

# Validação de método usando extração em fase sólida e CLAE - UV para determinação de fitoestrógenos (genisteína e daidzeína) em água superficial.

Guilherme Julião Zocolo\* (PG), Mary Rosa R. de Marchi. gjzocolo@yahoo.com.br

Instituto de Química da UNESP-Araraquara.

Palavras Chave: Validação, fitoestrógenos, água superficial.

## Introdução

Fitoestrógenos são agentes estrogênicos de origem natural e são encontrados em diversos tipos de plantas principalmente na soja; esses compostos têm ação biológica similar aos estrógenos naturais e sintéticos. Sendo o Brasil o segundo maior produtor de soja do mundo e possuindo vastas áreas de plantação próximas as principais bacias hidrográficas. O objetivo do trabalho foi de desenvolver um método por CLAE-UV usando extração em fase sólida (EFS) para simultânea identificação de genisteína e daidzeína, principais fitoestrógenos da soja, em água superficial.

## Experimental

A resposta do sistema analítico foi avaliada pelo uso de soluções padrão, em metanol, contendo genisteína e daidzeína (Sigma-Aldrich, 98% pureza) em concentrações entre 0,02 a 20,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As condições cromatográficas otimizadas para o sistema CLAE/UV, Varian 920 LC, incluíram: coluna RP-18 (5  $\mu\text{m}$ , 150 x 4,6 mm); volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ ; detecção em dois canais de 249 e 260 nm; eluição em gradiente com ACN/H<sub>2</sub>O com 0,1% de ácido acético seguindo a programação 10 a 65% de ACN até 10 min, 65% a 100% ACN em 5 min. Vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>.

O preparo da amostra para análise incluiu SPE em cartucho polimérico (Strata-X, Phenomenex, 200mg/6mL), pré-condicionado com 3 mL de metanol e 3mL de água milli-Q. 1 L da amostra (testemunha-água sem fortificação; água de rio fortificada e branco de laboratório-água de torneira) previamente acidulada com ácido acético (2% do volume total da amostra), foi passado pelo cartucho condicionado. A seguir, o cartucho foi lavado com 3 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O (5:95, v/v). Os analitos de interesse foram eluídos com 6 mL de ACN/MeOH (50:50, v/v), o eluato foi seco sob fluxo de N<sub>2</sub> e o resíduo re-solubilizado em 350  $\mu\text{L}$  de metanol e submetido a análise por CLAE-UV, nas condições otimizadas.

Na avaliação do desempenho do método (validação) empregaram-se amostras de água de rio (entrada da ETA-Araraquara) fortificadas com os analitos em 3 níveis de concentração: 17,5; 35,0 e 350  $\text{ng L}^{-1}$ . A fortificação foi efetuada sobre as amostras sem nenhum tratamento prévio, deixando-se em repouso

ao abrigo da luz e sob refrigeração por 6 horas, antes do processamento e análise. Todas as análises foram efetuadas em triplicata.

## Resultados e discussão

O sistema analítico apresentou resposta linear em todo o intervalo estudado (0,02-20,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), os parâmetros da equação de reta e os limites calculados a partir dela estão na Tabela 1. Estes valores são concordantes com trabalhos da literatura com o mesmo tipo de sistema cromatográfico.

Tabela 1: Resposta do sistema analítico (CLAE/UV).

	$t_r$	Equação da reta ( $R^2$ )	LD <sub>eq</sub>	LQ <sub>eq</sub>
Daidzeína	9,19	$y = 142,63x - 1,979$ (0,9999)	0,01	0,02
Genisteína	10,51	$y = 134,62x - 4,5183$ (1,0000)	0,01	0,02

LD= limite de detecção do equipamento e LQ= limite de quantificação do equipamento em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $t_r$  em minutos.

O método analítico otimizado apresentou seletividade, exatidão (recuperação > 82%) e precisão (CV < 10%), para concentrações da ordem de ng/L dos analitos em água de rio (Tabela 2), também em concordância com dados da literatura para estas moléculas.

Tabela 2: Recuperação obtida a partir da análise de água de rio fortificada com os analitos (n=3)

	Nível de fortificação ( $\text{ng L}^{-1}$ )		
	17,5	35,0	350
% Recuperação (CV,%)			
Daidzeína	98 (2)	95 (10)	106 (2)
Genisteína	82 (3)	89 (5)	99 (1)

## Conclusões

O método apresentou seletividade, precisão, exatidão e rapidez adequadas ao estudo da ocorrência de fitoestrógenos de soja em água superficial, de acordo com os objetivos do projeto Fapesp em andamento. O método destaca-se também por alcançar níveis de detectabilidade melhores aos encontrados na literatura<sup>1</sup>.

## Agradecimentos

FAPESP. Proc. 06/51145-5, CNPq Proc. 470923/2006-7, FATE

<sup>1</sup> LIGGINS J, BLUCK LJ, COWARD WA, BINGHAM SA. Extraction and quantification of daidzein and genistein in food. *Anal Biochem.* 1998, 264:1-7.