



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Tecnologia e Ciências
Faculdade de Engenharia


Marcio de Miranda Oliveira

**Monitoramento de desreguladores endócrinos no rio Arroio Fundo
na bacia de Jacarepaguá, RJ.**

Rio de Janeiro
2015

Marcio de Miranda Oliveira

**Monitoramento de desreguladores endócrinos no rio Arroio Fundo na bacia de
Jacarepaguá, RJ.**



Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Área de concentração: Saneamento Ambiental - Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Daniele Maia Bila

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Monteiro Martins

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/B

O48 Oliveira, Marcio de Miranda.
Monitoramento de desreguladores endócrinos no rio Arroio Fundo na bacia de Jacarepaguá, RJ / Marcio de Miranda Oliveira. - 2015.
121 f.

Orientador: Daniele Maia Bila.
Coorientador: Eduardo Monteiro Martins.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia.

1. Engenharia Ambiental. 2. Desreguladores endócrinos – Dissertações. 3. Poluição -- Rio de Janeiro (Estado) - Dissertações. I. Bila, Daniele Maia. II. Martins, Eduardo Monteiro. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. VI. Título.

CDU 62:502.3

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Marcio de Miranda Oliveira

Monitoramento de desreguladores endócrinos no rio Arroio Fundo na bacia de Jacarepaguá, RJ.

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Área de concentração: Saneamento Ambiental - Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Aprovado em 15 de abril de 2015.

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^aDaniele Maia Bila (Orientador)
Faculdade de Engenharia UERJ

Prof. Dr. Eduardo Monteiro Martins (Coorientador)
Faculdade de Engenharia UERJ

Prof. Dr. Alexsandro Araújo da Silva
Instituto de Química UERJ

Dr^a. Simone Carvalho Chiapetta
INT/MCTI

Dr. Glauco Favilla Bauerfeldt
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus e a Nossa Senhora da Penha por ter me permitido mais esta realização, a minha esposa pelo incentivo e apoio, a meus pais e irmão por todo o incentivo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e Nossa Senhora da Penha por ter me fornecido sabedoria para cumprir com mais esta etapa do meu desenvolvimento. Agradeço a eles também por ter me guiado durante todo curso com dedicação e serenidade.

A minha esposa, pais e irmão por toda força, ajuda, amor incondicional e compreensão durante os momentos de ausência.

A minha orientadora Daniele Bila e coorientador Eduardo Martins, além dos demais companheiros e amigos do LES, que foram fundamentais nesta realização.

A Maíra Fasciotti e a equipe da divisão de química do INMETRO que auxiliaram na elaboração e execução dos experimentos.

Aos meus companheiros de Waters Technologies em especial ao Marcio Áthila, Robinson Giraldes, Davidson Oliveira, Fábio Oliveira, Jane Finzi e Mirela Talarico que auxiliaram com suporte e apoio durante as dificuldades técnicas encontradas.

Ao André Leone, e sua equipe do INEA que viabilizaram as coletas das amostras analíticas e informações sobre características do local de amostragem.

Ao professor Geraldo Lippel por suas sábias palavras.

A Simone Chiapetta pelo incentivo e apoio durante todo curso.

A todos os amigos que de alguma forma participaram desta realização e que eventualmente eu tenha esquecido de citar, mas que não estão esquecidos no meu sincero apreço e gratidão.

O sucesso é ir de fracasso em fracasso
sem perder o entusiasmo.

Winston Churchill

RESUMO

OLIVEIRA, Marcio de Miranda. *Monitoramento de desreguladores endócrinos no rio Arroio Fundo na bacia de Jacarepaguá, RJ*. 2015. 121f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Os desreguladores endócrinos são compostos micropoluentes de ação deletéria que causam efeitos aos animais e aos seres humanos. Estes vêm trazendo a várias décadas, problemas relacionados à má formação ou ainda infertilidade de várias espécies. A presença destes compostos na ordem de ng L^{-1} já é capaz de gerar efeitos nocivos ao sistema endócrino. Este trabalho visou à determinação da presença e quantidade de alguns destes compostos como 17α -etinilestradiol, bisfenol A e estrona entre outros, nas águas do rio Arroio Fundo, localizado em Jacarepaguá no RJ que possui um índice de qualidade de água ruim. A primeira etapa deste trabalho foi a implementação e validação de metodologia para determinação do 17α -etinilestradiol por cromatografia líquida acoplada a detector de fluorescência onde foram estabelecido limite de detecção, de quantificação e linearidade conforme orientação do Inmetro (2010). Além da avaliação das amostras ambientais através da metodologia estabelecida. Na etapa subsequente foram realizados os experimentos relativos à determinação dos desreguladores endócrinos através da espectrometria de massas por detector tipo tandem quadrupolo, onde também foram realizados os procedimentos de validação e determinação dos compostos bisfenol A e estrona que não foram suscetíveis a efeito de matriz durante a ionização, que acabou impedindo a determinação de outros desreguladores endócrinos. Os resultados indicam que não há redução da presença dos desreguladores endócrinos detectados, e de outros compostos orgânicos também detectados, mas não identificados, entre os pontos a montante e a jusante da Unidade de Tratamento do Rio Arroio Fundo. Todavia em função do grande efeito de matriz oriundo do fato da amostra ser de extrema complexidade, não foi possível realizar uma identificação e quantificação de todos os compostos alvos.

Palavras-chave: Desreguladores Endócrinos; Bisfenol A; 17α -Etinilestradiol; Cromatografia Líquida; Espectrometria de Massas.

ABSTRACT

Endocrine disrupters are compounds micropollutants of deleterious effects that cause effects to animals and humans has brought these problems to several decades related to poor training or infertility of various species. The presence of these compounds in the ng L^{-1} order is already capable of generating negative effects on the endocrine system. This work aimed at determining the presence and amount of some of these compounds as 17α -ethinylestradiol, bisphenol A and estrone among others, in the waters of the river Arroio Fundo, located in Jacarepaguá in Rio de Janeiro that has a bad water quality index. The first stage of this work was the implementation and validation of a method for determination of 17α -ethinylestradiol by liquid chromatography-fluorescence detection which were established limit of detection, quantification and linearity as directed by Inmetro (2010). Besides the evaluation of the samples through the established methodology. In subsequent step were carried out experiments on the determination of endocrine disruptors by tandem quadrupole mass spectrometry detector, were being performed validation procedures and determination of the compounds bisphenol A and estrone, which were not susceptible to matrix effect during ionization, which prevented the determination of other endocrine disrupters. The results indicate that there is no reduction of the presence of detected endocrine disruptors and other organic compounds, also detected but not identified, between the points upstream and downstream of Arroio Fundo treatment plant. However due to the large matrix effect originating from the fact that the sample be extremely complex, could not perform an identification and quantification of all target compounds.

Keywords: Endocrine disrupters; Bisphenol A; 17α -Ethinylestradiol; Liquid Chromatography; Mass Spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de ação dos compostos desreguladores endócrinos	20
Figura 2: End capping de colunas.....	48
Figura 3: Esquema simplificado de detector de fluorescência.....	50
Figura 4: Sistema ótico do detector de fluorescência.....	50
Figura 5: Separação de uma mistura de três corantes através da técnica de preparação da amostra por extração em fase sólida.	52
Figura 6: Esquema de funcionamento de extrator em fase sólida manual.....	53
Figura 7: Esquema de funcionamento de extrator em fase sólida automatizado.	54
Figura 8: Diagrama básico de espectrômetro de massas.	55
Figura 9: Diagrama geral de espectrômetro de massas tipo tandem quadrupolo.	57
Figura 10: Vista aérea do rio Arroio Fundo e da estação de tratamento do rio.	67
Figura 11: Foto do satélite do rio Arroio Fundo local da UTR.....	68
Figura 12: Diagrama de seletividade/hidrofobicidade de fase estacionária.....	73
Figura 13: Curva analítica do 17 α -etinilestradiol obtido no HPLC/FLU.	79
Figura 14: Curva analítica e linearidade do 17 α -etinilestradiol, 17 α -estradiol, 17 β - estradiol, 4 nonilfenol, pentaclorofenol, bisfenol A e estrona realizado no espectrômetro de massas Xevo TQ.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Substâncias químicas classificadas como desreguladores endócrinos.....	23
Tabela 2: Nomenclatura e propriedades físico-químicas do 17 α -etinilestradiol.	26
Tabela 3: Resumos das medições da concentração do 17 α -etinilestradiol em plantas de tratamento de descarte na europa	27
Tabela 4: Quantidade média eliminada de estrogênios naturais por humanos	30
Tabela 5: Nomenclatura, propriedades físico-químicas e dados relativos à destino ambiental do 17 β -estradiol.....	30
Tabela 6: Nomenclatura, propriedades físico-químicas e dados relativos à destino ambiental da estrona.....	33
Tabela 7: Nomenclatura e propriedades físico-químicas do bisfenol A.....	35
Tabela 8: Nomenclatura e propriedades físico-químicas do 4 nonilfenol.	39
Tabela 9: Nomenclatura e propriedades físico-químicas do pentaclorofenol.	40
Tabela 10: Faixa de concentração em ng L ⁻¹ para diferentes matrizes ambientais dos estrogênios estudados..	42
Tabela 11: Compilação de estudos realizados no Brasil referente à presença de estrogênios em matrizes ambientais.	43
Tabela 12: Classificações possíveis para os processos cromatográficos e afins.....	45
Tabela 13: Seleção de métodos para análise de desreguladores endócrinos em amostras de origem ambiental diversas.....	60
Tabela 14: Roteiro a ser seguido visando avaliação de seletividade durante procedimento cromatográfico.....	64
Tabela 15: Estimativa de carga orgânica de origem doméstica em diferentes rios da cidade do Rio de Janeiro.....	66
Tabela 16: Coordenadas geográficas dos pontos de coleta das amostras no rio Arroio Fundo.....	66
Tabela 17: Concentração dos padrões em $\mu\text{g g}^{-1}$ utilizados para elaboração da curva de calibração do espectrômetro de massas Xevo TQ.....	71
Tabela 18: Gradiente cromatográfico relativo à etapa espectrométrica realizado no espectrômetro de massas Xevo TQ.....	74
Tabela 19: Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) final de padrão nas amostras para teste de adição padrão em 3 níveis de concentração.	75

Tabela 20: Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) final de padrão para determinação da linearidade do método analítico.	77
Tabela 21: Resultados dos cálculos relativos à limite de detecção para o 17 α -etinilestradiol em área e altura obtidos no HPLC/FLU.....	78
Tabela 22: Resultados de quantificação do 17 α -etinilestradiol para amostras do rio Arroio Fundo.....	81
Tabela 23: Resultados relativos a limite de detecção, limite de quantificação e coeficiente de variação dos compostos 17 α -etinilestradiol, 17 α -estradiol, 17 β -estradiol, 4 nonilfenol, pentaclorofenol, bisfenol A e estrona realizados em espectrômetro de massas modelo Xevo TQ	86
Tabela 24: Resultados obtidos por espectrometria de massas das amostras do rio Arroio Fundo nos meses de agosto a dezembro de 2014 para os compostos bisfenol A e estrona	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização química a pressão atmosférica
APPI	Fotoionização a pressão atmosférica
BPA	Bisfenol A
CE	Comissão Europeia
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DES	Dietilestilbestrol
ECD	Detector de captura de elétrons
EDC'S	Desreguladores endócrinos
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
ESI	Eletronspray
E1	Estrona
E2	17 β -estradiol
E3	Estriol
EE2	17 α -etinilestradiol
FID	Detector de Ionização de chama
FLU	Detector de fluorescência
FPD	Fotômetro de chama
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
INEA	Instituto Estadual do Ambiente
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
In Vitro	Em vidro
In Vivo	Em vivo
Ion Trap	Detector de captura de íons
IPCS	Programa Internacional de Segurança Química
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
KOC	Coeficiente de partição água-carbono orgânico

KOW	Coeficiente de partição octanol-água
MALDI	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz
MS	Espectrômetro de massas
ND	Não detectado
OCED	Organização Para a Cooperação de Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PET	Polietileno tereftalato
PH	Potencial hidrogeniônico
PVC	Cloreto de polivinila
REACH	Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Químicos
r^2	Coeficiente de determinação
r	Coeficiente de correlação
SPE	Extração em fase sólida
TOF	Detector de tempo de voo
UE	União europeia
UPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
UTR	Unidade de Tratamento de Rio
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
1 OBJETIVOS.....	16
1.1 Objetivos gerais	16
1.2 Objetivos específicos	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Histórico	17
2.2 Mecanismo de ação	18
2.3 Definição	21
2.4 Compostos químicos com propriedades desreguladoras endócrinas	22
2.5 17 α - etinilestradiol	25
2.6 17 β - estradiol	29
2.7 Estrona.....	32
2.8 Bisfenol A.....	34
2.9 4 nonilfenol.....	37
2.10 Pentaclorofenol	39
2.11 Situação no Brasil	41
2.12 Cromatografia	44
2.13 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	45
2.14 Extração em Fase Sólida	51
2.15 Espectrometria de Massas.....	54
2.16 Métodos para determinação de desreguladores endócrinos.....	58
2.17 Validação de metodologia para análises cromatográficas e espectrométricas.....	63
2.18 Área de Estudo	64
3 METODOLOGIA	68

3.1	Amostragens, preparo de amostras e extração.	68
3.2	Preparo dos Padrões	70
3.3	Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	71
3.3.1	Otimização de parâmetros cromatográficos.	72
3.4	Validações de metodologia para análise de 17 α -etinilestradiol por CLAE. ..	73
3.5	Análise por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada espectrometria de massas (UPLC-MS/MS).....	74
3.6	Validação das análises de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada espectrometria de massas (UPLC-MS/MS)	76
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
4.1	Cromatografia Líquida de alta eficiência – CLAE	77
4.2	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada espectrometria de massas (UPLC-MS/MS)	83
5	CONCLUSÃO	90
6	PERSPECTIVAS FUTURAS	91
	REFERÊNCIAS	92
	ANEXOS	96
	Anexo I - Injeção (2) dos pontos relativos à curva de calibração do 17 α -Etinilestradiol.....	96
	Anexo II - Injeção das amostras relativas às análises do 17 α -Etinilestradiol através de cromatografia líquida para o rio Arroio Fundo.....	101
	Anexo III - Cromatograma das otimizações realizadas na metodologia cromatográfica visando aumento de seletividade para amostras do rio do Arroio Fundo.....	106
	Anexo IV – Resultados obtidos para os compostos através do experimento de adição padrão por espectrometria de massas.	109
	Anexo V – Cromatograma das transições dos compostos desreguladores endócrinos e MRM de amostras realizado no espectrômetro de massas.....	116

INTRODUÇÃO

Os desreguladores endócrinos estão sabidamente presente em nosso meio ambiente, de acordo com Khetan (2014) nas últimas duas décadas o número de relatórios indicando a presença de composto orgânicos que poluem o meio aquático, atingindo assim as nossas fontes de água potável, vem crescendo drasticamente.

O meio ambiente aquático é especialmente suscetível à exposição destes compostos devido a grande variedade de substâncias que são lançadas nos corpos d'água. Sabe-se ainda que parte destes compostos são utilizados como medicamentos, como por exemplo o 17α -etinilestradiol que é um hormônio sintético derivado do hormônio natural estradiol, cuja ação estrogênica geralmente ocorre como bioativo de uso oral presente em quase todas as formulações de pílulas contraceptivas, e que chega aos rios pelos despejos de origem doméstica ou industrial sem o devido tratamento (NAGPAL & MEAYS, 2009). Todavia além destes, temos outros compostos com aplicações diversas como pesticidas, plasticidas, germicidas e retardantes de chamas que possuem um potencial efeito de interferência nas funções biológicas normais causando assim efeitos adversos à saúde (KHETAN, 2014).

Muitas populações de animais já foram seriamente afetadas por estas substâncias, e dentre os efeitos podemos mencionar a disfunção da tireoide, redução da fertilidade em aves, peixes e mamíferos, graves deformidades de nascimento em aves e desmasculinização e feminilização destas espécies (KHETAN, 2014).

O número de compostos desreguladores endócrinos lançados na natureza cresce a uma taxa de cerca de mil novos compostos/ano, enquanto que a capacidade analítica conclusiva não chega à metade. Deste modo só conhecemos uma pequena parte das substâncias químicas que podem ter potencialidades como desreguladores endócrinos (SANTAMARTA, 2001).

O estudo a respeito destes compostos vem crescendo no Brasil, apesar da ausência de uma legislação específica, e já há diversos resultados apontando para contaminação de nossas águas. Adicionalmente sabe-se que há outras fontes de contaminação oriundas de rotas pelo ar e pelo solo, isto devido às características

lipofílicas e a persistência, que faz com que estes compostos sejam capazes de se bioacumular e se fazer presente em níveis tróficos mais elevados (KHETAN, 2014).

Desta forma decidiu-se realizar este trabalho a fim de monitorar estes compostos presentes na amostra de um rio que vem sofrendo interferência antrópica de fontes difusas.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivos gerais

Identificar e quantificar desreguladores endócrinos nas águas do rio Arroio Fundo localizado em Jacarepaguá no Rio de Janeiro.

1.2. Objetivos específicos

- Implantar, otimizar e validar método para determinação do composto 17 α -etinilestradiol através de cromatografia líquida em amostras de água de rio, através da detecção por fluorescência.
- Avaliar, adequar e validar método para determinações quantitativas e qualitativas dos compostos 17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol, 17 α -estradiol, estrona, bisfenol A, 4 nonilfenol e pentaclorofenol através de espectrometria de massas com uso de detector tipo tandem quadrupolo.
- Verificar através dos resultados, possíveis alterações quanto à presença e concentração dos compostos 17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol, 17 α -estradiol, estrona, bisfenol A, 4 nonilfenol e pentaclorofenol relativas aos pontos de amostragem, tendo em vista a presença de um tratamento físico-químico entre os mesmos.
- Avaliar o efeito de matriz das amostras para determinação dos compostos 17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol, 17 α -estradiol, estrona, bisfenol A, 4 nonilfenol e pentaclorofenol.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

A presença de micropoluentes no meio ambiente aprofunda outras questões relativas à exposição a compostos químicos que são capazes de desenvolver um efeito mimetizador dos hormônios trazendo em si, várias consequências aos animais e aos seres humanos (DE PAIVA PESSOA et al., 2012).

Sabe-se que certos compostos químicos são capazes de interferir no sistema endócrino de diversas formas, podendo afetar a saúde, o crescimento e a reprodução. A estas substâncias referem-se como desreguladores endócrinos (EDC's) ou disruptores endócrinos (ED) (BIRKETT & LESTER, 2003).

O problema relativo aos desreguladores endócrinos tem sido evidenciado desde 1900, mas o fenômeno ganhou evidência nas questões ambientais e saúde humana, desde a publicação do livro *Primavera Silenciosa* da autora Rachel Carson em 1962, onde esta já dava evidências do problema da exposição de animais e seres humanos aos pesticidas químicos e a responsabilidade da ciência relativa aos limites do progresso tecnológico. Carson já questionava a exposição a pesticidas químicos dizendo que estávamos todos sendo submetidos a um processo de envenenamento lento, além de estarmos submetendo várias espécies animais e poluindo recursos como o solo e as águas. Desafiando o governo de sua época e a lógica que imperava naquele instante onde a ciência era um conhecimento quase divino e exclusivo para homens, ela descreve como os inseticidas à base de hidrocarbonetos clorados e fósforo orgânico alteravam os processos celulares de plantas, animais e seres humanos.

Somente depois da publicação do livro *Primavera Silenciosa*, comunidades que haviam sofrido pulverizações aéreas de pesticidas começaram a se organizar em nível local contra a continuidade da poluição tóxica. Os cientistas que alegavam serem os sabedores do conhecimento supremo acabaram tendo de assumir sua ignorância relativa a alguns aspectos das interações dos compostos químicos que produziam, e desta forma o governo começou a preparar algumas leis para proteção contra um novo tipo de contaminação considerada invisível (CARSON, 2012).

Quase como uma sequência ao trabalho publicado por Carson, o livro "O futuro roubado" lançado em 1996 aborda questões que vão além do já discutido câncer, efeito causado pelo uso de pesticidas e herbicidas. Estes dados aprofundam

outras questões relativas à exposição a compostos químicos que são capazes de desenvolver um efeito mimetizador dos hormônios trazendo em si, várias consequências aos animais e aos seres humanos. Efeitos estes como o que o DES (Dietilestilbestrol), causou em muitas mães que usaram o mesmo como medicamento para mulheres que tinham dificuldade em levar uma gravidez adiante ou até mesmo como uma vitamina durante a gravidez. Este foi responsável, de acordo com estudos da época, por diversos casos de câncer de vagina em filhas de mulheres que utilizaram o medicamento durante a gestação (COLBORN; DUMANOSKI; MYERS, 2002).

Além disso, também foi atribuído ao DES a má formação uterina em cada 40 mulheres de 60 que foram expostas, impedindo que as mesmas pudessem vir a ser mãe. Esse composto também trouxe problema aos filhos (homens) de mulheres que fizeram uso do mesmo durante a gestação. A eles são atribuídos problemas como o elevado número de espermatozoides com problema de locomoção, pênis atrofiados e câncer de testículos (COLBORN; DUMANOSKI; MYERS, 2002).

Há vários aspectos que tem sido estudado visando caracterizar um desregulador endócrino. Estes geralmente ocorrem no meio ambiente como uma mistura complexa de vários compostos químicos e não isoladamente. Seus impactos variam substancialmente sobre o ciclo de vida de organismos e são particularmente severos durante a gestação e as primeiras etapas do desenvolvimento, os efeitos podem vir a serem percebidos muito depois da exposição e muitos desreguladores endócrinos exibem efeitos nas gerações futuras, conhecido como efeito transgeracional (KHETAN, 2014).

