; LIM, J.; ZHOU, Yi-Kai.; LEE, Y. Determination of trace bisphenol A in complex samples using selective molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with capillary electrophoresis. *Microchemical Journal*, v. 98, p. 150–155, 2011.

MELO, S. M. Desreguladores Endócrinos no Ambiente: Determinação de Bisfenol-A e 17 α etinilestradiol em águas por CLAE-Fluorescência. Dissertação de Mestrado. Programa de Mestrado em Biodiversidade e Conservação da Universidade Federal do Maranhão, 2011.

MEYER, A. et al. Estarão alguns grupos populacionais brasileiros sujeitos à ação de disruptores endócrinos?. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro: v.15, n.4, p. 845-850, out-dez, 1999.

Nicolas J. CABATON, Perinaaz R. Wadia, Beverly S. Rubin, Daniel Zalko, Cheryl M. Schaeberle, Michael H. Askenase, Jennifer L. Gadbois, Andrew P. Tharp, Gregory S. Whitt, Carlos Sonnenschein, and Ana M. Soto.

NOGUEIRA, J. M. F. "Desreguladores Endócrinos: Efeitos Adversos e Estratégias para Monitoração dos Sistemas Aquáticos", *Química*, v. 88, pp. 65-71, 2003.

NOGUEIRA, J. M. F. "Desreguladores Endócrinos: Efeitos Adversos e Estratégias para Monitoração dos Sistemas Aquáticos", *Química*, v. 88, pp. 65-71, **2003**.

OLIVA, A; GIAMI, A; MULTIGNELL, L. Environmental Agents and Erectile Dysfunction: A Study in a Consulting Population. *Journal of Andrology*, Vol 23, 2002.

PURDOM C, E; HARDIMAN P, A; BYE V. V. J; ENO, N. C; TYLER, C. R; SUMPTER, J.P. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem Ecol* 1994; 8:275-285.

RALOFF, J. 1996. Estrogenic agents leach from dental sealant. Science News 149(April 6):214. Available at www.sciencenews.org/pages/pdfs/data/1996/149-14/14914-08.pdf.

REIS FILHO, R. W; LUVISOTTO-SANTOS. R; VIEIRA, E.M. Poluentes emergentes como desreguladores endócrinos. J Braz Soc Ecotoxicol. 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C.I H. e JARDIM, I. C. S. F.; Validação Em Métodos Cromatográficos E Eletroforéticos. Quim. Nova, Vol. 27, No. 5, 771-780, 2004.

RODRIGUES, A. S.; ARAÚJO, E. S.; CICCOTTI, L.; SOUZA, L. G. B.; GRILLO, R.; LEITE, S. F. H. Poluentes e fontes: orgânicos. Instituto de química- USP, 2007.

ROUTLEDGE, E. J. Identifying the causative agents: The use of combined chemical and biological strategies in monitoring programs. Pure Appl. Chem., Vol. 75, Nos. 11–12, pp. 2461–2466, 2003.

SAARIST, M; CRAFT, J. A; LEHTONEN, K. K; LINDSTRÖM, K. An endocrine disrupting chemical changes courtship and parental care in the sand goby. Aquatic Toxicology 97, 285–292, 2010.

SIMMONDS, R. J. Chemistry of biomolecules: an introduction, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1992.

SNYDER, S. A.; KEITH, T. L.; VERBRUGGE, D. A.; SNYDER, E. A.; GROSS, T. S.; KANNAN, K.; GIESY, J. P.; *Environ. Sci. Technol.*, 33, 2814, 1999.

STAPLES, C. A., DORN, P. B., KLECKA, G. M., O'BLOCK, S.T., HARRIS, L. R. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. **Chemosphere**, v. 36, p. 2149–2173, 1998.

SUSIARJO M.; HUNT P. Bisphenol A exposure disrupts egg development in the mouse. **Fertility and Sterility** 89, 1, 2008.

TETSUYA, A.; YASUDA, K.; MORI, C., YOSHINAGA, M., AOKI ,N., TSUDA, K.; Promoting insulin secretion in pancreatic islets by means of Bisphenol A and nonylphenol via intracellular estrogen receptors. Food and Chemical Toxicology. Volume 43, Issue 5, May 2005.

VELASCO-SANTAMARÍA, Y; MADSEN, S; BJERREGAARD, P; KORSGAARD, B. Effects of 17 β -trenbolone in male eelpout *Zoarces viviparus* exposed to ethinylestradiol. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010.

VEIGA, S.P; SANTOS, L; SLEIMAN, H; OLIVEIRA, A.K.M; OLIVEIRA, C.A; ROMANO, R, M; ROMANO, M.A. Efeitos in vivo de resina dental à base de

dimetacrilato glicerolato (BISGMA) na puberdade de ratos Wistar. *Revista Brasileira de Toxicologia*. Vol. 23, 2010.

VIÑAS, P.; CAMPILLO, N.; MARTÍNEZ-CASTILLO, N.; and HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Comparison of two derivatization-based methods for solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometric determination of bisphenol A, bisphenol S and biphenol migrated from food cans, *Anal Bioanal Chem* (2010) 397:115–125, 2010.

WATABE, Y. Determination of Bifenol-A in a Environmental Water at ultra-low Level by Hight Performance Líquid Chromatografic with effect on line. *J. Chromatografic A*. Vol. 1032, p. 45-49, 2004.

WANG, S.; LI, Y.; WU, X.; DING, M.; YUAN, L., WANG, R.; Wen, T.; ZHANG, J.; CHEN, L.; ZHOU, X.; LI, F. Construction of uniformly sized pseudo template imprinted polymers coupled with HPLC–UV for the selective extraction and determination of trace estrogens in chicken tissue samples. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, p.1513–1519, 2011.

WILKINSON, C.F; LAMB, J.C. The Potential Health Effects of Phthalate Esters in Children's Toys: A Review and Risk Assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Volume 30, Number 2, 1999.

YANG, S. H.; MORGAN, A. A.; NGUYEN, H. P.; MOORE, H.; FIGARD, B. J.; SCHUG, K. A. Quantitative Determination Of Bisphenol A From Human Saliva Using Bulk Derivatization And Trap-And-Elute Liquid Chromatography Coupled To Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Vol. 30, No. 6, pp. 1243–1251, 2011.

YE, X.; YE, X.; NEEDHAM, Z. L.; CALAFAT, A. M. In-vitro oxidation of bisphenol A: Is bisphenol A catechol a suitable biomarker for human exposure to bisphenol A? *Anal Bioanal Chem*. Springer-Verlag (Outside the USA)