2.2 Mecanismo de ação

Organismos multicelulares necessitam integrar e regular a funcionalidade das diferentes células. Os dois sistemas utilizados para realizar esta operação são o sistema nervoso e o sistema endócrino. O sistema endócrino é crucial tanto para as plantas como para os animais e seres humanos, tendo em vista que este é responsável pelo crescimento, reprodução, manutenção e metabolismo. Além disso, é responsável pela produção de hormônios com diferentes funções e consiste de várias glândulas como o pâncreas, a tireoide, os órgãos reprodutores (ovários e

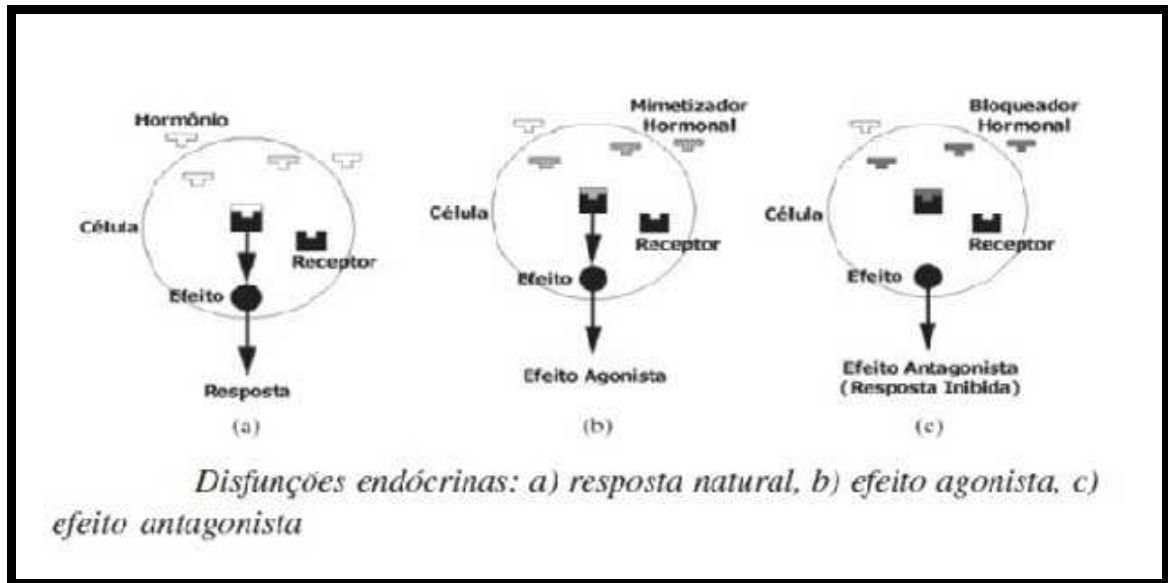
testículos), o hipotálamo, a pituitária (hipófise), a paratireoide e a suprarrenal em diferentes áreas (CALIJURI, 2013).

As moléculas de hormônios são geralmente de vida curta no corpo, de minutos a não mais que algumas horas, devido ao mecanismo natural de limpeza, que ocorre pela inativação realizada através de fígado e rins. Todavia na presença de desreguladores endócrinos estes mecanismos podem não se aplicar, conduzindo a persistência e bioacumulação dessas substâncias no corpo.

Os desreguladores endócrinos são uma classe de substâncias presente no meio ambiente e que alteram as funções endócrinas. Estas são encontradas na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} , e trazem vários efeitos negativos a plantas, animais e seres humanos (BILA, 2005).

Os sítios receptores dos hormônios possuem alta afinidade pelo hormônio específico, portanto para a ativação da resposta são necessárias pequenas concentrações de hormônio. Embora haja essa especificidade, os sítios podem se ligar com outros compostos químicos, o que significa que qualquer desregulador endócrino em pequena concentração pode causar efeitos e deflagrar uma resposta. A ruptura endócrina ocorre pela ação do desregulador, quando este interage com o receptor do hormônio, promovendo uma resposta diferente a natural do sistema endócrino. Esta ação pode ocorrer pela ação do produto químico se ligando ao receptor e atuando como imitador do hormônio, o que se denomina efeito agonístico. Há também a possibilidade do composto químico se ligar ao receptor e não produzir resposta alguma impedindo o hormônio de interagir, dando um efeito antagonístico (CALIJURI, 2013). A Figura 1 mostra como ocorre o mecanismo de ação relativo a estes efeitos no organismo.

Figura 1: Mecanismo de ação dos compostos desreguladores endócrinos.



Fonte: GHISELLI & JARDIM, 2007.

Há ainda outros efeitos que podem ocorrer pela ação de compostos químicos no sistema endócrino, tais como, a ruptura da síntese e remoção dos hormônios e seus receptores, e a interação com múltiplos sistemas de hormônios. Logo o processo pode ser definido através dos seguintes mecanismos (CALIJURI, 2013):

Imitador: O perturbador ajusta-se precisamente ao receptor do hormônio e passa a enviar mensagem em tempo não adequado ou em superprodução, alterando atividades biológicas.

Estimulador: Alguns perturbadores estimulam a formação de mais receptores de hormônios nas células, multiplicando os sinais do hormônio.

Bloqueador: Os perturbadores bloqueiam os hormônios naturais, pela ocupação dos sítios receptores.

Estimulador endócrino: Ocorre pela ação de perturbadores que aceleram a degradação dos hormônios e os eliminam do corpo, levando a deficiência.

Estimulador de enzima: Ocorre pela ação de desreguladores que interferem em enzimas necessárias para degradação do hormônio no sistema, resultando em mais hormônio do que o necessário (ou do que é saudável).

Desintegrador: Os desreguladores destroem o hormônio ou a habilidade deste em realizar a função.

2.3 Definição

Os desreguladores endócrinos são micropoluentes que possuem uma ação deletéria específica resultante de uma alteração de qualquer parte do sistema endócrino. A definição precisa de um desregulador endócrino foi proposta no “*European Workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife*” que diz: “Um agente desregulador endócrino é uma substância exógena que causa efeitos adversos à saúde em um organismo intacto, ou seus descendentes, em consequência de mudanças na função endócrina” (BIRKETT & LESTER, 2003).

Muitos compostos químicos têm demonstrado este potencial, de ser um desregulador endócrino, todavia de acordo com Birkett & Lester (2003) mais estudos são necessários. Por exemplo, estudos “*in vitro*”, como ensaios de ligações de hormônios, tem demonstrado que os compostos químicos possuem efeitos desreguladores, mas os estudos ainda não estão bem estabelecidos “*in vivo*”. Assim, uma definição separada deste potencial endócrino é necessária: “Um potencial desregulador endócrino possui propriedades que pode se esperar que levem a um efeito desregulador endócrino em um organismo intacto”.

A agência de proteção ambiental americana (EPA) propôs uma definição mais detalhada para um desregulador endócrino, que diz: “Um desregulador endócrino é um agente exógeno que interfere com a síntese, secreção, transporte, ligação e ação ou eliminação do hormônio natural no corpo que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e ou comportamento dos organismos” (NERL SCIENCE, 2015).

O importante de se estar ciente é que um acordo ainda está pendente no que se refere ao efeito biológico específico que seria requerido para classificar uma substância como um potencial desregulador endócrino. Desreguladores endócrinos (EDC's) podem exibir comportamento estrogênico ou androgênico. Assim, podemos dizer que estrogênios são definidos como “qualquer um da família de hormônios esteroides que regulam e sustentam o desenvolvimento sexual feminino e funções reprodutivas”. Entretanto alguns cientistas ampliaram a definição de estrogênios para incluir qualquer composto que: estimule o crescimento de tecido por aumento de proliferação celular em órgãos sexuais femininos, promova hipertrofia ou aumento de tamanho celular, como os que ocorrem em seios femininos ou no

músculo masculino durante a puberdade e inicia a síntese de proteínas específicas (BIRKETT & LESTER, 2003).

No que se refere a comportamento androgênico é definido como “classe de hormônio sexual masculino relacionado ao esteroide androstano e produzido no córtex adrenal e nos testículos; incluem a testosterona, androsterona e androstanolona responsável pelo desenvolvimento de características secundárias masculinas como a voz e pelos faciais” (BIRKETT & LESTER, 2003).

2.4 Compostos químicos com propriedades desreguladoras endócrinas

Várias substâncias desreguladoras endócrinas ou potencialmente foram previamente classificadas como micropoluentes. Isto inclui compostos como os alquilfenóis, alquilfenóis polietoxilados, hidrocarbonetos poliaromáticos, bifenilas policloradas, ftalatos, bisfenol-A, polibromados retardantes de chama, dioxinas, furanos, pesticidas e hormônios esteroides. Com o aumento do conhecimento relativo a estes compostos, a lista de compostos químicos que exibem tal propriedade tende a crescer (KHETAN, 2014). Há duas maneiras principais de se determinar se qualquer composto químico exibe características de desregulador endócrino que são ensaios *in vitro* ou *in vivo*, embora a maioria dos dados disponíveis sobre compostos desreguladores endócrinos tenham vindo de ensaios realizados *in vitro*. A Tabela 1 mostra uma gama de compostos que foram classificados como desreguladores endócrinos ou como potenciais desreguladores (BILA, 2005).

Tabela 1- Substâncias químicas classificadas como desreguladores endócrinos.

Ftalatos	Agrotóxicos	
dimetil ftalato (DMP)	<u>Inseticidas</u>	<u>Fungicidas</u>
dietil ftalato (DEP)	DDT (2,2 bis-p-clorofenil-1,1,1-tricloroetano)	Vinclozonila
di-iso-butil ftalato (DIBP)	DDE (2,2 bis-p-clorofenil-1,1-dicloroetileno)	Carbendazime
di-n-butil ftalato (DBP)	Deltametrin	Penconazol
butilbenzil ftalato (BBP)	Carbofurano	Procloraz
diciclohexilo ftalato (DCHP)	<u>Herbicidas</u>	Propiconazol
di-(2-etil-exil) ftalato (DEHP)	Antrazina	Epoxiconazol
di-n-octil ftalato (DOP)	Linuron	Procimidona
di-iso-octil ftalato (DIOP)		Tridemorfos
di-iso-nonil ftalato (DINP)		
di-iso-decil ftalato (DIDP)		
Alquilfenóis	Pesticidas Organoclorados	
Nonilfenol	Lindane (1,2,3,4,5,6-hexaclorohexano)	
Nonilfenol Etoxilado		
Octilfenol	Compostos orgânicos de estanho	
Octilfenoletoxilado	Tributilestanho (TBT) e trifenilestanho (TPT)	
Organoclorados	Bifenilas policloradas	
Dibenzo-p-dioxina	2,4,4-triclorobifenil	
TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina)	2,2,5,5-tetraclorobifenil	
TCDF (2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano)	2,2,4,5,5-pentaclorobifenil	
	2,3,4,4,5-pentaclorobifenil	
	2,2,3,4,4,5-hexaclorobifenil	
	2,2,4,4,5,5-hexaclorobifenil	
	2,2,3,4,4,5,5-heptaclorobifenil	

Continuação da Tabela 1- Substâncias químicas classificadas como desreguladores endócrinos.

Bisfenol		
Bisfenol A		
Parabenos		Retardante de chama bromado
Benzilparabeno		Polibromofenila (PBB)
Isobutilparabeno		2,2,4,4-tetrabromofeniléter (BDE 47)
Butilparabeno		2,2,4,4,5-pentabromodifenil éter (BDE 99)
n-propilparabeno		2,2,4,4,6-pentabromodifenil éter (BDE 100)
etilparabeno		2,2,4,4,5,5-hexabromodifenil éter (BDE 153)
metilparabeno		2,2,4,4,5,6-hexabromodifenil éter (BDE154)
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos		2,2,3,4,4,5,6-heptabromodifenil éter
Naftaleno	Benzo (a) antraceno	Octabromodifenil éter (BDE octa)
Acenaftileno	Criseno	Decabromodifenil éter (BDE 209)
Acenafteno	Benzo(b)fluorantreno	Hexabromociclododecano (HBCD)
Fluoreno	Benzo(k)fluorantreno	Tetrabromobisfenol A (TBBA)
Fenantreno	Benzo(a) pireno	Fitoestrogênios
Antraceno	Indeno(123-cd)pireno	Isoflavona: daidzeína e genisteína
Fluoranteno	Dibenzo(ah) antraceno	Ligana: metaresinol, enterodiol e enterolactona
Pireno	Benzo (ghi)perileno	Estrogênios naturais
Agentes terapêuticos e farmacêuticos		Estrona (E1)
Dietilestribestrol (DES)		17 β -estradiol (E2)
17 α -etinilestradiol (EE2)		

Fonte: BILA, 2005.

2.5 17 α -etinilestradiol

O hormônio sintético 17 α -etinilestradiol, é usado com medicamento para seres humanos no tratamento de diversos distúrbios ginecológicos e no tratamento de câncer de mama pós-menopausa. Entretanto, seu uso mais intensivo é como contraceptivo oral, onde geralmente é usado em conjunto com progestina sintética. Estas concentrações nas pílulas contraceptivas variam na concentração de 20 a 50 μg , com 35 μg sendo a concentração mais comum (JOHNSON & HARVEY, 2002).

Os dados sobre as propriedades físico químicas do 17 α -etinilestradiol e seu destino ambiental indicam que a substância é relativamente persistente no meio ambiente aquático (JOHNSON & HARVEY, 2002). Ao contrário do hormônio natural 17 β -estradiol, o hormônio sintético 17 α -etinilestradiol é apenas lentamente biodegradado nos tratamentos de esgoto e no meio ambiente. Portanto, mesmo baixas concentrações deste, são fontes de preocupação, se detectados em alimentos e água para consumo humano (WENZEL; MULLER; TERNES, 2003). Até 5 ng L^{-1} de 17 α -etinilestradiol foram relatados em águas superficiais. Em águas subterrâneas foram detectados até 0,6 ng L^{-1} em estudo realizado na EU (União Europeia). No caso de águas naturais, isentas de despejos industriais, agrícolas ou de esgotos, não há ocorrência do 17 α -etinilestradiol relatado na literatura (WENZEL; MULLER; TERNES, 2003). Outros resultados apontam ainda que para o monitoramento realizado na planta de tratamento em Ligúria na Itália os valores obtidos para o 17 α -etinilestradiol ficaram abaixo do limite de detecção excetuando um ponto que se manteve na faixa de 5 ng L^{-1} (DI CARRO et al., 2010), Entretanto em estudo realizado no rio Dan-Shui no Taipei, os valores foram bem mais elevados, ficando na ordem de 15 ng L^{-1} e ressaltando os problemas relacionados de efeito de matriz e filtragem da amostra. Esta diferença considerável vem do fato da Europa realizar em geral um bom tratamento do seu esgoto antes de devolver aos rios (CHEN et al., 2007).

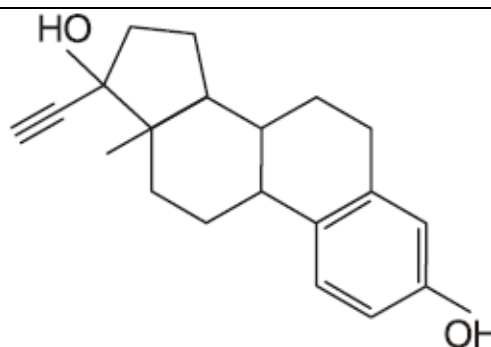
O principal sítio de metabolismo do 17 α -etinilestradiol é o fígado através de duas vias metabólicas principais sendo a 2-hidroxilação e a 16 β -hidroxilação. Estas vias resultam em um número de metabólitos, os quais são conjugados com glucoronidos e sulfatos e são considerados biologicamente inativos. Todavia a maior parte do 17 α -etinilestradiol é conjugada diretamente com o ácido glucorônico e excretada na urina (JOHNSON & HARVEY, 2002). Diferentemente do hormônio

natural, uma parte significativa do 17 α -etinilestradiol é eliminada por rota fecal. Em estudos radiomarcados a proporção radioativa da relação fezes/urina tem sido reportada em torno de 4:6, e o total de recuperação de ambas as fontes está na faixa de 90% (JOHNSON & HARVEY, 2002).

Entre as características de bioacumulação e físico-químicas do composto podemos mencionar que não há dados sobre persistência deste em solo, embora seja provável que a adsorção no solo seja uma importante fonte de remoção, devido ao coeficiente de partição água carbono orgânico (log K_{oc}) de 3,8 (JOHNSON & HARVEY, 2002). A Tabela 2 apresenta os dados relativos à nomenclatura química e características do 17 α -etinilestradiol.

Tabela 2 – Nomenclatura e características do 17 α -etinilestradiol

Números do CAS	57-63-6
Nomenclatura IUPAC	17 α -19-norpregna-1,3,5(10)-trien-20-ino-3,17 diol
Outros nomes	17 α -etiniloestradiol, 17 α -etinilestradiol, EE2.
Peso molecular	296.4034
Fórmula química	$C_{20}H_{24}O_2$
Estrutura química	



Fonte: JOHNSON & HARVEY, 2002.

A principal rota de entrada do 17 α -etinilestradiol no meio ambiente aquáticos é pelo efluente doméstico como resultado da eliminação do medicamento contraceptivo utilizado pelas mulheres (NAGPAL & MEAYS, 2009).

Há também a possibilidade do efluente de fabricantes de esteroides sintéticos contribuírem potencialmente em contaminações localizadas. Além destas vias citadas, há ainda a possibilidade do descarte por parte do usuário de medicamentos

não mais utilizados ou fora do prazo de validade. Na Europa, o procedimento estabelecido é de retorno do mesmo a farmácia, que é responsável pela disposição e descarte adequado (SNYDER et al., 2009).

A Tabela 3 mostra os dados das concentrações de 17 α -etinilestradiol em descargas de efluentes de plantas de tratamento, e os níveis encontrados nos lodos de esgoto das respectivas plantas de operação na Europa. De acordo com Johnson e Harvey (2002), os estudos de monitoramento indicam que o 17 α -etinilestradiol mantém-se na faixa de 0,1 a 62 ng L⁻¹.

Tabela 3 – Resumos das medições da concentração do 17 α -etinilestradiol em plantas de tratamento de descarte na Europa.

País	Localização	Concentração de 17α-etinilestradiol em ng L⁻¹	Referência
Alemanha	20 ETE's	17 ^a , 62 ^c	Stumpf et al (1996)
	13 ETE's	ND	Wegener et al (1999)
	16 ETE's	1 ^a ,4 ^b ,15 ^c	Ternes et all (1999)
	1 ETE	0,2 – 3	Hansen et al (1998)
	3 ETE's	0,1-8.9,0.7 ^a ,1.4	Kuch and Ballschmitter (2001)
Italia	6 ETE's	ND-1.7, 0.45 ^a	Baronti et al (2000)
	5 ETE's	ND – 2.2	Johnson et al (2000)

Continuação da Tabela 3 – Resumos das medições da concentração do 17 α -etinilestradiol em plantas de tratamento de descarte na europa.

Holanda	5 ETE's (2 industriais e 3 domésticas)	ND ^a ND – 7.5	Belfroide et al (1999)
	3 ETE's	0.2 - 1.4	Johnson et al (2000)
Espanha	24 hrs amostra composta de 4 ETE's	ND	Solé et al (2000a)
Suécia	1 ETE	4	Larrson et al (1999)
Reino Unido	Lodos ativados de ETE, 8 amostras	ND – 7	Aheme and Briggs(1989)
	7 ETE's (detectado em 2 ETE de todas durante as 3 ocasiões; 1 ETE em uma ocasião).	ND - 7	Desbrow et al (1998)
	Chelmsford ETE	1.7-3.4	Rodgers-Gray et al (2000)
	3ETE's nos rios Lea e Nene	ND – 1.85	Niven et al (2001)
	2 ETE'S	ND	Kanda et al (2001)

Legenda: ETE – Estação de tratamento de esgoto, ND – Não detectado, a =média, b=-90 por cento, c= máximo.

Fonte: JOHNSON & HARVEY, 2002.

2.6 17 β - estradiol

O estrógeno natural, 17 β -estradiol é sintetizado em todas as fêmeas vertebradas e em menor quantidade em machos, este alcança o meio ambiente via eliminação dos dejetos através dos sistemas de esgoto (WENZEL; MULLER; THERNES, 2003). Este composto geralmente é utilizado pela medicina particularmente como repositor em terapias e para tratamento de outros distúrbios ginecológicos. Ele também é utilizado para tratamento de câncer de próstata e de mamas em homens e para tratamento de câncer de mama em mulheres pós-menopausa. O 17 β -estradiol também é utilizado em terapias, como auxiliar de crescimento, em medicina veterinária. Nos Estados Unidos o consumo anual deste hormônio como auxiliar em terapia de reposição hormonal e como auxiliar de crescimento na agricultura está estimando na faixa entre 0,58 e 1,69 toneladas por ano (JOHNSON & HARVEY, 2002).

Sua rota metabólica é equivalente a do 17 α -etinilestradiol, onde a maior parte da degradação ocorre no fígado por 2 vias que são a 2-hidroxilação e a 16 β -hidroxilação, resultando em metabólitos que são biologicamente inativos e amplamente eliminados pela urina. Os principais metabólitos são conjugados do estriol, 2 o-hidroxiestrone, estrone, 16 α -hidroxiestrone e o estradiol, em ordem decrescente de importância (JOHNSON & HARVEY, 2002)..

Uma menor parte do 17 β -estradiol é eliminada pelas fezes, estes metabólitos tendem a ser excretados em uma forma não conjugada diferentemente da eliminação pela urina e representam em torno de 5 a 10% do volume total excretado pelas fezes e urina (JOHNSON & HARVEY, 2002).

O 17 β -Estradiol não pode ser eliminado através do tratamento de esgoto, devido a sua velocidade de degradação ser muito lenta, para se conseguir a completa eliminação, antes que estas alcancem os corpos hídricos (WENZEL; MULLER; THERNES, 2003). A Tabela 4 mostra os valores excretados de estrógenos naturais por seres humanos. A quantidade eliminada por cada ser humano varia de acordo com a idade e com o gênero.

Tabela 4 – Quantidade média eliminada de estrogênios naturais por humanos.

População	Excreção (estrogênios $\mu\text{g}/\text{dia}$)	Excreção média ($\mu\text{g}/\text{dia}$)
Crianças	1-40	20
Homens	40-130	85
Mulheres, não grávidas	50-450	250
Mulheres, grávidas	450-30.000	10.000
Mulheres pós-menopausa	5-50	28

Fonte: (WENZEL; MULLER; THERNES, 2003).

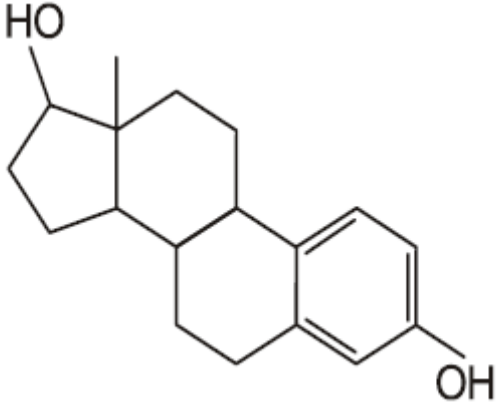
A expectativa sobre a bioacumulação do 17β -estradiol em organismos aquáticos é de que estes valores sejam baixos considerando o baixo valor do coeficiente de partição água octanol (JOHNSON & HARVEY, 2002).

Os dados físico químicos do 17β -estradiol e sua rota ambiental, indicam que sua biodegradação com remoção completa leva em torno de 14-28 dias. A adsorção é o principal processo de remoção do composto (JOHNSON & HARVEY, 2002). A Tabela 5 apresenta os dados relativos, às nomenclaturas químicas e as características, além dos dados de destino ambiental do 17β -estradiol.

Tabela 5 – Nomenclatura, características e dados relativos ao destino ambiental do 17β -estradiol.

Nomenclatura e características	Valores (comentários)
Números do CAS	50-28-2
Nomenclatura IUPAC	17β -estra-1,3,5(10)-trien-3,17-diol
Outros nomes	OEstradiol, Estradiol, 17β -O estrona, E2
Peso molecular	272.4
Fórmula química	$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_2$

Continuação da Tabela 5 – Nomenclatura, características e dados relativos ao destino ambiental do 17 β -estradiol.

Estrutura química	
Estado físico a temperatura ambiente	Sólido
Solubilidade em água	13 mgL ⁻¹ a 20 °C
Coeficiente de partição octanol-água (log Kow)	2.69 – 4.0
Coeficiente de partição carbono – água (log Koc)	2.78-3.4
Constante de Henry	Não determinado
Tipo de degradação	
Aquático - abiótico	A adsorção é o principal processo de remoção, com a fotólise sendo de menor importância e a volatilização desprezível
Aquático – biótico	Vários estudos laboratoriais indicam que o 17 β -estradiol prontamente sofre biodegradação com total desaparecimento no prazo de 14-28 dias
Terrestre	Não há dados disponíveis sobre a persistência do 17 β -estradiol no solo, embora seja provável que a adsorção no solo seja um importante processo de remoção
Atmosférico	Não determinado

Fonte: JOHNSON & HARVEY, 2002.

Dados relativos à quantidade de 17β -estradiol encontrado em plantas de tratamento de esgotos e lodos de estação indicam a concentração do composto na faixa de 0,15 a 88 ng L⁻¹ (JOHNSON & HARVEY, 2002).

O 17β -estradiol foi detectado em água de superfície na Alemanha, Itália, Holanda e Reino Unido em concentrações de até 12 ng L⁻¹, sendo que a maior parte dos valores reportados na literatura e nos relatórios das autoridades informam o range de < LD (limite de detecção) até em torno de 4 ng L⁻¹. Os valores máximos foram reportados em torno de 5,5 e 12 ng L⁻¹. No caso de águas subterrâneas e águas para consumo humano, o 17β -estradiol não foi detectado nos países citados (JOHNSON & HARVEY, 2002).

2.7 Estrona

A estrona é 10 vezes menos potente que o estradiol e representa 60 a 80% do estrógeno circulante. O composto foi o primeiro estrógeno a ser isolado de forma cristalina da urina de uma mulher grávida. Estrógenos são biossintetizados no folículo dominante maduro e no corpo lúteo em mulheres na pré-menopausa. Durante a gravidez, a placenta se torna o principal local de biossíntese de estrógenos. Aproximadamente 50% da produção da estrona ocorrem nos ovários (LEMKE et al., 2008). A estrona restante é biossintetizada pelo estradiol, bem como a partir da conversão do sulfato de estrona em estrona na glândula adrenal. Em contraste com as mulheres pré-menopausa nas quais a proporção de estrona natural versus estradiol é de 1:2, nas mulheres pós-menopausa a proporção de estrona para estradiol é de 2:1, o que reflete uma perda na função do ovário (LEMKE et al., 2008).

Entre os principais usos da estrona podemos mencionar o uso médico em humanos na terapia de reposição hormonal e no tratamento de distúrbios ginecológicos. Além do uso da estrona no tratamento de câncer de próstata em homens e de seios em mulheres pós-menopausa (JOHNSON & HARVEY, 2002).

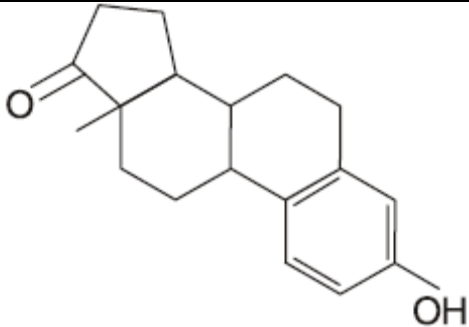
Sua rota metabólica é similar aos compostos citados anteriormente onde a maior parte da degradação ocorre no fígado por duas vias que são a 2-hidroxilação e a 16 β -hidroxilação, também resultando em metabólitos considerados biologicamente inativos e amplamente eliminados pela urina (JOHNSON & HARVEY, 2002).

A principal rota de lançamento no meio ambiente deste composto é pelos sistemas de esgotos ou excremento de animais. Apesar de ser degradável pelo sistema de tratamento de esgoto, assim como o 17 β -estradiol, a velocidade de degradação e completa remoção é muito lenta, permitindo que este alcance os cursos de água (JOHNSON & HARVEY, 2002).

Apesar de não haver disponibilidade de dados relativos à bioacumulação da estrona em organismos aquáticos, o seu baixo coeficiente de partição octanol/água, indica que é improvável sua bioacumulação na biota (JOHNSON & HARVEY, 2002).

As propriedades físico-químicas da estrona indicam sua completa remoção do ambiente entre 14 e 28 dias em testes realizados sob condições aeróbicas. A adsorção de compostos orgânicos é um importante processo resultando no particionamento da estrona em sedimentos e solo (JOHNSON & HARVEY, 2002). A Tabela 6 apresenta os dados relativos à nomenclatura química e informações físico-químicas, além dos dados de destino ambiental da estrona.

Tabela 6 – Nomenclatura, características e dados relativos ao destino ambiental da estrona.

Nomenclatura e características	Valores (comentários)
Números do CAS	53-16-7
Nomenclatura IUPAC	3-hydroiestra-1,3,5(10)-trien-17-one
Outros nomes	Oestrona, estrona, E1
Peso molecular	270.4
Fórmula química	C ₁₈ H ₂₂ O ₂
Estrutura química	
Estado físico a temperatura ambiente	Sólido
Solubilidade em água	30 mg L ⁻¹ a 20 °C

Continuação da Tabela 6 – Nomenclatura, propriedades físico-químicas e dados relativos ao destino ambiental da estrona.

Coeficiente de partição etanol - água (log Kow)	3.13 – 3.43
Coeficiente de partição carbono – água (log Koc)	3.1 - 3.5
Constante de Henry	Não determinado
Tipo de degradação	
Aquático - abiótico	A adsorção é o principal processo de remoção, com a fotólise sendo de menor importância e a volatilização desprezível
Aquático – biótico	Estudos laboratoriais em condições aeróbias indicam que a estrona prontamente sofre biodegradação com total desaparecimento no prazo de 14-28 dias
Terrestre	Não determinado
Atmosférico	Não determinado

Fonte: JOHNSON & HARVEY, 2002.

Dados relativos à presença da estrona em plantas de tratamento de efluentes e lodos de estações de tratamento na Europa indicam a concentração do composto na faixa de 0,35 a 220 ng L⁻¹, sendo que normalmente encontra-se na faixa de 5 a 20 ng L⁻¹.

A estrona foi detectada na água de superfície na Europa ficando normalmente na faixa de 0,5 até 14 ng L⁻¹ (JOHNSON & HARVEY, 2002).

2.8 Bisfenol A

O bisfenol A (BPA) é um dos mais comuns compostos químicos industriais produzidos mundialmente, foi sintetizado primeiramente pelo químico russo A.P.Dianin em 1981 (SCHECTER, 2012). O bisfenol A é utilizado para produção de resinas epóxi e policarbonatos, como um antioxidante em PVC plástico e como inibidor de polimerização em PVC (WENZEL; MULLER; THERNES, 2003).

Esse composto consiste de dois grupos funcionais de fenóis conjugados, e é sintetizado pela condensação da acetona com dois equivalentes do fenol. Além das

aplicações mencionadas ele também tem aplicações como retardante de chama, papel térmico sem carbono, e outros plásticos e resinas, tais como resinas de poliéster, resinas de polisulfona e resinas de poliácridonitrila (SCHECTER, 2012). A capacidade mundial de produção do bisfenol A foi de um milhão de toneladas nos anos 80, e mais de 2,2 milhões de toneladas em 2009. (SCHECTER, 2012)

O BPA tem sido detectado no solo, ar, água, aterros, lixiviados e no corpo humano. O BPA é achado no soro do sangue, leite, saliva e urina dos seres humanos em concentrações nanomolar. Também foi detectado no fluido amniótico em concentrações cinco vezes maior que o medido no plasma materno. Exposições fetais e perinatal de roedores ao BPA tem demonstrado afetar o cérebro, as glândulas mamárias e o trato reprodutivo, incluindo câncer hormônio dependente como são os casos de câncer de próstata (SCHECTER, 2012).

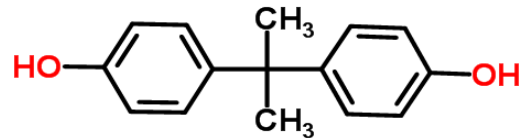
Concentrações de BPA em água de superfície foram reportadas na literatura em rios da Áustria, Bélgica, Suíça, Alemanha e Holanda até o limite de $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$. No caso de água potável concentrações de BPA, foram detectadas em limites baixo na ordem de ng L^{-1} . Dados da literatura revelam que o bisfenol A pode ser encontrado em água potável nas concentrações de $0,0005$ a $0,002 \mu\text{g L}^{-1}$ (WENZEL; MULLER; THERNES, 2003). A Tabela 7 apresenta os dados relativos à nomenclatura química e características do BPA

Tabela 7 – Nomenclatura e características do bisfenol A.

Números do CAS	80-05-7
Nomenclatura IUPAC	4,4-(2,2-propanediyl)diphenol
Outros nomes	4,4-(1-Methylethane-1,1diyl) diphenol, e 4,4 Methylethylidendbisphenol
Peso molecular	228.28
Fórmula química	$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2$

Continuação da Tabela 7 – Nomenclatura e características do bisfenol A.

Estrutura química



Fonte: [HTTP://WWW.CHEMSPIDER.COM/CHEMICAL-STRUCTURE.6371](http://www.chemspider.com/chemical-structure.6371).

As propriedades estrogênicas do BPA foram primeiramente demonstradas em estudos utilizando ratos ovariectomizados nos anos 30 durante uma pesquisa para produção de estrógenos sintéticos. Entretanto, este foi abandonado como fármaco após a descoberta do dietiestilbestrol (DES), que demonstrou ser muito mais potente (SCHECTER, 2012).

Desde os anos 90, várias dezenas de estudos têm sido dedicados para determinação de quantos produtos de consumo possuem o BPA, e quanto dele é liberado sob condições normais de utilização nos alimentos e bebidas. Grande parte destes estudos tem se focado no nível de BPA liberados em mamadeiras de bebês, produtos dentários e filmes de contato com alimentos. Há também uma grande quantidade de estudos dedicados a medir o BPA em alimentos enlatados, incluindo vegetais, peixes, sopas, comidas infantis e leite entre outros (SCHECTER, 2012).

De acordo com Schecter (2012), recentemente dois estudos de mercado foram realizados com comidas enlatadas no Canadá e nos Estados Unidos. Estes estudos confirmaram que a maioria dos alimentos enlatados contém níveis detectáveis de BPA. Uma ampla faixa de concentração foi reportada, levando os cientistas a estimarem que a atual exposição humana oriunda de alimentos enlatados e produtos engarrafados deve ser em torno de nanograma por quilo para as crianças e adultos oriundos de enlatados e engarrafados, e micrograma por quilo oriundos de mamadeiras.

O BPA está presente em quantidades significantes nos aterros e lixiviados em grande parte devido aos plásticos depositados nestes locais. De acordo com

Schechter (2012) até este momento não é possível dizer o quanto estas fontes ambientais contribuem para exposição humana ao bisfenol A, embora a exposição da vida selvagem seja significativamente suscetível.

O BPA quando não conjugado (na sua forma ativa) entra no corpo, este é metabolizado pelo fígado em pelo menos dois metabólitos; a maioria é conjugada na forma de BPA-gucorinado, e uma menor parte é conjugada na forma de BPA sulfato. Quando o BPA entra no organismo por via oral, este metabolismo é considerado bem mais eficiente porque o BPA é metabolizado no fígado antes de entrar em contato com a corrente sanguínea. Quando o BPA entra no organismo por vias não orais, ou seja, absorvido pela pele ou pelo sistema respiratório, este pode circular pelo organismo antes de chegar ao fígado. Esta distinção é importante, porque somente o BPA não conjugado tem atividade estrogênica (SCHECTER, 2012).

2.94 nonilfenol

O 4 nonilfenol é um produto da degradação de polietoxilados usado como surfactantes na limpeza de casa e agentes de limpeza industrial (30% do uso total). Os principais produtos de limpeza possuem nonilfenol polietoxilados. Além do uso como agente de limpeza, o 4 nonilfenol também é utilizado como emulsificante e estabilizante em polipropileno e PVC. Derivados de 4 nonilfenol são utilizados como emulsificante em pesticidas e em outras aplicações como auxiliar têxtil.

Na Europa os principais fabricantes de detergentes, voluntariamente estabeleceram um acordo para banir o uso de nonilfenol etoxilados em detergentes domésticos (WENZEL; MULLER; THERNES, 2003).

O 4 nonilfenol é um produto de origem intermediário do ciclo de refinamento do petróleo. Geralmente é formado pela alquilação do fenol com uma mistura de isômeros do nonano em presença de catalisador ácido. O produto resultante é uma mistura de isômeros para substituídos como o 4 nonilfenol (DA SILVA, F. et al., 2007).

Os alquilfenóis (classe de produtos a qual o 4 nonilfenol faz parte) têm sido amplamente utilizados no mundo, chegando a 650.000 toneladas produzidas em 1995, onde mais de 90% foram de nonilfenol. Segundo Harvilics (1999, apud DA SILVA, F. et al., 2007) o nonilfenol possui grande produção nos Estados Unidos que

em 1998 alcançou valores de 104 milhões de quilos, com uma expectativa de crescimento de 2 a 3% ao ano.

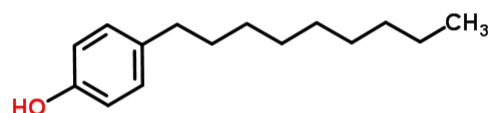
O 4 nonilfenol foi frequentemente detectado em águas superficiais. Na literatura e nos relatórios oriundos de autoridade oficiais a concentração máxima de nonilfenol presente foi de $644 \mu\text{g L}^{-1}$ incluindo nos estudos os países Áustria, Bélgica, Espanha, Holanda e Reino Unido. A concentração mais elevada detectada foi identificada em um rio a jusante de uma planta de tratamento de esgoto e pode-se considerar que este valor não representa uma característica comum do rio, tendo em vista que os valores médios rio a montante da planta de tratamento de esgoto ficaram na faixa de $55 \mu\text{g L}^{-1}$ de nonilfenol e os valores médios encontrados na Europa são na faixa de $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$ a $3,3 \mu\text{g L}^{-1}$. Adicionalmente pode-se dizer que esta ampla diferença de valores detectados, tem relação com a capacidade de tratamento de esgoto das plantas de operação antes do descarte no rio (WENZEL; MULLER; THERNES, 2003).

A maioria dos compostos nonilfenol que se encontram nos rios estão sob a forma de metabólitos persistentes, sendo o ácido nonilfenóxi-carboxílico, o mais abundante. A distribuição entre as classes de nonilfenol presente nos rios é influenciada pelos processos físico-químicos e biológicos, bem como pela classe do composto e variações climáticas. Elevadas concentrações de metabólitos lipofílicos nos sedimentos dos rios indicam a importância dos tratamentos físico-químicos na distribuição do nonilfenol em águas naturais (DA SILVA, F. et al., 2007).

Os nonilfenóis tem grande capacidade de bioacumulação, em função de sua capacidade lipofílica, adsorve-se preferencialmente na matéria orgânica e nos sedimentos não estando disponível para degradação anaeróbica, todavia seu acúmulo nos sedimentos é de grande preocupação, pois pode facilmente se tornar disponível em águas naturais através de ressuspensão de sedimentos ou pelo baixo nível de águas ou ainda por turbilhonamentos devido ao fluxo (DA SILVA, F. et al., 2007). A Tabela 8 apresenta os dados relativos à nomenclatura química e características do 4 nonilfenol.

Tabela 8 – Nomenclatura e características do 4 nonilfenol.

Números do CAS	8458-15-3
Nomenclatura IUPAC	1-(4-hidroxyphenyl)nonane
Outros nomes	4-n-nonylphenol, 4-nonylbenzol
Peso molecular	215 a 220,4
Coeficiente de partição octanol- água (log Kow)	3,8 - 4,77
Fórmula química	C ₁₅ H ₂₄ O
Estrutura química	



Fonte: [HTTP://WWW.CHEMSPIDER.COM/CHEMICAL-STRUCTURE.1688](http://www.chemspider.com/chemical-structure.1688).

Segundo Gunther (2002, apud (WENZEL; MULLER; THERNES, 2003) os alimentos são as principais rotas de exposição humana sob condições normais. Gunther (2002) analisou vários alimentos, excluindo água, e chegou a um valor médio de ingestão de 7,7µg para um adulto e de 1,7µg para crianças, baseado em uma cesta de mercado tipicamente alemã.

Embora haja uma clara evidência da atividade estrogênica do 4 nonilfenol, particularmente durante o desenvolvimento, é difícil expressar com os dados disponíveis até o momento o que seria um nível seguro de exposição para o ser humano que não causasse consequências adversas (WENZEL; MULLER; THERNES, 2003).

2.10 Pentaclorofenol

O pentaclorofenol é usado em grande quantidade como preservativo na madeira. Este uso pode resultar em alguns derrames para o meio ambiente através da madeira e durante aplicação do mesmo. Ele também é utilizado como inseticida

para controle de cupins, desfolhante pré-colheita, herbicida geral, síntese do pentaclorofenil éster, moluscida, fungicida, bactericida, agente antimifo, microbiocida e algicida. Os materiais técnicos apontam extenso uso em torres de resfriamento de plantas elétricas, como aditivos para adesivos à base de amido e de proteínas vegetais e animais, em telhas, paredes de tijolo, blocos de concretos, compostos selantes de tubulações, soluções de fotografia, têxtil e lama de perfuração da indústria de petróleo (KEITH, 1997).

Derramamentos no solo podem diminuir em concentração devido à biodegradação e lixiviação para águas subterrâneas. Se lançados em água, o pentaclorofenol será adsorvido no sedimento, ou foto degradado em valores de pH elevados e lentamente biodegradado. A bioacumulação em peixe será moderada. No ar, o pentaclorofenol não se acumula devido sua degradação pela fotólise e reação com agente foto químico produzindo radical hidroxila. Os seres humanos podem ser expostos ocupacionalmente ao pentaclorofenol via inalação e contato dérmico primeiramente em situações onde sejam usados como preservativos ou em contatos com produtos de madeira tratada pelo pentaclorofenol. A população em geral pode ser exposta primariamente pela ingestão de alimentos contaminados com pentaclorofenol (KEITH, 1997).

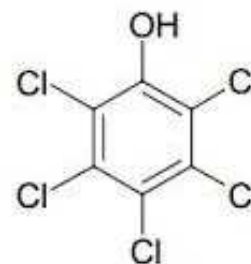
O pentaclorofenol é um dos desreguladores endócrinos citados pela EPA (ZAPATAN et al, 2012) pelo centro de prevenção e controle de doenças dos Estados Unidos, e pela Fundação World Wildlife como um potencial modificador químico endócrino. Segundo Zapatán et al (2012), este tem potencial teratogênico, carcinogênico e mutagênico, além de ser um potente desregulador endócrino impactando nas funções das glândulas adrenal, tiroide e pituitária, e também tem sido apontado como imuno supressor. A Tabela 9 apresenta os dados relativos à nomenclatura e características do pentaclorofenol

Tabela 9 – Nomenclatura e características do pentaclorofenol.

Números do CAS	87-86-5
Nomenclatura IUPAC	Pentaclorofenol
Outros nomes	Pentachlorofenate e Pentaclorofenolo
Peso molecular	266.34
Fórmula química	C ₆ Cl ₅ OH

Continuação da Tabela 9 – Nomenclatura e características do pentaclorofenol.

Estrutura química



Fonte: KEITH, 1997; [HTTP://WWW.CHEMSPIDER.COM/CHEMICAL-STRUCTURE](http://www.chemspider.com/chemical-structure). 967.

O departamento americano para controle de água para fins humanos estimou como desprezível os efeitos deletérios em humanos, quando ingerido por um período específico de tempo. Adicionalmente foi considerado que em relação ao consumo total de pentaclorofenol por um ser humano durante toda a sua vida, apenas 20% deste em média será oriundo da água (KEITH, 1997).

2.11 Situação no Brasil

As substâncias conhecidas como desreguladores endócrinos que se acumulam nos solos e nos rios em concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ ou ng L^{-1} , são objeto de estudo dos principais órgãos ambientais do mundo como a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (EPA), Organização mundial da Saúde (OMS), Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) e a Organização para a cooperação e desenvolvimento econômico (OCED), além da União Europeia (UE) (BILA, 2005). De acordo com Mello et al (2013), a Tabela 10 apresenta as faixas de concentração de cada um dos estrogênios com ação desreguladora endócrina avaliados no Brasil, onde pode-se perceber que as concentrações máximas em água bruta são maiores do que em água tratada, excetuando-se para o caso do EE2, bem como o esgoto bruto, também possui valores maiores que no seu respectivo tratado

De acordo com Mello et al (2013), os dados obtidos a partir da avaliação de 22 artigos publicados no Brasil entre os anos de 1999 a 2012 referente à presença dos estrogênios E1, E2, E3 e EE2, em água bruta, água tratada, esgoto bruto e esgoto tratado detectou-se que os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Mato

Grosso do Sul, Paraná, Ceará, Rio Grande do Sul e Minas Gerais tem realizado pesquisas na área, sendo o estado de SP o que possui maior nível de investigação. Além disso, quando se avalia as concentrações dos estrogênios estudados no Brasil em relação à faixa encontrada em outros países, no geral observa-se que as concentrações no Brasil são maiores.

Tabela 10 – Faixa de concentração em ng L^{-1} para diferentes matrizes ambientais dos estrogênios estudados.

	Estrona (E1) ng L^{-1}	17β- estradiol (E2) ng L^{-1}	Estriol (E3) ng L^{-1}	17α- etinilestradiol (EE2) ng L^{-1}
Água Bruta	0,33 – 3500	0,005 – 28600	0,1 – 1398	11,4 – 590
Água Tratada	0,07 - 1,5	0,78 – 2600	0,1 – 314	22,1 – 1900
Esgoto Bruto	16 - 4830	6,57 – 7400		5 – 5810
Esgoto Tratado	260 - 4130	60 – 5560		110 – 5040

Fonte: Adaptado de MELLO et al, 2013.

Segundo Mello et al (2013) a união europeia (diretiva 2013/39/EU) propõe limites médios anuais de água bruta para os estrogênios 17 β - estradiol e para o 17 α -etinilestradiol na faixa de 0,4 ng L^{-1} e 0,035 ng L^{-1} , que quando comparado com os valores encontrado no Brasil estes estão acima do recomendado pelo respectivo órgão.

Adicionalmente discute-se a capacidade dos laboratórios brasileiros trabalharem dentro dos limites de quantificação o que demandaria maiores investimentos tecnológicos (MELLO et al., 2013), evitando a necessidade de se realizar ajustes visando correção da área determinada pelos picos cromatográficos, ajustes dos cálculos visando minimizar o efeito de matriz das amostras, tendo em vista que muitos interferentes são extraídos juntamente com os analitos, além do fato de em muitos dos artigos os valores de quantificação dos compostos são determinado apenas como não detectado (ND), o que significa que está abaixo dos

limites de quantificação que foi possível estabelecer nos métodos (DIAS et al., 2013).

Outro aspecto que necessita ser considerado é que os valores propostos pela União Europeia para o 17 β -estradiol e para o 17 α -etinilestradiol, são normalmente valores acima do limite quantificação determinado nos artigos, o que demonstra que se estes valores fossem estabelecidos no Brasil, haveria grande dificuldade em se realizar esta determinação (MELLO et al., 2013).

Também é válido destacar que no Brasil a maior parte dos estudos está sendo realizados em água de abastecimento, e ainda há poucos dados relativos a estes compostos em corpos que recebem grandes volumes de esgotos sejam ele de origem doméstico ou industrial. A Tabela 11 mostra uma compilação de alguns estudos realizados no Brasil que foram efetuados em matrizes ambientais diversas, o que mostra uma necessidade de se ampliar os estudos deste tipo a fim de avaliar o quanto os tratamentos convencionais são capazes de remover estes compostos dos corpos hídricos.

Tabela 11 – Compilação de estudos realizados no Brasil referente à presença de estrogênios em matrizes ambientais

Local de coleta	Equipamento	Referência
Água bruta	LC-MS/MS	Gerolin, 2008
Mananciais	LC-MS	Mierzwa et al, 2009
Água tratada	LC-MS/MS	Gerolin, 2008
Água potável	GC-MS	Sodré, et al, 2010
Água Tratada	GC-MS	Ghiselli, 2007
ETE Araraquara	HPLC - FLU	Araújo, 2006
Esgoto Bruto	GC-MS/MS	Ternes et al, 1999
Água de abastecimento	HPLC – FLU/UV	Lopes, 2010
Água de abastecimento	HPLC – UV LC-MS	Guimarães, 2008
ETE	GC-MS	Bila, 2005
Água de represa	HPLC-FLU/UV	Cordeiro, 2009

Fonte: Adaptado de PEREIRA, 2011.

2.12 Cromatografia

A cromatografia é uma técnica baseada na distribuição dos analitos entre duas fases uma estacionária e outra móvel. A distribuição, exclusão, partição ou adsorção seletiva de cada componente é um processo de equilíbrio dinâmico onde as moléculas dos analitos ora estão retidas na fase estacionária ora estão deslocando-se com a fase móvel (AQUINO NETO & SOUZA NUNES, 2003).

De acordo com a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (1993, apud CIENFUEGOS & VAITSMAN, 2000), a cromatografia é um método físico de separação no qual os componentes a serem separados se distribuem entre duas fases, uma das quais estacionárias, enquanto a outra se movimenta numa direção definida (móvel). A fase estacionária pode ser um sólido, um líquido retido sobre um sólido ou um gel. A fase móvel pode ser líquida ou gasosa.

A separação entre dois ou mais componentes é resultante da diferença de suas constantes de equilíbrio de distribuição entre as duas, ou seja, quanto mais um componente é retido pela fase estacionária, mais alta é a quantidade das moléculas deste que ficaram retidas provocando um retardamento da migração destas moléculas.

Um segundo componente que seja menos retido pela fase estacionária, terá uma maior quantidade de moléculas na fase móvel em relação ao primeiro componente. Assim o conjunto das moléculas do componente que está menos fortemente preso à fase estacionária se moverá através do sistema, na direção do fluxo, a uma velocidade mais alta que o outro, fornecendo assim uma migração dos componentes em regiões separadas conhecidas como bandas cromatográficas. A esse fenômeno de migração dos analitos através do leito da fase estacionária, pela passagem da fase móvel denominamos eluição (AQUINO NETO & SOUZA NUNES, 2003).

A Tabela 12 apresenta a classificação de técnicas cromatográficas e técnicas afins e suas classificações em relação às diferentes formas.

Tabela 12 – Classificações possíveis para os processos cromatográficos e afins.

Cromatografia	Fase Móvel	Fase estacionária	Tipo
Gasosa (CG)	Gás	Líquido	Gás – líquido
		Sólido	Gás - sólido
Líquida (CL)	Líquido	Líquido	Líquido – líquido
		Sólido	Líquido - sólido
Supercrítica (CS)	Fluido supercrítico	Líquido	–
		Sólido	–

Fonte: AQUINO NETO & SOUZA NUNES, 2003.

2.13 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), conhecida originalmente como cromatografia líquida de alta pressão e que teve esta terminologia abandonada a partir do momento em que se constatou que o diferencial metodológico, não tinha relação com as pressões do sistema e sim com o melhor desempenho cromatográfico pode ter seus componentes descritos como:

Bomba cromatográfica – Dispositivo relacionado com o tempo de retenção da amostra, reprodutibilidade e a sensibilidade do detector. Consiste das bombas e controladores de pressão e vazão. Em geral pode-se dizer que deve ter a capacidade de impulsionar a fase móvel (AQUINO NETO & SOUZA NUNES, 2003). A alta pressão fornecida por estas bombas é necessária para que o fluxo possa sobrepor à resistência oferecida pelas micropartículas da fase estacionária empacotada na coluna, além de evitar a formação de bolhas no sistema, que ocorrem em função da mistura dos solventes (fase móvel). Em média a pressão de trabalho de um sistema de CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência), gira em torno de 80 a 350 atm.

O dispositivo presente na bomba responsável pela garantia de alta pressão no sistema é o cabeçote da bomba, onde se encontra as válvulas de retenção (check valves), o pistão de safira e os selos do pistão (CIENFUEGOS & VAITSMAN, 2000).

Sistema de injeção - A inserção da amostra pode ser realizada através de uma válvula de amostragem ou por meio de uma seringa de injeção. O efluente desses dispositivos preenche uma serpentina de volume conhecido (loop) e o acionamento da válvula transfere, integralmente, este volume para a corrente de fase móvel (AQUINO NETO & SOUZA NUNES, 2003).

Dentre as principais características do injetor destaca-se o fato dele não provocar alargamento da banda cromatográfica, em função da diluição da solução injetada não ser atacada pelo solvente, e apresentar reprodutibilidade e precisão quanto à quantidade de amostra injetada e operação sobre altas pressões (CIENFUEGOS & VAITSMAN, 2000).

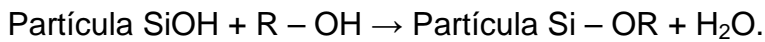
Colunas – São feitas de aço inoxidável polido, com comprimentos variando entre 10 a 30 cm. No que se refere aos diâmetros internos, tipicamente variam de ≤ 1 mm para colunas capilares; 2;3;4;5;e 6 mm para colunas analíticas recheadas e > 10 mm para colunas preparativas. Quanto aos recheios utilizados nestas colunas são basicamente constituídos por partículas pequenas, rígidas, com distribuição granulométrica variando de 1,7 a 10 micras. As colunas com partículas de baixa micragem permitem maior homogeneidade de distribuição da fase estacionária e do fluxo da fase móvel, contribuindo para maior resolução (AQUINO NETO & SOUZA NUNES, 2003).

Para os tamanhos usuais de partículas (3,5 e 10 μm) as pressões de trabalho já são elevadas, ficando na ordem de 25 a 80 bar, de modo que se reduzirmos o tamanho da partícula acrescem-se algumas limitações operacionais no sistema (AQUINO NETO & SOUZA NUNES, 2003).

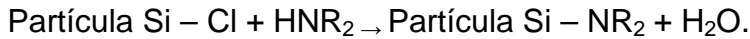
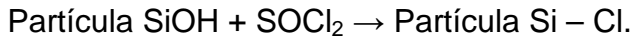
Tradicionalmente as fases estacionárias utilizadas em cromatografia líquida têm sido à base de sílica a qual separa o soluto em grande parte com base na polaridade embora, devido a sua estrutura única, a sílica gel também exibe fortes características de exclusão. A fase ligada foi introduzida para prover um material que separaria o soluto por interações dispersivas e também para prover alguma semi polaridade a fase estacionária. A fase ligada também é de base sílica gel. Em outros trabalhos as fases estacionárias poliméricas foram introduzidas para viabilizar trabalhos com materiais insolúveis em água e também para trabalhos em amplas faixas de PH (SCOTT, 2003).

As ligações dos grupos funcionais à sílica gel são basicamente de quatro tipos:

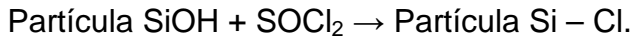
1 – Éster (Si - OR)



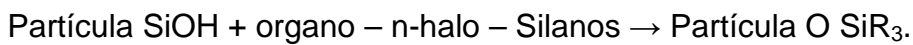
2 – Amino (Si - NR₂)



3 – Carbono (Si - CR₃)



4 – Siloxano (Si - O - SiR₃)

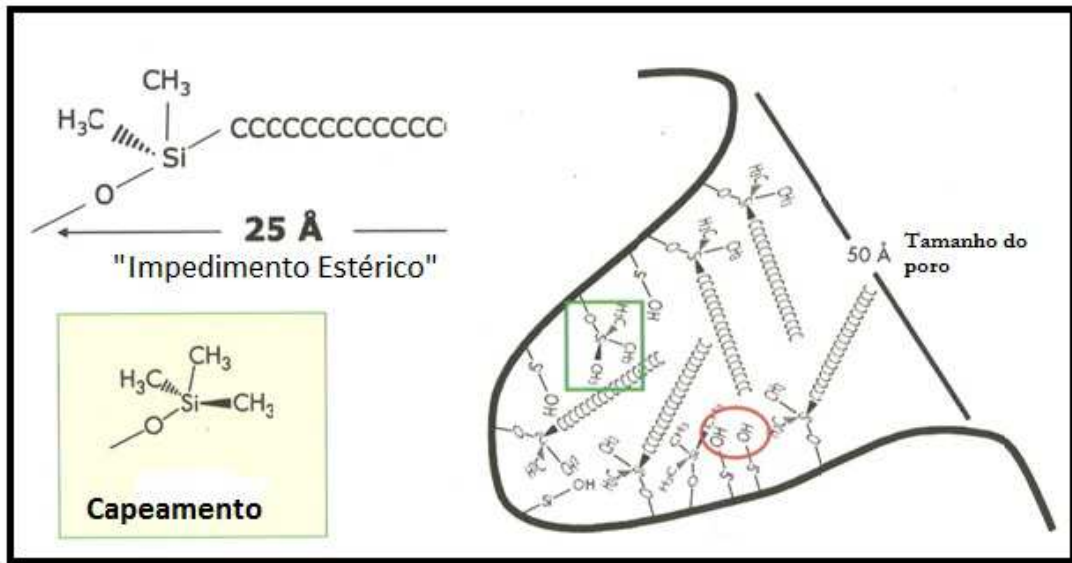


O tipo siloxano é o mais utilizado em praticamente todos os recheios à base de sílica. A reação que ocorre é conhecida como silanização (CIENFUEGOS & VAITSMAN, 2000).

Na cromatografia de fase reversa, onde a fase móvel é mais polar que a fase estacionária, os grupos silanos (-SiOH), que não chegaram a silanizar-se, podem promover outros mecanismos de retenção, causando desta forma assimetria nos picos além da redução da vida útil da coluna.

Com intuito de redução deste tipo de efeito faz-se um processo nas colunas conhecido com end-capping, que consiste na complementação da primeira silanização com moléculas maiores (dando origem aos recheios C18 e C8), com uma segunda silanização com moléculas menores como trimetilclorosila, tornando as colunas mais eficientes que suas similares que não foram submetidas a este tratamento (CIENFUEGOS & VAITSMAN, 2000). A Figura 2 mostra como ocorre à ligação química nos processos de capeamento de colunas cromatográficas visando eliminação dos sítios de silanóis livres.

Figura 2: End capping de colunas.



Fonte: [HTTP://WWW.WATERS.COM](http://www.waters.com)

Detetores – é parte do cromatógrafo líquido que recebe e fornece o sinal relativo à quantidade do componente de interesse presente no eluente. Basicamente deve apresentar como característica: Alta sensibilidade, baixo ruído, resposta linear a grande número de solutos, não sofrer interferência de temperatura da fase móvel, boa velocidade de resposta e preferencialmente não ser destrutivo em relação à amostra. Em relação aos tipos de detetores, podemos mencionar como os principais sendo: Uv – Visível, fotodiodos, fluorescência, índice de refração, condutividade elétrica, eletroquímico, amperométrico e espalhamento de luz (CIENFUEGOS & VAITSMAN, 2000).

Para a detecção dos compostos de interesse do projeto em questão foi utilizado o sistema de detecção de fluorescência, que tem seu princípio de funcionamento descrito abaixo:

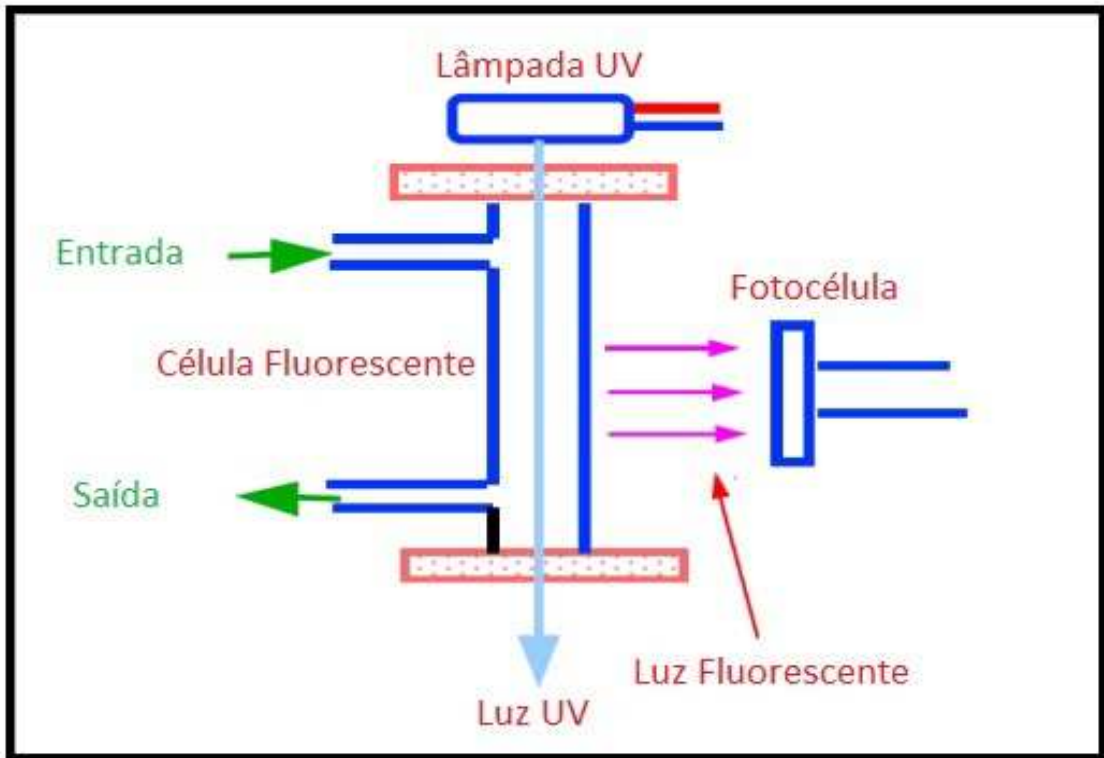
Detector de fluorescência – O detector de fluorescência é um dos mais sensíveis detetores da cromatografia líquida e por este motivo é muito usado para análise de traços. Todavia apesar de ser um dos mais sensíveis sua resposta é linear apenas em uma determinada faixa de concentração. De fato sua linearidade pode ser considerada em duas ordens de magnitude. Infelizmente a maioria das substâncias não fluoresce naturalmente, o que é uma grande desvantagem para este tipo de detector. O que ocorre é que em muitos dos casos é necessário realizar uma derivatização para tornar a substância de interesse mais facilmente

detectável. Atualmente, há um grande número de reagentes desenvolvidos para realizar este tipo de reação (SCOTT, 2003).

Explicando de maneira simples o funcionamento deste detector podemos dizer que uma luz UV de comprimento de onda fixo, passa através da célula onde o eluente da coluna flui e age como uma fonte de excitação. Qualquer luz fluorescente que seja emitida é percebida pela fotocélula elétrica posicionada diretamente no sentido da excitação da luz UV. A fotocélula capta a luz fluorescente de todos os comprimentos de onda, mas o comprimento de onda de excitação, só pode ser alterado pelo uso de uma lâmpada alternativa (SCOTT, 2003).

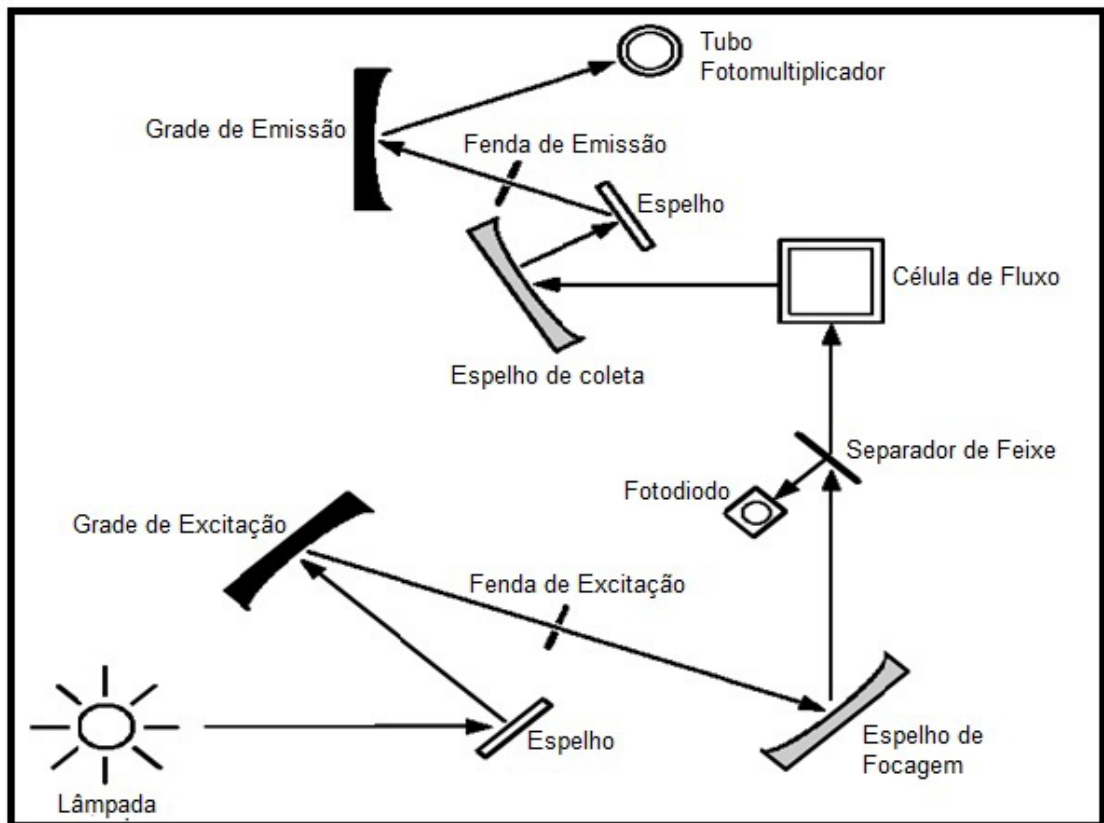
Atualmente há um tipo de detector de fluorescência que se utiliza de um monocromador para selecionar o comprimento de onda de excitação, e um segundo monocromador para selecionar o comprimento de onda da luz fluorescente. Este instrumento produz uma maior versatilidade e sensibilidade para qualquer tipo de soluto. Além disso, o sistema pode prover um espectro de fluorescência detendo o fluxo de fase móvel, quando o soluto fica na célula de detecção e é escaneado pela luz fluorescente (SCOTT, 2003). A Figura 3 e a Figura 4 mostram respectivamente o esquema de funcionamento de um detector de fluorescência, bem como o funcionamento do sistema ótico onde se dá propriamente a detecção.

Figura 3: Esquema simplificado de detector de fluorescência



Fonte: SCOTT, 2003

Figura 4: Sistema óptico do detector de fluorescência.



Fonte: [HTTP://WWW.WATERS.COM](http://www.waters.com)

2.14 Extração em Fase Sólida

A extração em fase sólida é uma técnica de preparação de amostra que utiliza partícula sólida, material cromatográfico empacotado, usualmente contido em um cartucho, para separar quimicamente diferentes componentes de uma amostra. As amostras encontram-se quase sempre no estado líquido (embora em aplicações especiais possa ser utilizado para correr amostras em fase gasosa) (ARSENAULT, 2012).

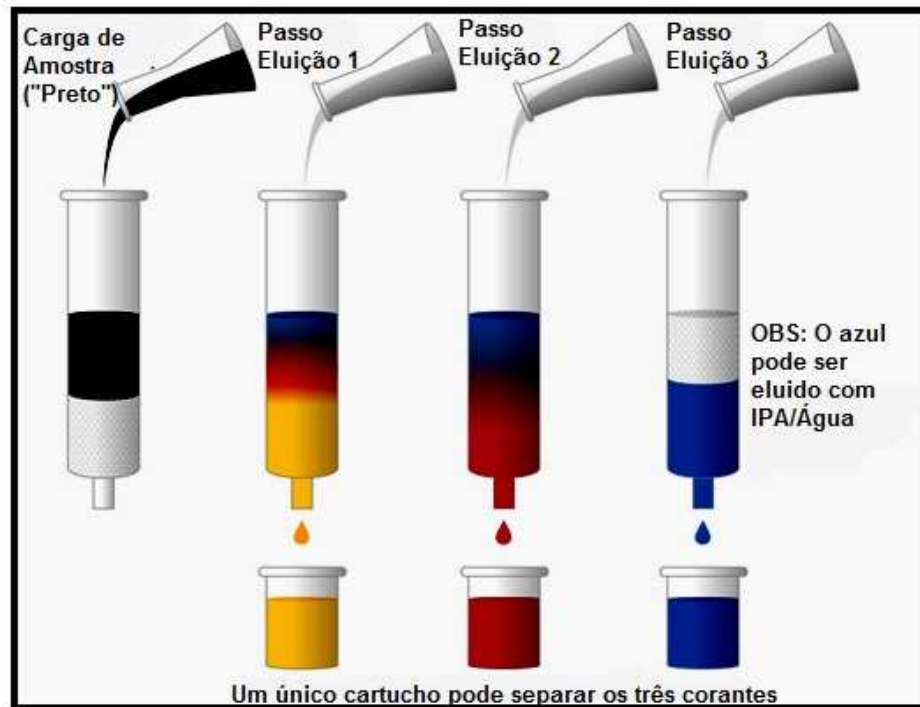
O leito cromatográfico do cartucho de extração em fase sólida (SPE) pode ser utilizado para separação dos diferentes compostos de uma amostra, a fim de tornar um teste analítico subsequente mais eficiente. Por exemplo, SPE é usualmente utilizado para remoção seletiva de interferentes (ARSENAULT, 2012).

O nome correto da técnica é extração em fase líquida – sólido, desde que as partículas cromatográficas sejam sólidas e que a amostra se encontrem no estado líquido. O mesmo princípio básico de cromatografia, utilizado na cromatografia líquida, é aplicável à extração em fase sólida, todavia em um formato diferente e para diferentes fins. Na extração em fase sólida a cromatografia é utilizada para se obter um melhor preparo da amostra antes de submetê-la a um teste analítico (ARSENAULT, 2012).

Na etapa de preparação de amostras, estas podem vir de várias fontes. Elas podem ser originadas de fluidos biológicos, como o plasma, saliva ou urina; amostras ambientais como água, ar e solo; produtos alimentícios como grãos, carne e frutos do mar; farmacêuticos, nutracêuticos; bebidas; ou produtos industriais (ARSENAULT, 2012).

Podemos citar como quatro, os principais benefícios do uso da técnica de SPE: simplificação de amostras de matrizes complexas juntamente com o composto de purificação, redução da supressão do íon ou aprimoramento nas aplicações de espectrometria de massas, possibilidade de fracionar as amostras para analisar os compostos de acordo com suas classes e aprimoramento analítico na detecção de amostras com concentração de traços, ou compostos em níveis muito baixos (ARSENAULT, 2012). A Figura 5 mostra como ocorre a separação no interior dos cartuchos de SPE em suas respectivas etapas.

Figura 5: Separação de uma mistura de três corantes através da técnica de preparação da amostra por extração em fase sólida.



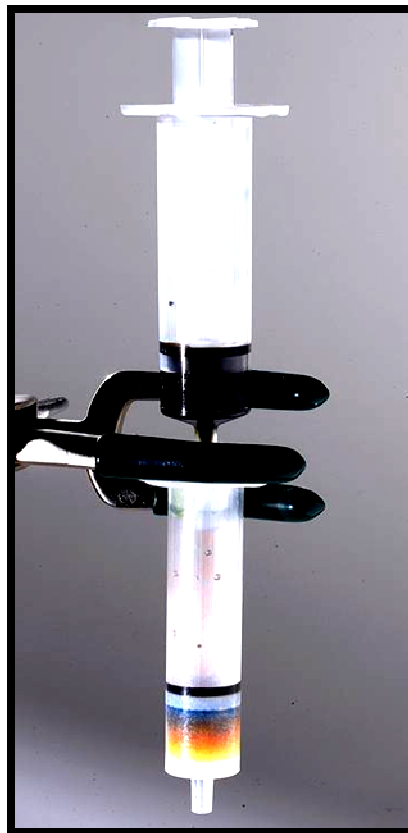
Fonte: ARSENAULT, 2012

Conforme demonstrado na Figura 5 o leito cromatográfico de um cartucho SPE pode executar as quatro funções principais: simplificação da amostra, redução do efeito matriz, fracionamento e concentração de traços de analitos (ARSENAULT, 2012).

Quando o objetivo principal é a concentração de analitos, e grandes volumes de amostras são passados através do leito cromatográfico, é preciso cuidar para que não haja perda de analitos por eluição ou saturação do leito. Esse problema pode ocorrer quando o analito elui, mesmo que de modo ineficiente, pela passagem da própria amostra, sendo o volume dessa muito elevada. Outra situação usual é a introdução do excesso de analito promovendo a saturação da capacidade de sorção da fase sólida, o que acarreta na perda de analitos pela passagem da amostra. Esse caso é chamado de perda por saturação. É usual nesses casos a utilização de leitos em série, de modo que a presença do analito no segundo leito indica uma retenção ineficiente, e a necessidade da realização de um dimensionamento mais adequado (AQUINO NETO E SOUZA NUNES, 2003).

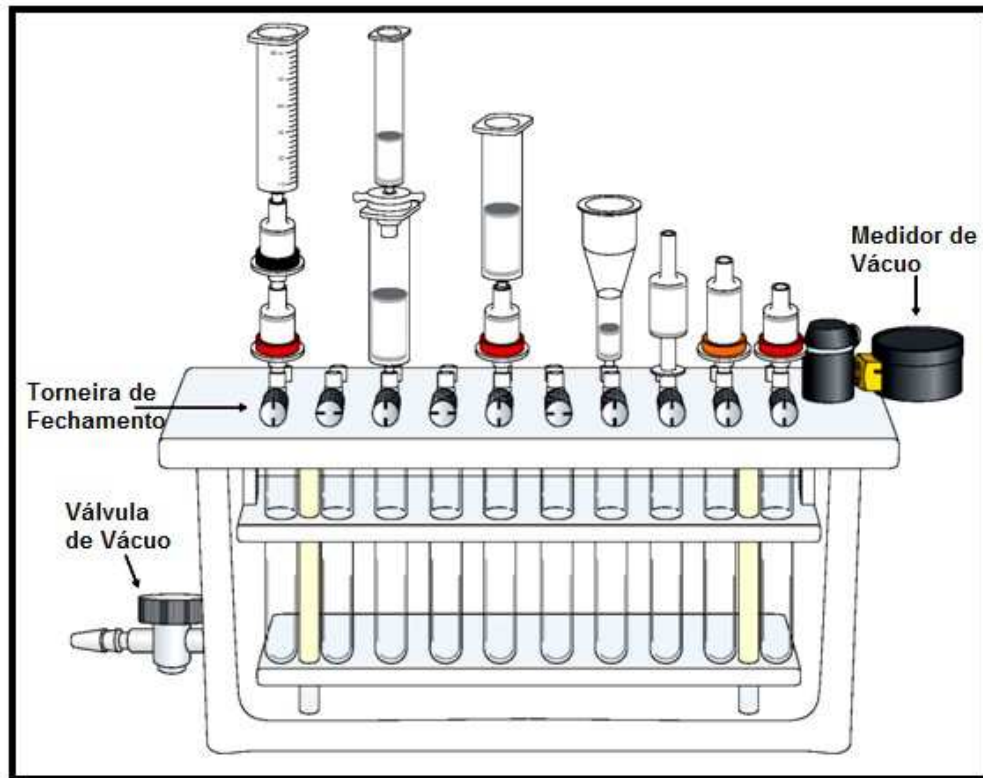
SPE Fase Reversa - O termo fase reversa descreve o modo cromatográfico oposto à fase normal, ou seja, o uso de fase móvel polar e fase estacionária apolar. Atualmente em função de ser mais reprodutível e ter uma aplicação mais ampla o SPE em fase reversa representa mais de 60% das aplicações relacionadas a extração em fase sólida. Grande parte destes protocolos usa fase móvel compreendida de uma mistura de água com um solvente orgânico polar miscível, como acetonitrila ou metanol. Isto permite assegurar a interação apropriada do analito com a superfície hidrofóbica da partícula apolar. Uma sílica com ligação C18 é o tipo de recheio mais popular usado como leito para cromatografia de fase reversa (ARSENAULT, 2012). As Figuras 6 e 7 mostram o processo de extração por SPE, controlados manualmente através de seringa, quando não se possui um grande número de amostras, ou por auxílio de um sistema de manifold visando à automação do processo.

Figura 6: Esquema de funcionamento de extrator em fase sólida manual.



Fonte: ARSENAULT, 2012

Figura 7: Esquema de funcionamento de extrator em fase sólida automatizado.

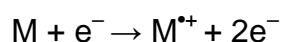


Fonte: ARSENAULT, 2012

2.15 Espectrometria de Massas

A ideia geral da espectrometria de massas consiste no fato de que um composto é ionizado, através de um método de ionização, e seus íons são separados na base da razão massa/carga, e o número de íons que correspondem a cada unidade de massa/carga é registrado na forma de um espectro (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

O primeiro passo na análise de compostos por espectrometria de massas é a produção de íons em fase gasosa, como por exemplo, pela ionização de elétrons (HOFFMANN, 2007)

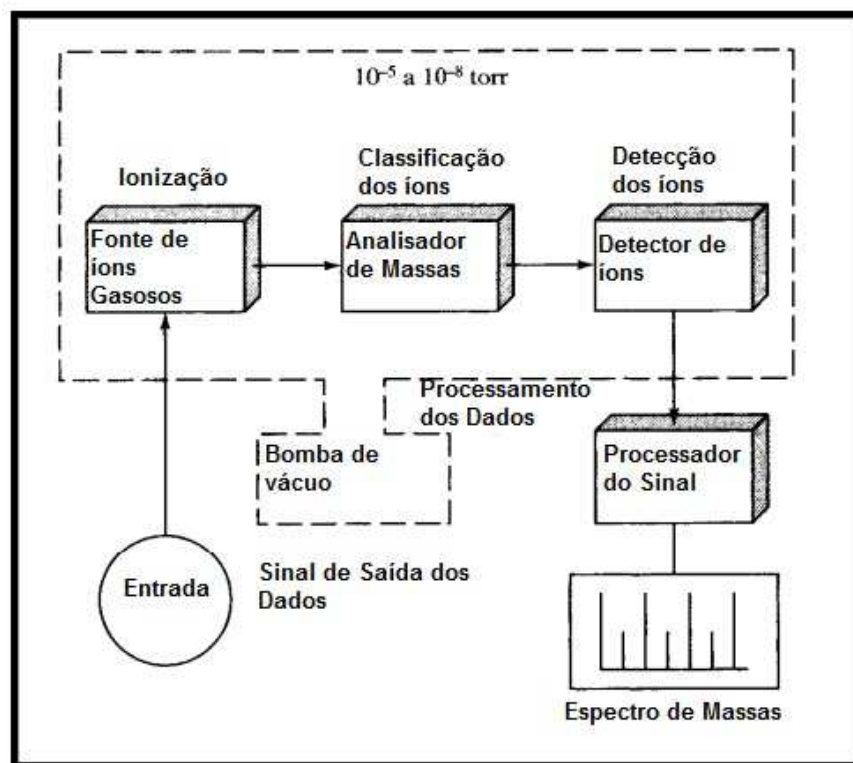


O acoplamento de um espectrômetro de massas a algum tipo de instrumento cromatográfico como um cromatógrafo a gás ou um cromatógrafo líquido é comum. Os espectrômetros de massas são muito utilizados nas análises de compostos cujo

espectro de massas é conhecido e na análise de compostos de estruturas completamente desconhecidas (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

Basicamente um espectrômetro de massas contém sempre na sua configuração os seguintes itens: cromatógrafo, ou fonte de introdução direta da amostra; fonte de ionização para produzir os íons da amostra; um ou alguns analisadores de massas para separar os vários íons; detector para contar os íons emergentes do último analisador; e o sistema de processamento de dados que produz o espectro de massa em formato adequado a interpretação (HOFFMANN, 2007). A Figura 8 apresenta basicamente um diagrama geral de um espectrômetro de massas com seus principais componentes operacionais.

Figura 8: Diagrama básico de espectrômetro de massas.



Fonte: SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2001.

Fontes de ionização - Na fonte de ionização, as amostras analisadas são previamente ionizadas para serem analisadas no espectrômetro de massas. Uma variedade de técnicas de ionização é utilizada nos espectrômetros de massas. Todavia o mais importante aspecto a ser levado em consideração é a energia interna transferida durante o processo de ionização e a propriedade físico química

do analito que pode ser ionizado. Algumas técnicas de ionização são muito energéticas e podem causar fragmentação excessiva. Outras técnicas são suaves demais e só produzem íons da espécie molecular. Ionizações por impacto de elétrons, ionização química são adequados somente para ionização em fase gás e assim seu uso é limitado para compostos que seja voláteis e estáveis termicamente. Entretanto, um amplo grupo de compostos é termicamente lábil ou não tem vapor de pressão suficiente. Moléculas destes grupos de compostos precisam ser extraídas diretamente do condensado para fase gasosa (HOFFMANN, 2007).

Estas fontes de ionização diretas são de dois tipos: fase – líquido e estado – sólido. Na fonte de fase – líquido o analito está em solução. A solução é introduzida por nebulização, como gotículas na fonte onde íons são produzidos a pressão atmosférica é focalizado para o espectrômetro de massas através de alguns estágios de bombeamento de vácuo. Eletrospray (ESI), Ionização química a pressão atmosférica (APCI) e fotoionização a pressão atmosférica (APPI) são as fontes que correspondem a este tipo (HOFFMANN, 2007). Nas fontes de estado – sólido, o analito é um depósito não volátil. Este é obtido por vários métodos de preparo da amostra os quais frequentemente envolvem a introdução da matriz que pode ser também um sólido ou um fluido viscoso. Este depósito é irradiado por partículas energéticas ou fótons que de sorvem íons próximo à superfície do depósito. Estes íons podem ser extraídos por campo elétrico e focalizados diretamente para o analisador. Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (Maldi), ionização por dessorção de campo, dessorção por plasma são todas formas de utilizar esta estratégia para produção do íon. Bombardeio por átomo rápido utiliza um líquido não volátil como matriz (HOFFMANN, 2007).

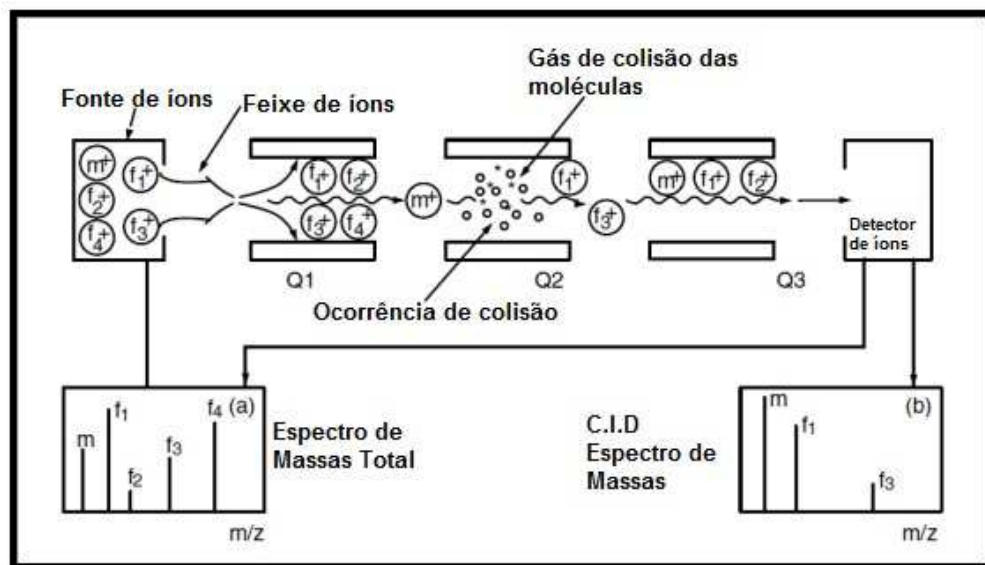
Estas fontes de ionização produzem o íon principalmente através da ionização da molécula neutra em fase gasosa pela ejeção do elétron, captura do elétron, protonação, desprotonação, formação de aduto ou pela transferência de espécies carregada da fase condensada para fase gasosa (HOFFMANN, 2007).

Analizador de Massas - Há uma variedade de analisadores de massas que tem por sua principal função separar a mistura de íons formados durante a etapa de ionização. Dentre os diferentes tipos podemos citar: espectrômetros de massas de setor magnético, espectrômetros de massas de quadrupolo, espectrômetros de massas por captura de íons (Ion-Trap), espectrômetros de massas por transformação de Fourier e espectrômetros de massas por tempo de voo (TOF).

Adicionalmente sabe-se que estes podem ser encontrados na configuração em sequência ou MS-MS que na prática ajuda muito na identificação de compostos conhecidos e desconhecidos através da seleção de um íon para fragmentação, dando origem aos íons filhos que fornecem uma evidência inequívoca da presença de compostos conhecidos ou desconhecidos. No caso de compostos desconhecidos estes íons filhos permitem a obtenção de muitas informações estruturais (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

Os espectrômetros de massas tipo Tandem Quadrupolo, também conhecidos como triplo quadrupolos são um exemplo de configuração de MS-MS. Eles consistem de dois analisadores quadrupolo (Q) utilizado em série, com uma câmara de fragmentação de íons entre eles. Funcionam basicamente como se fossem filtros de massa que permitem apenas que os valores de massas definidos entrem no primeiro quadrupolo a fim de serem monitorados. O uso destes analisadores em conjunto permite-se analisar os fragmentos gerados na câmara de colisão oriundo dos íons selecionados previamente no primeiro quadrupolo. (WILLOUGHBY; SHEEHAN; MITROVICH, 2002). A Figura 9 mostra o funcionamento básico de um tandem quadrupolo desde a fonte de ionização até a formação do espectro de massas.

Figura 9: Diagrama geral de espectrômetro de massas tipo tandem quadrupolo.



Fonte: HERBERT & JOHNSTONE, 2003.

Os analisadores quadrupolo são os mais comuns e versáteis de todos os analisadores de massas. Os quadrupolos têm um longo registro de aplicações e uma extensa história de uso com bibliotecas de espectro de massas. Eles são particularmente bem adequados para aplicações de alta produtividade onde amostras sujas e com grandes efeitos de matriz podem afetar na qualidade e produtividade dos resultados (WILLOUGHBY; SHEEHAN; MITROVICH, 2002).

2.16 Métodos para determinação de desreguladores endócrinos

Atualmente há um grande número de técnicas analíticas e combinações destas visando a determinar a presença dos compostos desreguladores no meio ambiente. Estas determinações podem ser realizadas *in vitro* (*ensaio de ligação competitiva estrogênica, técnicas de proliferação celular*), *in vivo* (*ensaio uterotrófico, ensaio de peixe vitelogenina*), testes Screening (Tier I, Tier II, Tier III e Tier IV) e testes químicos (Cromatografia líquida, Cromatografia Gasosa e MS-MS) (KHETAN, 2014).

O uso de testes químicos permite o monitoramento dos compostos desreguladores endócrinos diretamente no meio ambiente, ou seja: água, ar, solo e sedimentos. Entretanto a determinação da concentração de compostos na ordem de 1 ng L^{-1} ou abaixo, em matrizes de amostras complexas, como água de despejos domésticos e industriais os quais contém um grande número de compostos que podem interferir nas análises, torna as mesmas um grande desafio (CHEN et al., 2007). O cuidado começa na amostragem do material a ser analisado e talvez ainda mais subdividido, na extração e no estágio de preparo de amostra, que inclui a limpeza da amostra, e para alguns casos, a derivatização, concentração, identificação e finalmente a quantificação propriamente (CHEN et al., 2007).

O método predominante para quantificação para compostos estrogênicos tem sido a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida (HPLC), todavia a técnica de GC é limitada ao uso de compostos voláteis e termicamente estáveis, embora seja possível transpor esta limitação através do uso de derivatização antes da análise (BIRKETT & LESTER, 2003).

A escolha do detector tanto no caso do GC quanto do HPLC dependerá dos compostos a serem determinados, todavia em função da baixa concentração

envolvida, geralmente utiliza-se para GC, detectores sensíveis como captura de elétrons (ECD) fotômetro de chama (FPD) e ionização de chama (FID). No caso do HPLC algumas questões adicionais são avaliadas, como a presença de grupos cromóforos, ou a possibilidade de inclusão destes via derivatização, o que possibilitaria o uso de detectores UV. Embora, são mais comumente utilizados os detectores de fluorescência, devido sua maior sensibilidade. Entretanto, a detecção por espectrometria de massas (MS) é atualmente a forma de detecção mais utilizada, tanto para GC, como para HPLC, particularmente a técnica de tandem MS-MS, fornece a maior sensibilidade e especificidade (BIRKETT & LESTER, 2003).

As metodologias de GC e HPLC são adequadas para a determinação de grande parte dos desreguladores endócrinos, todavia é importante lembrar que elas são a etapa final de uma extensa e complexa análise química a qual envolve extração de compostos de interesse de fases sólidas e líquidas através de solvente orgânico, seguido de concentração e limpeza da amostra (que tem por função remover compostos que podem interferir na seletividade e quantificação). A Tabela 13 mostra uma seleção de métodos que foram utilizados para determinação de desreguladores endócrinos em amostras oriundas de fonte ambientais diversas.

Tabela 13 – Seleção de métodos para análise de desreguladores endócrinos em amostras de origem ambiental diversas.

Amostra	Compostos	Volume	Extração	Separação	Deteção	LOD (ng L⁻¹)	Referência
Afluente e Efluente	E2, EE2	300 ml – 2L	SPE (C18)	GC	MS e MS-MS	0,1	Huang e Sedlak, 2001 - USA
Efluente	E1,E2,E3,EE2	2,5 L	SPE (C18) em seguida PFBCI	GC	CI -MS	0,2	Xiao et al, 2001 - Inglaterra
Efluente	E1,E2,E3, EE2	200 ml	SPE (C18/PLRPS)	RP -HPLC	DAD-MS	2-500	Lopes de Alda e Barcelo -2004- Espanha
Afluente e Efluente	E1,E2,E3, EE2	150 ml afluente e 400ml efluente	SPE (Carbograph 4)	HPLC	MS-MS	0,08-0,9	Baronti et al, 2000 – Reino Unido
Afluente e Efluente	E1, E2, E3, EE2	1 L	SPE (Envi-Carb)	RP - HPLC	MS-MS	0,5 – 1,0	Lagana et al, 2004 - Itália
Efluente	E1,E2,EE2	2,5L	SPE (C18) Terc-butil-dmteilsilano	GC	MS-MS	1,0	Kelly, 2000 – Reino Unido
Afluente e Efluente	E1,E2,E3,EE2	0,5 – 1L	SPE (Carbograph 4)	HPLC	MS-MS	0,2-0,5	Johnson et al, 2004 – Reino Unido

Continuação da Tabela 13 – Seleção de métodos para análise de desreguladores endócrinos em amostras de origem ambiental diversas.

Água de Represa	E2, EE2	100 ml	SPE (C18)	HPLC	FLU - DAD	25-100	Cordeiro, 2009 Brasil
Água potável	E1, E2	200ml	SPE (C18)	HPLC	FLU MS-MS	900	Pereira, 2011 - Brasil
Afluente, Efluente e água de superfície	E1,E2,E3,EE2	1 L	SPE (DVB)	HPLC	FLU -UV	ND	Levi et al, 2003 - França
Água de rio	E1,E2,E3,EE2	1 L	SPE (C18)	HPLC	MS-MS	0,78 – 7,65	Chen et al, 2007 - Taiwan
Efluente	Octilfenol nonilfenol	5 L	SPE (SDB- XC)	HPLC	FLU	ND	Snyder et al, 1999- USA
Lodo	Nonilfenol	10ml	Vapor	HPLC	UV	ND	Sweetman, 1994 – Inglaterra
Água de rio	E1,E2,E3,EE2	4 L	SPE (C18)	HPLC	UV	3 - 13	Escandar et al, 2014 - Argentina

Fonte: Adaptado de BIRKETT & LESTER, 2003; CHEN ET AL., 2007; PEREIRA, 2011; CORDEIRO, 2009; JOHNSON et al., 2004; LEVI et al.,2003; ESCANDAR et al., 2014.

Hoje há uma necessidade de se desenvolver métodos mais simples para detecção dos desreguladores endócrinos, adicione-se a esta necessidade o fato de que todos os estudos realizados para fins de segurança ou regulamentar devam ser feitos de acordo como o melhor conhecimento técnico e de acordo com as diretrizes vigente, a fim de que os custos com a realização de novos estudos nesta área sejam mantidos baixos. De acordo com Neale e Ishikawa (2014) as alterações na legislação europeia criaram um impedimento à comercialização de substâncias que podem provocar um efeito de desregulador endócrino causando resultados adversos a seres humanos e a vida selvagem. Estas substâncias também estão sujeitas a autorização prévia no regulamento REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restrictions of Chemicals, 1907/2006), todavia até o momento não há nenhuma orientação sobre como identificar e avaliar a atividade endócrina e desreguladora (EUROPEAN COMMISSION, 2011).

Em dezembro de 1999, a Comissão Europeia (CE) adotou uma comunicação ao conselho e ao parlamento Europeu relativo a uma estratégia frente ao desafio dos desreguladores endócrinos. Em 26 de outubro de 2000 o parlamento europeu aprovou uma resolução sobre desreguladores, pedindo que fossem identificadas as substâncias de ação imediata. A Comissão Europeia ainda criou um banco de dados de substâncias para avaliação futura (EUROPEAN COMMISSION, 2011).

Um relatório publicado em 2012 pela C.E. concluiu que apesar do desenvolvimento de métodos de ensaio para identificação de desreguladores endócrinos serem úteis, este é capaz apenas de captar uma gama limitada do espectro conhecido de efeitos de desregulação endócrina, e ainda afirmam que há lacunas consideráveis sobre a identificação destes compostos que podem vir a afetar a taxa de vida selvagem (NEALE & ISHIKAWA, 2014).

Há diversos estudos sendo realizados *in vitro* e *in vivo*, todavia uma vez que faltam métodos de ensaios aprovados e validados, para todos os efeitos de desregulação endócrina, alguns estudos científicos que poderiam ser desenvolvidos em teste estão faltando. Isto gera uma incerteza considerável, podendo levar a negligenciarmos alguns efeitos nocivos a animais e seres humanos (NEALE & ISHIKAWA, 2014).

De acordo com Neale & Ishikawa (2014), até que haja novos testes, teremos que lidar com enormes lacunas de conhecimento que precisam ser abordadas por meio de novos projetos de pesquisa e desenvolvimento.

2.17 Validação de metodologia para análises cromatográficas e espectrométricas.

A validação é um procedimento visando à verificação dos parâmetros relativos à linearidade, limite de detecção e limite de quantificação para os métodos analíticos de HPLC/FLU e Espectrometria de Massas.

Os testes relativos a validação podem variar em função do órgão que regula a análise, todavia em geral estes são:

Linearidade – A determinação da linearidade pode ocorrer a partir da relação matemática entre o sinal medido e a concentração da massa da espécie de interesse, esta se dá pela equação da reta $Y = ax + b$, denominada curva analítica, onde os coeficientes a e b da curva analítica podem ser determinados através de um conjunto de medições experimentais usando o método matemático conhecido como regressão linear. Adicionalmente calcula-se o coeficiente de correlação r ou o coeficiente de determinação r^2 que são valores que se permitem obter uma estimativa da qualidade da curva obtida, tendo em vista que quanto mais próximos de 1,0 menos a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (DE ARAGÃO; VELOSO; DE ANDRADE, 2009).

Limite de detecção – O limite de detecção é importante, principalmente quando se trabalha com detecção de traços, pois ele indica qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método. Sua importância refere-se ao fato de que a probabilidade de uma detecção não é alterada repentinamente de zero para um quando seu limiar é ultrapassado. O limite de detecção de um procedimento analítico pode variar em função da amostra, contudo é fundamental assegurar-se que todas as etapas de processamento do método analítico sejam incluídas na determinação desse limite de detecção (INMETRO, 2010). Visando a validação de um método analítico, em geral é suficiente informar o nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco/ruído. Esta pode ser expressa em função de que o valor do limite de detecção deve ser de 2 a 3 vezes maior que a amplitude do ruído.

Limite de quantificação – Em geral este corresponde ao padrão de calibração de menor concentração. Este após ser determinado deve ser testado em amostras

independentes, para averiguar se a tendência e precisão conseguidas são satisfatórias (INMETRO, 2010). Em geral considera-se como o limite de quantificação das amostras de no mínimo cinco vezes o valor da amplitude do ruído. Todavia visando análise de traços deve-se adotar como o limite de quantificação a concentração mais baixa da curva analítica (INMETRO, 2010).

Seletividade – A matriz da amostra pode conter vários componentes que interferem no desempenho da medição. Estes interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a amplitude deste efeito pode ser alterado em função da concentração.

Ensaio para avaliação da seletividade relativos à validação de métodos analíticos envolvem experimentos com padrões ou materiais de referência, amostras com ou sem o analito, e também avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes (INMETRO, 2010). A avaliação da seletividade pode ser realizada conforme a Tabela 14.

Tabela 14 – Roteiro a ser seguido visando avaliação de seletividade durante procedimento cromatográfico

Procedimento	Demonstrar	Comentários
Fazer a análise com a amostra e materiais de referência pelo método em estudo e outros métodos validados.	Habilidade do método em identificar e dosar o analito na presença de interferentes.	Evidências necessárias para dar suporte e gerar confiabilidade suficiente.
Analisar amostras contendo vários interferentes suspeitos na presença do analito de interesse.	Efeito de interferentes – a presença de interferente acentua ou inibe a detecção ou quantificação do analito de interesse.	Se alteram resultados, aperfeiçoar o método ou selecionar outro mais adequado

Fonte: INMETRO, 2010.

2.18 Área de Estudo

Em 2010 foi inaugurada pela prefeitura do Rio de Janeiro a Unidade de Tratamento de Rio do canal do Arroio Fundo (UTR Arroio Fundo) com o objetivo de

melhorar a qualidade das águas da Bacia de Jacarepaguá, tendo em vista o fato de que o Rio do Arroio Fundo é justamente um dos cinco rios que desembocam nesta bacia, este faz parte do programa de recuperação para os jogos olímpicos de 2016 (www.cidadeolimpica.com.br/noticias/meio-ambiente-rios-e-lagoas-mais-limpos-para-as-olimpiadas-de-2016).

Uma das principais diferenças deste tipo de tratamento é que neste processo você não consegue controlar a vazão como no caso de uma estação de tratamento de efluente convencional, ou seja, na UTR o tratamento dá-se diretamente na calha do rio, desta forma devem-se levar em conta as variabilidades as quais este se encontra suscetível, como regime de chuvas e variação da taxa de lançamento de esgotos.

A bacia hidrográfica de Jacarepaguá abrange uma região de 118 km² abrangendo vários bairros da região de Jacarepaguá como Cidade de Deus, Freguesia, Gardênia Azul e outros.

O rio Arroio Fundo, onde fica localizado a estação de tratamento do rio Arroio Fundo, tem uma extensão aproximada de 3,7 km e tem sua origem no rio Grande que nasce no maciço da Pedra Branca. O rio Arroio Fundo possui uma vazão máxima observada de 2.917,32 m³ min⁻¹ e 4.419,7 kg min⁻¹ de sedimentos, e a quantidade de esgoto lançado neste rio é um dos principais problemas que torna este rio com aspecto de água escura e um odor extremamente forte e desagradável. Soma-se a isto a quantidade de lixo como sacos plásticos e politereftalato de etileno (PET). Adicionalmente podemos citar o fato de ter sido encontrado em seus sedimentos consideráveis quantidades de chumbo, cobre e zinco, provavelmente oriunda de contaminação das indústrias que se localizam na bacia de Jacarepaguá e despejam seus efluentes na mesma (<http://www0.rio.rj.gov.br/smac>). A Tabela 15 mostra a estimativa de carga orgânica doméstica proveniente da baixada de Jacarepaguá, considerando-se os efluentes sanitários das populações não atendidas por rede de esgotamento, são lançados diretamente nos corpos hídricos da região e a Tabela 16 mostras as coordenadas dos pontos de amostragem no canal do Arroio Fundo.

Tabela 15 – Estimativa de carga orgânica de origem doméstica em diferentes rios da cidade do Rio de Janeiro.

SUB-BACIAS	ESGOTAMENTO SANITÁRIO (% atendimento médio)	ESTIMATIVA DE CARGA ORGÂNICA* (kg DBO/dia)
Rio Cachoeira e Itanhangá	26,3%	377
Rio Grumari	0,0%	5
Zona dos Canais	8,5%	690
Rio Grande/Arroio Fundo	81,7%	2282
Rio Camorim	2,4%	583
Rio Guerengê	62,3%	1099
Rio dos Passsarinhos / Pavuninha	62,3%	243
Rio Anil	73,0%	895
Rio das Pedras	64,8%	501
Rio Muzema	26,3%	77
Rio da Barra	23,3%	115
Unidade Especial de Restinga	60,2%	1580
Total	—	8447
Total sem abatimento		26861

* Considerando o índice de 54g DBO/hab-dia

Fonte: [HTTP://WWW0.RIO.RJ.GOV.BR/SMAC](http://www0.rio.rj.gov.br/smac), para os dados de atendimento médio.

Tabela 16 – Coordenadas geográficas dos pontos de coleta das amostras no rio Arroio Fundo.

Pontos de Amostragem	Latitude	Longitude
FN 090	22°57'16.84"S	43°21'27.51"O
FN 0100	22°57'25.91"S	43°21'25.71"O

Em função dos fatores relativos à taxa de lançamento no rio do Arroio Fundo, bem como da instalação da UTR, visando a melhoria da qualidade da água na bacia de Jacarepaguá, torna-se importante o monitoramento, do rio Arroio Fundo quanto a presença de hormônios estrogênicos, inclusive visando avaliar o quanto o fato da presença de uma UTR é capaz de minimizar a concentração dos mesmos em função do tratamento realizado.

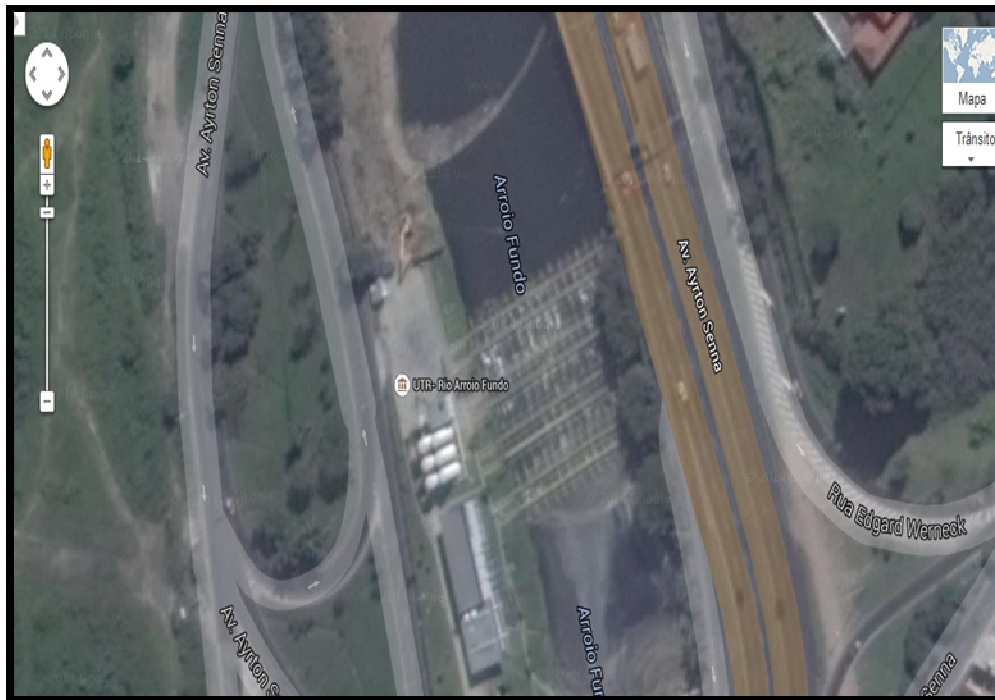
As Figuras 10 e 11 mostram a vista aérea do Rio Arroio Funda e da UTR Arroio Fundo onde foram coletadas as amostras sendo o ponto FN090 antes da passagem pela UTR e o ponto FN0100 após a UTR.

Figura 10: Vista aérea do rio Arroio Fundo e da estação de tratamento do rio.



Fonte: [HTTP://WWW.BIOLOGO.COM.BR](http://www.biologo.com.br).

Figura 11: Foto do satélite do rio Arroio Fundo local da UTR.



Fonte: [HTTP://WWW.GOOGLE.COM.BR/MAPS](http://www.google.com.br/maps).

3 METODOLOGIA

3.1 Amostragens, preparo de amostras e extração.

Foram coletadas mensalmente de julho de 2014 a janeiro de 2015, excetuando o mês de novembro devido a problemas de acesso ao local de coleta, uma amostra no canal do Arroio Fundo de cada um dos pontos identificados como FN090 e FN0100, localizados respectivamente antes e após a UTR do Arroio Fundo.

As amostras foram coletadas e armazenadas em frasco de vidro âmbar de um litro com 1% em volume de metanol, e transportadas devidamente acondicionada em isopor com gelo até a chegada ao laboratório. Ao chegar ao laboratório às mesmas foram armazenadas a temperatura de 6 °C por no máximo 48 horas, a fim de cessar atividade microbiana, e preservar as amostras para etapa de extração (CORDEIRO, 2009).

Todas as vidrarias que foram utilizadas nos experimentos seguiram o procedimento de lavagem conforme descrito a seguir:

Lavar inicialmente com água da torneira para remoção dos resíduos mais grosseiros; deixar em repouso em banho com detergente Extran 5% por um período de 4 horas; após este período enxaguar 10 vezes com água da torneira; rinsar todo material com acetona grau HPLC, visando o menor volume possível de consumo com fim a remoção dos resíduos; lavar 5 vezes com água tipo 1 de equipamento ultrapurificador de água; rinsar com etanol grau HPLC visando o mínimo de consumo tendo em vista eliminação de resíduo; lavar cinco vezes com água tipo 1 de equipamento ultrapurificador de água (PEREIRA,2011).

Todas as vidrarias, não volumétricas, foram levadas a mufla e mantidas a temperatura de 400 °C por um período de quatro horas visando à eliminação de composto orgânico residual que possa ser interferente para as análises de cromatografia e espectrometria de massas. As vidrarias foram secas a temperatura ambiente devidamente protegidas de qualquer atmosfera ou líquido contaminante. As vidrarias descontaminadas foram protegidas com auxílio de papel alumínio contra futura contaminação, e armazenadas em ambiente limpo.

As peças e canais do manifold onde foram realizados os procedimentos relativos à extração das amostras foram limpos conforme o procedimento seguinte: Lavar a parte externa do manifold com água da torneira e na sequência com água destilada visando à remoção de partículas grosseiras; lavar todos os canais do manifold com água tipo 1 de ultrapurificador; depois lavar todos os canais do manifold com metanol HPLC; deixar todas as conexões e peças do manifold imerso por 15 minutos em acetona grau analítico no ultrassom; após deixar secar em temperatura ambiente e em atmosfera protegida de qualquer tipo de contaminante.

As amostras foram retiradas da geladeira de modo a atingir o equilíbrio com a temperatura ambiente. Já com as amostras em equilíbrio térmico foi feita a filtração em filtro tipo membrana de fibra de vidro de 1,2 micras e na sequência em membrana de celulose regenerada ou acetato de celulose de 0,45 micras e 47 mm; após cada filtração de um litro de amostra é necessário limpar o fraco kitassato e os demais aparatos de filtração com água ultrapura tipo 1 a fim de evitar contaminação cruzada entre as mesmas.

A extração em fase sólida se deu inicialmente pelo ajuste do pH das amostras para um valor de 3 com solução de ácido clorídrico (HCl) 3 molar grau analítico e ácido sulfúrico (H₂SO₄) em concentração de 0,1 mol L⁻¹, preparado com água tipo 1 de ultrapurificador.

A metodologia de extração escolhida foi a de Lopes (2007), pois de acordo com Cordeiro (2009), esta metodologia apresentou uma recuperação melhor para os analitos de interesse.

O cartucho utilizado para extração em fase sólida foi Accubond II de 500 mg e 6 mL. Este foi condicionado em manifold, com uma vazão controlada de 3 mL min⁻¹, com 6 mL hexano grau analítico, 2 mL de acetona grau analítico, 6 mL de metanol grau analítico e 10 mL de água tipo 1 de ultrapurificador ajustada para valor de pH 3 com ácido clorídrico 3 molar (HCl) grau analítico. Mantendo-se sempre o cartucho molhado para evitar o ressecamento dos poros e perda do analito.

Na etapa posterior foi eluído através do cartucho 1000 mL da amostra previamente filtrada e com pH ajustado no fluxo de 3 mL min⁻¹, tomando-se o cuidado para não permitir o ressecamento dos poros do cartucho. Na etapa de clean-up percolou-se pelo cartucho com pressão 15 kpa de vácuo controlado e fluxo de 3 mL min⁻¹ uma solução de 10 mL de metanol grau HPLC e água tipo 1 de ultrapurificador na proporção de 1:9, com posterior secagem do cartucho por 10 minutos com o bombeamento do sistema de manifold ligado. Imediatamente após a extração, os cartuchos foram embalados individualmente e estocados em freezer a temperatura de -20 °C até a eluição.

Os analitos foram eluídos do cartucho com quatro mL de acetona grau analítico, secos com nitrogênio gasoso e redissolvido com 500 µL de acetonitrila grau HPLC. As amostras foram analisadas imediatamente após a eluição.

3.2 Preparo dos Padrões

Foi preparada primeiramente uma solução padrão estoque de 600 mg g⁻¹ do hormônio 17 α -etinilestradiol em acetonitrila grau HPLC que foi armazenada em frasco de vidro âmbar e estocada a temperatura de 4 ° C. A partir da solução estoque foram preparados os padrões de 10 µg g⁻¹, 6 µg g⁻¹, 4 µg g⁻¹, 3 µg g⁻¹, 2 µg g⁻¹ que foram diluídos em acetonitrila HPLC para posterior quantificação no cromatógrafo líquido com detector de fluorescência e utilizados para elaboração de curva cromatográfica.

Adicionalmente foi preparada uma solução padrão estoque multi elemento para uso nas análises por espectrometria de massas nas respectivas concentrações de 149 mg g⁻¹ de 17 α -estradiol, 178 mg g⁻¹ de estrona, 149 mg g⁻¹ de 4 nonilfenol,

220 mg g⁻¹ de bisfenol A, 214 mg g⁻¹ de 17β-estradiol, 315 mg g⁻¹ de pentaclorofenol e 600mg g⁻¹ de 17α-etinilestradiol em metanol grau HPLC que foi armazenada em frasco de vidro âmbar e estocada a temperatura de 6 °C. A partir, desta solução padrão foram preparadas as demais concentrações a serem utilizadas para quantificação no espectrômetro de massas conforme Tabela 17 que refere-se a concentração dos padrões de cada composto analisado na concentração de µg g⁻¹.

Tabela 17: Concentração dos padrões em µg g⁻¹ utilizados para elaboração da curva analítica e testes de LD e LQ do espectrômetro de massas Xevo TQ.

Concentrações das soluções padrões em µg g⁻¹ utilizadas para criação de curva analítica e testes de LD e LQ no espectrômetro de massas.

Analito	P1*	P2
17α-etinilestradiol	20,0	6460
17α-estradiol	5,0	1630
4-nonilfenol	5,1	1652
17β-estradiol	7,1	2300
Pentaclorofenol	10,8	3490
Bisfenol A	7,4	2390
Estrona	6,1	1974

*P1 foi utilizado para simulação de LD e LQ.

3.3 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Todas as condições cromatográficas foram estabelecidas de acordo com metodologia realizada no estudo de Cordeiro (2009) onde os parâmetros cromatográficos para realização dos testes para o hormônio 17α-etinilestradiol tiveram alguns ajustes visando melhoria de desempenho frente à matriz analítica utilizada. Para avaliação das amostras foi utilizado o cromatógrafo líquido modelo Breeze 2 fabricado pela Waters Corporation®

As condições de realização das análises foram de fluxo de 1 mL min⁻¹ de fase móvel, sendo 0,6 mL min⁻¹ de acetonitrila grau HPLC e 0,4 mL min⁻¹ de água tipo 1 de ultrapurificador.

O volume injetado foi de 50 microlitros de amostra em um loop de 100 microlitros para detecção por fluorescência nos comprimentos de onda de 230 e 280 nm de excitação e 306nm de emissão. A coluna cromatográfica foi a Novapak PAH

nas dimensões de 4,6x250mm e com partícula de 5 micras mantida sob uma temperatura de 26 °C com auxílio do forno de colunas. A temperatura do amostrador automático foi fixada a 18 °C. O tempo da análise cromatográfica fixado para as amostras foi de 30 minutos em função de outros compostos presentes na matriz e para os padrões foi de 15 minutos.

3.3.1 Otimização de parâmetros cromatográficos.

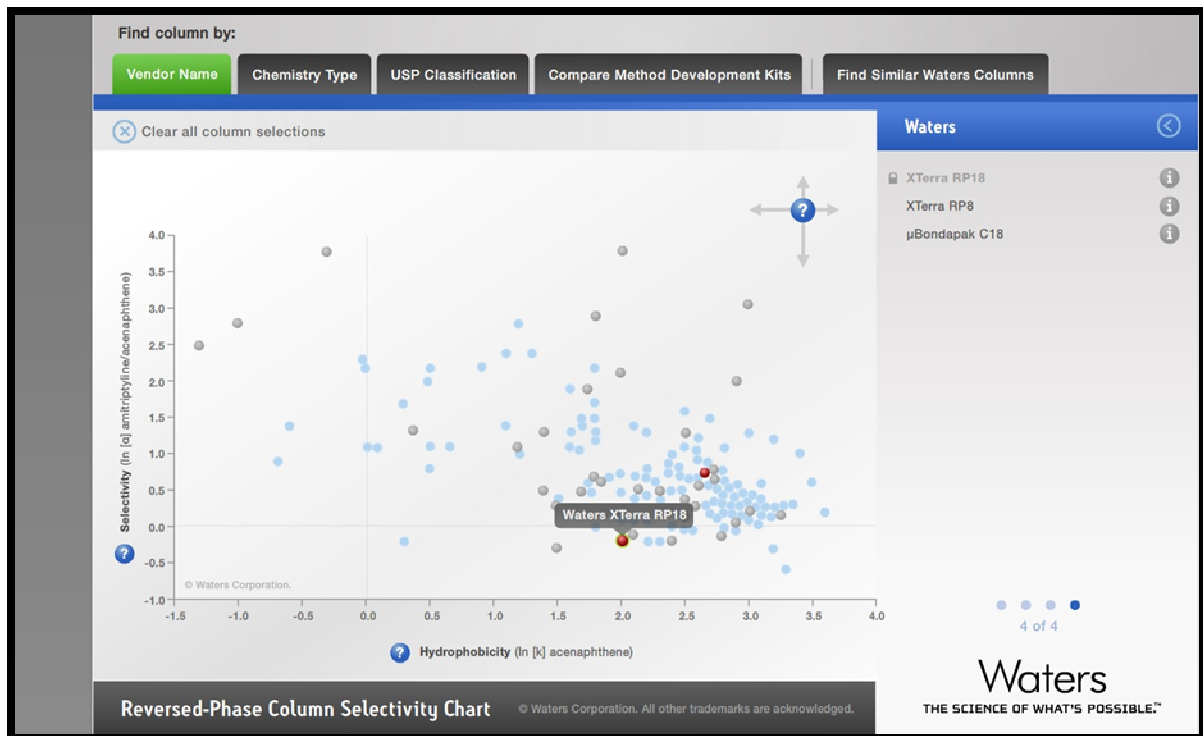
Foram realizados testes visando otimização e maior seletividade para identificação do composto 17 α -etinilestradiol nas amostras do rio Arroio Fundo. A sequência de alterações escolhidas do método cromatográfico foi a seguinte:

- 1º - Alteração na composição da fase móvel;
- 2º - Alteração na composição da fase estacionária (coluna cromatográfica);
- 3º - Alteração no pH.

As condições cromatográficas estabelecidas para os testes foram as seguintes: O teste isocrático 02, consistiu na alteração da composição da fase móvel que inicialmente era de 60/40 acetonitrila/ água tipo 1 para 40/60 acetonitrila/ água tipo 1, buscando avaliar se haveria uma melhoria na separação dos picos cromatográficos.

O teste isocrático 03 com alteração de fase estacionária, também visando melhorar a separação dos picos cromatográficos, estabeleceu a condição de 50/50 acetonitrila/ água tipo 1 e alterou também a fase estacionária de acordo como demonstrado na Figura 12, onde o círculo em vermelho superior representa a coluna estabelecida no método inicialmente, e o círculo vermelho abaixo mostra a outra fase estacionária buscando um comportamento cromatográfico diferente da coluna PAH que estava sendo utilizada pelo método. Tendo em vista que o eixo X do diagrama representa a hidrofobicidade da fase estacionária, ou seja, quanto mais a esquerda do eixo X, menos retida estará o composto e o inverso ocorrerá quanto mais à direita do eixo X. No eixo Y que representa a seletividade relativa a amitriptilina e acenafteno, significa que quanto mais elevado no eixo Y menor retenção para compostos ácidos, maior calda no pico e maior retenção para compostos básicos, e o inverso ocorre a medida que descemos no eixo Y.

Figura 12: Diagrama de seletividade/hidrofobicidade de fase estacionária.



Fonte: [HTTP://WWW.WATERS.COM/SELECTIVITYCHART](http://www.waters.com/selectivitychart).

O teste com alteração de pH visou testar a amostra na condição cromatográfica isocrático 02 que consiste da fase móvel na concentração de 40/60 acetonitrila/ água tipo 1, com a água ajustada ao pH de 2,7 com ácido acético grau HPLC e com a fase estacionária padronizada para o teste (Coluna PAH). Todas as demais condições dos testes foram mantidas de acordo com o estabelecido na metodologia de referência.

3.4 Validações de metodologia para análise de 17 α -etinilestradiol por CLAE.

A validação foi realizada visando à verificação dos parâmetros relativos à linearidade, limite de detecção e limite de quantificação para o método analítico de HPLC/FLU para o composto 17 α -etinilestradiol.

Os testes foram realizados da seguinte forma: Para determinação do limite de detecção foram feitas sete injeções de um branco (amostra sem a presença do composto a ser analisado) a fim de se avaliar o desvio padrão da área relativo ao ruído e assim determinar os valores matematicamente, e no que se refere ao limite

de quantificação, foi utilizado o padrão de menor concentração ($2 \mu\text{g L}^{-1}$), após ser injetado três vezes e avaliados seu desvio padrão em relação a curva de calibração. A linearidade foi determinada em função da curva padrão avaliando os valores r e r^2 e a seletividade foi verificada em função do método de referência.

3.5 Análise por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada espectrometria de massas (UPLC-MS/MS)

A condição analítica para realização dos ensaios por cromatografia de ultra performance seguida de espectrometria de massas dos compostos 17α -etinilestradiol, 17α -estradiol, 17β -estradiol, 4 nonilfenol, pentaclorofenol, bisfenol A e estrona foram obtidas através de nota de aplicação do fabricante do equipamento, (Application Note 720003013 EN Waters Corporation[®]) e foram as seguintes: o tempo de análise foi de 5,30 minutos na temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ com uso de fase estacionária (coluna analítica) modelo BEH C18 de 1,7 micras de diâmetro de partícula e dimensões 2,1x50 mm. A fase móvel utilizada foi 0,05 % de hidróxido de amônio em água e metanol grau HPLC em fluxo de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ de acordo com o gradiente de separação apresentado na Tabela 18 que indica a variação da concentração das fases móveis em função do tempo durante corrida cromatográfica na etapa espectrométrica.

Tabela 18 - Gradiente cromatográfico relativo à etapa espectrométrica realizado no espectrômetro de massas Xevo TQ.

Tempo (minutos)	Fluxo (mL min^{-1})	0,05% NH_4OH (%)	MeOH (%)
Inicial	0,60	65	35
3,00	0,60	5	95
4,20	0,60	5	95
4,30	0,60	65	35
5,30	0,60	65	35

O espectrômetro de massas utilizado foi o tandem quadrupolo modelo XEVO TQ e as condições de ajuste do equipamento foram as seguintes: modo de aquisição Dual Scan-MRM, o modo de ionização foi eletronspray negativo (ESI-), a voltagem do capilar foi de 2.0 kv, a temperatura da fonte foi de $150 \text{ }^\circ\text{C}$, a temperatura de desolvatação foi de $650 \text{ }^\circ\text{C}$, a vazão do gás de desolvatação foi de

1100 L/hr, a vazão de gás do cone foi de 20 ml min⁻¹ e a vazão do gás de colisão foi de 0,18 ml min⁻¹.

No que se refere às amostras, estas passaram por uma filtração adicional através de filtro tipo seringa de 25 mm e 0,2 micras visando evitar entupimentos no sistema de cromatografia de ultra performance e sujar o cone do espectrômetro de massas. Foi realizada ainda diluição do padrão original visando verificar o limite de quantificação e de detecção, além de estabelecer a curva padrão para os compostos.

Adicionalmente foi realizado um experimento com adição padrão em multi concentração, visando realizar a verificação do efeito de matriz e avaliar o quanto este proporcionava de desvio em relação à curva padrão. A concentração dos padrões adicionados para cada amostra se deu conforme expresso na Tabela 19 relativo a concentração final de cada padrão nas amostras em diferentes níveis de concentração.

Tabela 19 – Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) final de padrão nas amostras para teste de adição padrão em 3 níveis de concentração.

Analito	Amostra 5.1 (0100 Julho)	Amostra 5.2 (0100 Julho)	Amostra 5.3 (0100 Julho)
17 α -etinilestradiol	172	207	413
17 α -estradiol	43	52	104
4-nonilfenol	44	53	106
17 β -estradiol	61	74	147
Pentaclorofenol	93	112	223
Bisfenol A	64	76	153
Estrona	53	63	126
Analito	Amostra 6.1 (090 Setembro)	Amostra 6.2 (090 Setembro)	Amostra 6.3 (090 Setembro)
17 α -etinilestradiol	172	207	413
17 α -estradiol	43	52	104
4-nonilfenol	44	53	106
17 β -estradiol	61	74	147
Pentaclorofenol	93	112	223
Bisfenol A	64	76	153
Estrona	53	63	126

Continuação da Tabela 19 – Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) final de padrão nas amostras para teste de adição padrão em 3 níveis de concentração.

Analito	Amostra 7.1 (0100 Setembro)	Amostra 7.2 (0100 Setembro)	Amostra 7.3 (0100 Setembro)
17 α -etinilestradiol	172	207	413
17 α -estradiol	43	52	104
4-nonilfenol	44	53	106
17 β -estradiol	61	74	147
Pentaclorofenol	93	112	223
Bisfenol A	64	76	153
Estrona	53	63	126
Analito	Amostra 8.1 (090 Julho)	Amostra 8.2 (090 Julho)	Amostra 8.3 (090 Julho)
17 α -etinilestradiol	172	207	413
17 α -estradiol	43	52	104
4-nonilfenol	44	53	106
17 β -estradiol	61	74	147
Pentaclorofenol	93	112	223
Bisfenol A	64	76	153
Estrona	53	63	126

3.6 Validação das análises de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada espectrometria de massas (UPLC-MS/MS)

A validação foi realizada através da injeção por dez vezes do padrão determinado como concentração P1 para verificação do limite de detecção e limite de quantificação.

A linearidade foi realizada através da injeção dos padrões conforme concentração expressa na tabela 20, que foram preparados a partir do padrão P2.

Tabela 20 – Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) final de padrão para determinação da linearidade do método analítico.

Analito	C1 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	C2 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	C3 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	C4 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	C5 ($\mu\text{g L}^{-1}$)
17 α -etinilestradiol	258	517	775	1034	1292
17 α -estradiol	65	130	196	261	326
4-nonilfenol	66	132	198	264	330
17 β -estradiol	92	184	276	368	460
Pentaclorofenol	140	279	419	558	698
Bisfenol A	96	191	287	382	478
Estrona	79	158	237	316	395

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cromatografia Líquida de alta eficiência – CLAE

Inicialmente realizou-se o ajuste da curva de calibração visando atender os limites de concentração esperado na ordem de ng L^{-1} , utilizando o cromatógrafo com detector de fluorescência ajustado para realizar medições nos comprimentos de onda de 230 e 280 nm de excitação e 306 nm de emissão.

Foi verificado que em função do ruído obtido não seria possível se obter um coeficiente de determinação (r^2) satisfatório para esta curva. Desta forma iniciou-se uma avaliação para determinação dos limites de detecção e quantificação para o método sugerido.

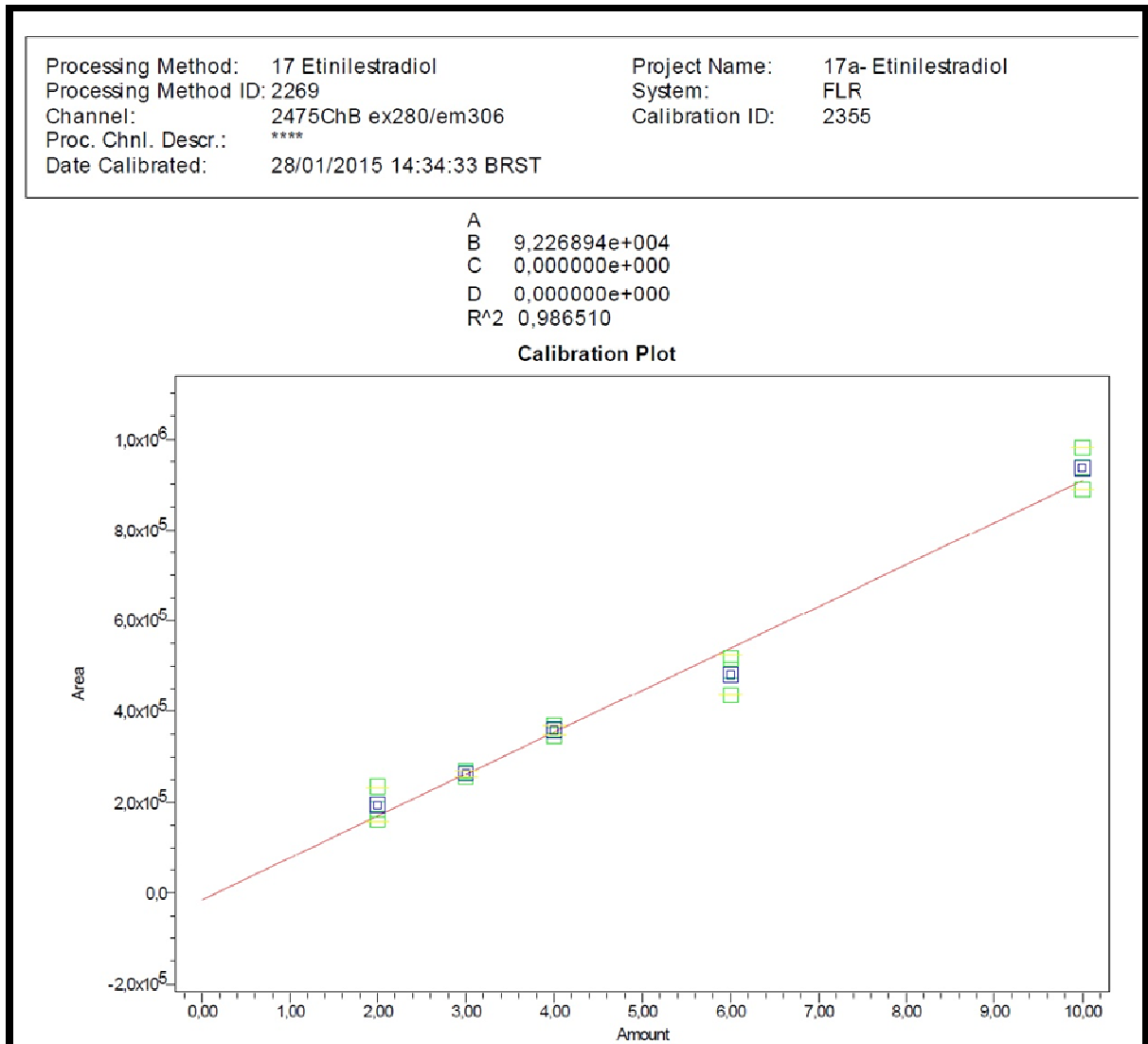
Considerando a composição da fase móvel, do diluente e adicionalmente visando avaliar também a repetibilidade das injeções realizadas pelo amostrador automático foram realizadas 07 injeções da solução diluente do padrão e das amostras a fim de se determinar o ruído, e a partir deste calcular o limite de detecção. A Tabela 21 mostra os resultados calculados para limite de detecção do método cromatográfico relativo ao 17 α -etinilestradiol.

Tabela 21- Resultados dos cálculos relativos a limite de detecção para o 17 α -etinilestradiol em área e altura obtidos no HPLC/FLU.

Cálculo do Limite de Detecção	Área	Altura	Injeção número
	4111	941	7
	2324	517	6
	6260	1870	5
	7158	972	4
	4185	1279	3
	6113	1839	2
	1035	363	1
Desvio padrão	2226	408	
Limite de detecção	6997	1284	
$LD = X + t(n-1, 1-\alpha) \cdot s$			

O cálculo do limite de quantificação foi adotado conforme orientação do Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO, 2010), que preconiza que este pode ser o valor do padrão de menor concentração da curva analítica, que no caso da metodologia realizada, este foi de 2 $\mu\text{g L}^{-1}$, e respectivamente foi testado em três injeções de branco (amostras sem a presença do composto a ser analisado) contra a curva de calibração a fim de se verificar se o mesmo fornecia um valor de altura e área pelo menos cinco vezes superior ao valor da amplitude do ruído.

Após a determinação dos limites de detecção e limites de quantificação do método, expresso na Tabela 21, foi estabelecida a linearidade da curva analítica. A construção da curva analítica foi realizada através da injeção de cada padrão por três vezes, e a curva analítica foi determinada em função da média dos valores obtida entre a triplicata de cada valor de concentração da curva analítica. A Figura 13 mostra a curva analítica obtida no HPLC/FLU para o método desenvolvido para o 17 α -etinilestradiol.

Figura 13: Curva analítica do 17 α -etinilestradiol obtido no HPLC/FLU.

Peak 17 Etinilestradiol

	Name	Level	PPB	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	17 Etinilestradiol	1	2,000000	234599,615301	2,702748	35,137	No	No
2	17 Etinilestradiol	1	2,000000	184052,739025	2,154927	7,746	No	No
3	17 Etinilestradiol	1	2,000000	162485,355667	1,921182	-3,941	No	No
4	17 Etinilestradiol	2	3,000000	269609,381811	3,082180	2,739	No	No
5	17 Etinilestradiol	2	3,000000	266318,366103	3,046512	1,550	No	No
6	17 Etinilestradiol	2	3,000000	254960,943941	2,923422	-2,553	No	No
	Name	Level	PPB	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
7	17 Etinilestradiol	3	4,000000	361062,039196	4,073333	1,833	No	No
8	17 Etinilestradiol	3	4,000000	347080,086893	3,921798	-1,955	No	No
9	17 Etinilestradiol	3	4,000000	368339,853055	4,152209	3,805	No	No
10	17 Etinilestradiol	4	6,000000	492021,496805	5,492656	-8,456	No	No
11	17 Etinilestradiol	4	6,000000	435205,089119	4,876887	-18,719	No	No
12	17 Etinilestradiol	4	6,000000	516738,294304	5,760534	-3,991	No	No
13	17 Etinilestradiol	6	10,000000	980551,782583	10,787290	7,873	No	No
14	17 Etinilestradiol	6	10,000000	888735,374014	9,792195	-2,078	No	No
15	17 Etinilestradiol	6	10,000000	936709,008038	10,312127	3,121	No	No

Os valores obtidos de linearidade foram estabelecidos em função da equação $Y = ax+b$, e estes foram respectivamente $r = 0,9932$ (coeficiente de correlação) e $r^2 = 0,9865$ (coeficiente de determinação), o que são considerados adequados tanto para os parâmetros do INMETRO (INMETRO, 2010), quanto para os parâmetros da ANVISA (ANVISA, 2003) O Anexo I mostra a injeção para cada um dos pontos da curva de calibração, considerando a segunda injeção de cada ponto.

Após a elaboração das curvas analíticas as amostras dos pontos 090 e 0100 do Rio Arroio Fundo para os meses de Julho a Dezembro foram avolumadas para 1,0 ml com adição de um padrão na concentração de $3,84 \mu\text{g L}^{-1}$, visando garantir que as concentrações encontradas estariam dentro do limite de quantificação estabelecido no método.

Os cromatogramas apresentados (no Anexo II) demonstram problemas relacionados à seletividade do método. Na Tabela 22 apresentamos os resultados das amostras que foram possíveis realizar a quantificação de acordo com o método selecionado na literatura (CORDEIRO, 2009).

Tabela 22: Resultados de quantificação do 17 α -etinilestradiol para amostras do rio Arroio Fundo

Amostra	Resultado em ng L⁻¹
Ponto 090 de Julho	24,67 ng L ⁻¹
Ponto 0100 de Dezembro	672,03 ng L ⁻¹
Ponto 090 de Janeiro	323,5 ng L ⁻¹
Ponto 0100 de Janeiro	411,5 ng L ⁻¹
Padrão Usado na Adição Padrão de Todas as Amostras Avaliadas	769,00 ng L ⁻¹

Os resultados apresentados mostram uma tendência a valores elevados do composto 17 α -etinilestradiol na amostra do ponto 0100 no mês de dezembro, enquanto a amostra do ponto 090 do mês de julho apresenta valor mais compatível com os valores encontrados na literatura (CHEN et al., 2007). Todavia a avaliação não pode ser considerada como definitiva visto que o método apresentou-se falho no que se refere à seletividade. Há vários fatores que influenciam diretamente na capacidade de um método cromatográfico ser seletivo para uma determinada amostra. Dentre eles podemos citar a composição da fase móvel, as características da coluna cromatográfica escolhida, além do pH da amostra. Há ainda fatores que não estão ligados diretamente ao método cromatográfico, mas possui grande impacto na seletividade, aspectos estes que se referem à amostra, e que geralmente são denominados efeito da matriz. Estes estão diretamente ligados ao nível de complexidade da amostra, ou seja, o número de compostos que interferem na determinação do elemento a ser quantificado, a capacidade de se extrair estes compostos seletivamente sem interferir no elemento que se busca determinar, a remoção de outros compostos que não são de interesse analítico, mas que podem adsorver ou se ligar quimicamente a compostos de interesse, e a conservação da integridade da amostra até a realização das análises (ORLANDO et al, 2009). A questão relativa ao preparo, extração e conservação da amostra foram realizadas de acordo com metodologia descrita na literatura e baseado no estudo realizado por Cordeiro (2009), bem como as condições cromatográficas e especificação de materiais.

Foram realizados ainda testes visando uma otimização dos parâmetros cromatográficos, a fim de se obter uma melhor seletividade. Todavia considerando que em todos os testes de otimização dos parâmetros cromatográficos realizados, não se obteve uma melhoria considerável na seletividade, e na resolução dos picos cromatográficos, pois o pico de interesse do 17 α -etinilestradiol manteve-se coeludindo com os demais picos relativos a compostos não identificados na amostra, o que impedia sua correta quantificação, fato este que pode ser demonstrado quando se avalia o cromatograma do padrão frente à amostra de interesse. Sendo assim pode se verificar que para as amostras do Rio Arroio Fundo, que se mostrou um rio com grandes interferentes e com uma carga de contaminação muito elevada, o que o atribuiu uma classificação quanto ao índice de qualidade (IQA) do Instituto Estadual do Ambiente como ruim (www.inea.rj.gov.br/portal/MegaDropDown/MonitoramentoQualidadedaagua/aguasinteriores/Qualificaodeaguas/RHV-BaiadeGuanabara1), o método referenciado para determinação (CORDEIRO, 2009) não foi capaz de realizar uma quantificação apropriada para os pontos coletados.

Esses resultados trazem algumas questões que devemos considerar na seleção de um método cromatográfico, pois apesar de estarmos tratando de matrizes que se esperava haver uma similaridade com a do método de referência (CORDEIRO, 2009), em função do método de referência se tratar de água de represa, e também pelo fato de já ter sido utilizado em outras determinações para análises de águas de rios. A questão do nível de contaminação do rio e a interferência causada por estes contaminantes foram preponderantes para que houvesse uma grande dificuldade em realizar os experimentos e ajustar um método cromatográfico confiável e seguro.

De acordo com Chen et al (2007), pode-se considerar uma extração de um menor volume de amostra para matrizes muito sujas o que poderia aliviar o efeito de matriz e a possível interação de compostos. Há ainda outros pontos que necessitam ser avaliados, como a possível acidificação da amostra visando melhorar a retenção dos compostos E1, E2, E3, EE2 para análise por cromatografia de fase reversa, o que gera um contraponto que é a maior extração de ácido fúlvicos e húmicos que interferem sobre os analitos. Outro ponto importante a se considerar é que os rios dos países subdesenvolvidos em geral não possuem as mesmas características que são encontradas em rios que são avaliados nos países desenvolvidos, o que torna

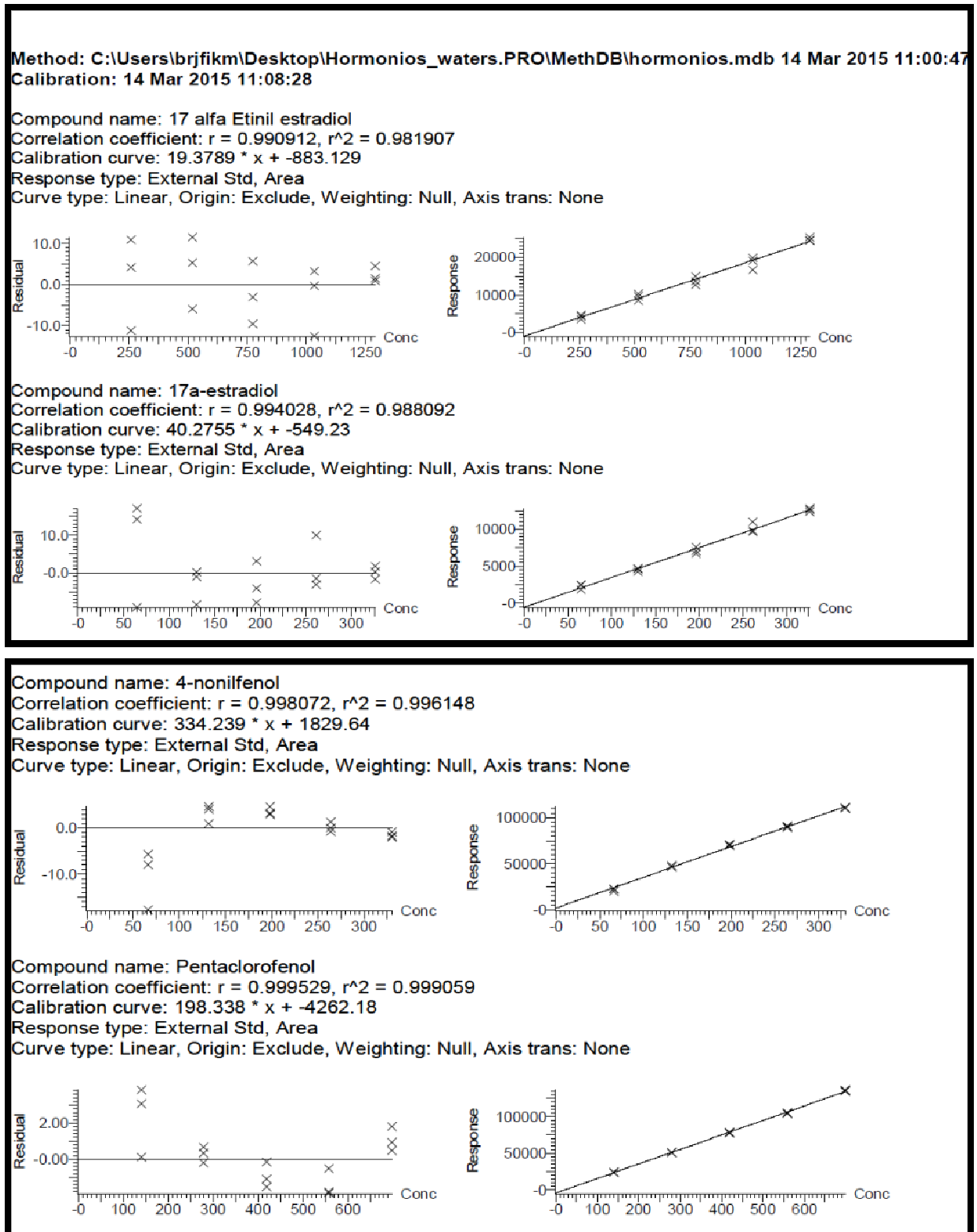
ainda mais delicada a questão da seleção de métodos cromatográficos a serem referenciados.

4.2 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada espectrometria de massas (UPLC-MS/MS)

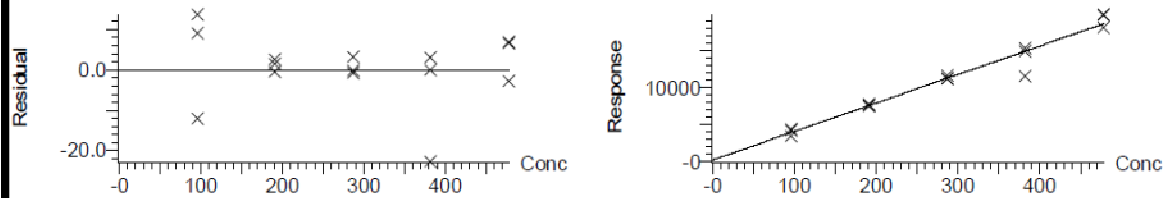
Inicialmente realizou-se o preparo dos padrões do 17 α -etinilestradiol, 17 α -estradiol, 17 β -estradiol, 4 nonilfenol, pentaclorofenol, bisfenol A e estrona visando à elaboração da curva de calibração e para determinação dos valores de LD e LQ, além de estabelecer a linearidade e seletividade. Foi possível perceber durante os ajustes dos parâmetros analíticos que o método sofreu grande interferência oriundo do efeito de matriz característico da amostra, conforme resultado demonstrado no Anexo IV, que apresenta os resultados relativos ao desvio padrão das amostras, testadas com adição padrão. Resultados estes que deram um valor de desvio em relação à curva padrão bem elevados.

Os resultados obtidos para análise dos padrões relativos à curva de calibração comprovaram que o método teve uma boa linearidade para os compostos conforme pode ser visualizado na figura 14 que demonstra os resultados para curva de calibração e linearidade dos compostos. Adicionalmente calculou-se o coeficiente de correlação r e o coeficiente de determinação r^2 que são valores que expressam uma estimativa da qualidade da curva obtida, tendo em vista que quanto mais próximos de 1,0 menor a dispersão do conjunto de pontos. Exibindo assim resultados satisfatórios para ambos os parâmetros avaliados.

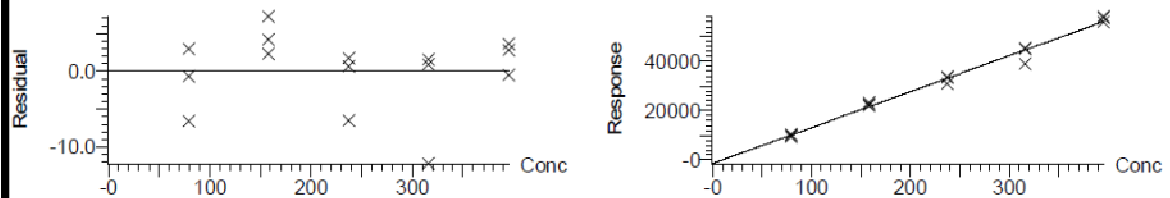
Figura 14: Curva analítica e linearidade do 17 α -etinilestradiol, 17 α -estradiol, 17 β -estradiol, 4 nonilfenol, pentaclorofenol, bisfenol A e estrona realizado no espectrômetro de massas Xevo TQ.



Compound name: Bisfenol A
 Correlation coefficient: $r = 0.981450$, $r^2 = 0.963243$
 Calibration curve: $38.5363 * x + 219.471$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



Compound name: Estrona
 Correlation coefficient: $r = 0.993882$, $r^2 = 0.987802$
 Calibration curve: $145.727 * x - 1414.53$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



Os resultados obtidos como limite de detecção e limite de quantificação para o método espectrométrico foram calculados conforme determinação do INMETRO (2010) e apresentaram os seguintes valores (em área) de limite de detecção, limite de quantificação e coeficiente de variação para os compostos 17α -etinilestradiol, 17α -estradiol, 17β -estradiol, 4 nonilfenol, pentaclorofenol, bisfenol A e estrona conforme a Tabela 23.

Tabela 23: Resultados relativos a limite de detecção, limite de quantificação e coeficiente de variação dos compostos 17 α -etinilestradiol, 17 α -estradiol, 17 β -estradiol, 4 nonilfenol, pentaclorofenol, bisfenol A e estrona realizados em espectrômetro de massas modelo Xevo TQ utilizando o padrão P1.

Compostos	17 α- etinilestradiol	17 α- e β- estradiol	4-nonilfenol	Pentaclorofenol	Bisfenol A	Estrona
Conc. $\mu\text{g g}^{-1}$	20,0	5,0 e 7,1	5,1	10,8	7,4	6,1
	Medidas de Área	Medidas de Área	Medidas de Área	Medidas de Área	Medidas de Área	Medidas de Área
	386	89	1794	3809	594	1110
	397	176	1730	3505	717	922
	539	113	1666	3240	876	1003
	418	135	1694	3921	820	1120
	436	149	1684	3976	850	799
	431	87	1591	3813	911	1167
	625	238	1658	3433	959	1096
	453	138	1729	3927	870	967
	431	106	1591	3625	707	889
	375	178	1656	3770	762	1063
Média	449	142	1680	3702	807	1014
Desvio Padrão	73	45	59	231	105	112
CV(%)	16,2	31,4	3,5	6,2	13,0	11,0
Coef. Angular	19,3	40,2	334,2	198,3	38,5	145,7

Continuação da Tabela 23: Resultados relativos a limite de detecção, limite de quantificação e coeficiente de variação dos compostos 17 α -etinilestradiol, 17 α estradiol, 17 β estradiol, 4 nonilfenol, pentaclorofenol, bisfenol A e estrona realizados em espectrômetro de massas modelo Xevo TQ utilizando o padrão P1.

LD	11,2	3,3	0,5	3,4	8,1	2,3
LQ	37,5	11,0	1,7	11,6	27,2	7,6

Em função das características das amostras nem todos os compostos foram possíveis de serem quantificados com segurança, desta maneira a Tabela 24 apresenta os resultados finais em ng L^{-1} relativos aos compostos Bisfenol A e Estrona os quais foram possíveis assegurar uma linearidade quando avaliados diante da curva padrão suficiente para realizar a determinação.

Tabela 24: Resultados obtidos por espectrometria de massas das amostras do rio Arroio Fundo nos meses de agosto a dezembro de 2014 para os compostos bisfenol A e estrona.

Amostras	Bisfenol A - ng L^{-1}	Estrona - ng L^{-1}
Agosto FN090 1º Injeção	170	ND
Agosto FN090 2º injeção	164	ND
Agosto FN090 3º Injeção	144	ND
Agosto FN 0100 1º Injeção	ND	ND
Agosto FN 0100 2º Injeção	ND	ND
Agosto FN 0100 3º Injeção	ND	ND
Setembro FN 090 1º Injeção	245	ND
Setembro FN 090 2º Injeção	256	16
Setembro FN 090 3º Injeção	251	16
Setembro FN 0100 1º Injeção	323	ND
Setembro FN 0100 2º Injeção	246	ND
Setembro FN 0100 3º Injeção	328	ND
Outubro FN090 1º Injeção	114	ND
Outubro FN090 2º Injeção	104	ND
Outubro FN090 3º Injeção	128	ND
Outubro FN0100 1º injeção	462	ND
Outubro FN0100 2º Injeção	451	ND
Outubro FN0100 3º injeção	432	ND
Dezembro FN090 1º Injeção	174	ND
Dezembro FN090 2º Injeção	108	ND

Continuação da Tabela 24: Resultados obtidos por espectrometria de massas das amostras do rio Arroio Fundo nos meses de agosto a dezembro de 2014 para os compostos bisfenol A e estrona.

Dezembro FN090 3º Injeção	172,9	ND
Dezembro FN0100 1º injeção	154,8	ND
Dezembro FN0100 2º Injeção	165,0	ND
Dezembro FN0100 3º Injeção	150,1	ND

Legenda: ND= Não detectável

Os resultados obtidos para as análises efetuadas, bem como os cromatogramas, apresentados no Anexo V, permitem destacar que apesar dos interferentes presentes na amostra, o espectrômetro de massas é bem seletivo para determinação de compostos desafiadores em amostras complexas. O desvio dos resultados relativos aos compostos 17 α -etinilestradiol, 17 α -estradiol, 17 β -estradiol, 4 nonilfenol, pentaclorofenol, bisfenol A e estrona nos testes de adição padrão obtidos na amostra quando comparados à curva padrão, conforme Anexo IV, foram em grande parte causado por problemas em etapa anterior ao detector, como supressão do sinal na fonte de ionização devido a grande quantidade de contaminantes na amostra.

Embora não tenha sido possível quantificar todos os compostos de interesse. O espectro total da amostra obtido, referente aos pontos FN 090 e FN0100 dos meses de setembro e dezembro de 2014, conforme Anexo V, nos permite verificar que não há grande diferença nos resultados das amostras em relação ao ponto FN 090 e FN 0100, e que conforme esperado inicialmente há inclusive uma concentração de alguns compostos na amostra dos pontos FN0100 localizado após a unidade de tratamento do rio Arroio Fundo. Isto pode ocorrer devido ao fato de como não há remoção destes compostos na estação de tratamento, os mesmos estão se acumulando e sendo lançados de forma mais concentrada após a passagem pela unidade de tratamento. Outro aspecto importante a ser avaliado no espectro das amostras dos pontos FN 090 e FN 0100 é a presença de série homóloga justamente no tempo de análise onde foram detectados grande parte dos compostos que foram estudados, a presença desta série homóloga deve ter sido o principal motivo para supressão do sinal na fonte de ionização do espectrômetro de

massas, causando o desvio em relação a curva de calibração, o que impediu a quantificação dos demais compostos objetivos de monitoramento. Esta série homóloga pode ser devido à presença de ácidos húmicos, fúlvicos ou algum tipo de óleo presente em combustíveis. Todavia não é possível afirmar sem realizar um monitoramento específico para tais compostos. O que caracterizou a presença da série homóloga foi a diferença de 14 unidades de massa em relação aos picos mais intensos no intervalo de 2 a 4 minutos durante a análise espectral das amostras relativo à contagem total de íons, que pode ser visualizado no espectro das amostras de setembro e dezembro conforme anexo V. Outro dado importante na visualização do espectro das amostras, no Anexo V, é que apesar da espectrometria de massas ser um método altamente seletivo, a quantidade de compostos interferentes presentes na amostra, dificultou um resultado mais apurado para identificação e quantificação dos desreguladores endócrinos. Este resultado conduz a um aspecto importante de ser avaliado, que é a necessidade de um protocolo de preparo de amostra diferente do que foi utilizado visando uma extração mais seletiva dos compostos a serem analisados de forma a diminuir a supressão na fonte de ionização, permitindo assim uma quantificação destes compostos (CHEN et al., 2007).

5 CONCLUSÃO

As análises de monitoramento realizadas através da cromatografia líquida com detector de fluorescência e pela espectrometria de massas tipo tandem quadrupolo para as amostras do rio Arroio Fundo, que possui um índice de qualidade de água ruim de acordo com o Instituto Estadual do Ambiente, indicou que além dos compostos bisfenol A, 17 α -etinilestradiol e estrona identificados e quantificados, há uma diversidade de outros compostos orgânicos, que foram detectados através das metodologias inicialmente implementadas e testadas frente a alguns parâmetros de validação, presentes nas águas do rio Arroio Fundo.

Apesar de não terem sido identificados, a concentração e presença destes compostos ligeiramente mais elevada à jusante da estação de tratamento em relação a montante da mesma demonstram que a presença da estação de tratamento entre os dois pontos de coleta, não causa nenhuma redução nos níveis

dos compostos desreguladores endócrinos, o que de fato era esperado por se tratar apenas de um processo de tratamento físico-químico.

Também foi possível avaliar, através do monitoramento realizado, a complexidade das amostras de um rio altamente poluído, o que nos conduz a necessidade de se propor um protocolo mais seletivo na preparação das amostras, visando reduzir ao máximo a presença de compostos que interfiram nas análises, elevando assim a acurácia das determinações, e reduzindo o efeito de matriz gerado pela amostra na identificação e quantificação dos compostos.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Visando a implementação de um método capaz de resolver a questão dos interferentes oriundos de matrizes complexas deve-se estabelecer um protocolo mais seletivo no que se refere ao preparo das amostras, onde seja possível obter uma maior seletividade para os desreguladores endócrinos. Uma alternativa seria a utilização de cartuchos de extração em fase móvel que além da questão da polaridade, também realizasse retenção diferente para compostos ácidos e bases, isto poderia auxiliar a reter alguns ácidos orgânicos que podem estar presentes em níveis elevados na amostra, causando o efeito de supressão iônica que foi citado na análise por espectrometria de massas, estes também podem estar coeluinto durante a etapa cromatográfica. Ainda no que se refere à etapa de preparação de amostras deve ser testado o desempenho utilizando-se outros solventes de polaridade diferente nos cartuchos SPE, visando ganhos de seletividade dos compostos desreguladores endócrinos.

Quanto à etapa de espectrometria de massas, deve-se considerar um gradiente cromatográfico com um tempo analítico maior, que certamente irá auxiliar na separação dos compostos alvos. Além disso, já que os desreguladores endócrinos objetivos deste trabalho não são de peso molecular tão elevado, o uso de uma fonte de ionização tipo APCI pode trazer resultados satisfatórios em nível de detecção se mostrando uma alternativa ao método por ESI.

REFERÊNCIAS

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa); Resolução-RE nº899 de 29/05/2003.
- Aquino Neto F .R, Souza Nunes, D. (2003). *Cromatografia Princípios básicos e Técnicas afins*. (Interciência, Ed.) (1º ed.). Rio de Janeiro.
- Arsenault, J. C. (2012). *Beginner's Guide to Solid Phase Extraction*. (W. Corporation, Ed.) (1º ed.). Milford.
- Bila, D. M. (2005). *Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17β-estradiol pelo processo de ozonização*. 2005.300 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Coppe/UFRJ. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Birkett, J. W., & Lester, J. N. (2003). *Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. (J. Birkett & J. Lester, Eds.). CRC Press. doi:10.1201/9781420032185
- Calijuri M.C, C. D. G. F. (2013). *Engenharia Ambiental*. (Elsevier, Ed.) (1º ed.). Rio de Janeiro.
- Carson, R. (2012). *Primavera Silenciosa*. (Gaia, Ed.) (1º ed.). São Paulo.
- Chen, C.-Y., Wen, T.-Y., Wang, G.-S., Cheng, H.-W., Lin, Y.-H., & Lien, G.-W. (2007). Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *The Science of the Total Environment*, 378, 352–365. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.02.038
- Cienfuegos, F., Vaitsman, D. (2000). *Análise Instrumental*. (Interciência, Ed.) (1º ed.). Rio de Janeiro.
- Colborn Theo, Dumanoski Dianne, M. J. P. (2002). *O Futuro Roubado*. (LPM, Ed.) (1º ed.). Floresta.
- Cordeiro, D. (2009). *Uso de bioindicador de efeito endócrino e validação do método para determinação de hormônios na água da Represa Municipal de São José do Rio Preto, SP*. 2009. 90 f. Tese (Mestrado em Química Analítica)- Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- CSID:6371, <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.6371.html> (accessed 12:54, Mar 30, 2015)
- CSID:1688, <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.1688.html> (accessed 12:59, Mar 30, 2015)
- CSID:967, <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.967.html> (accessed 13:04, Mar 30, 2015)

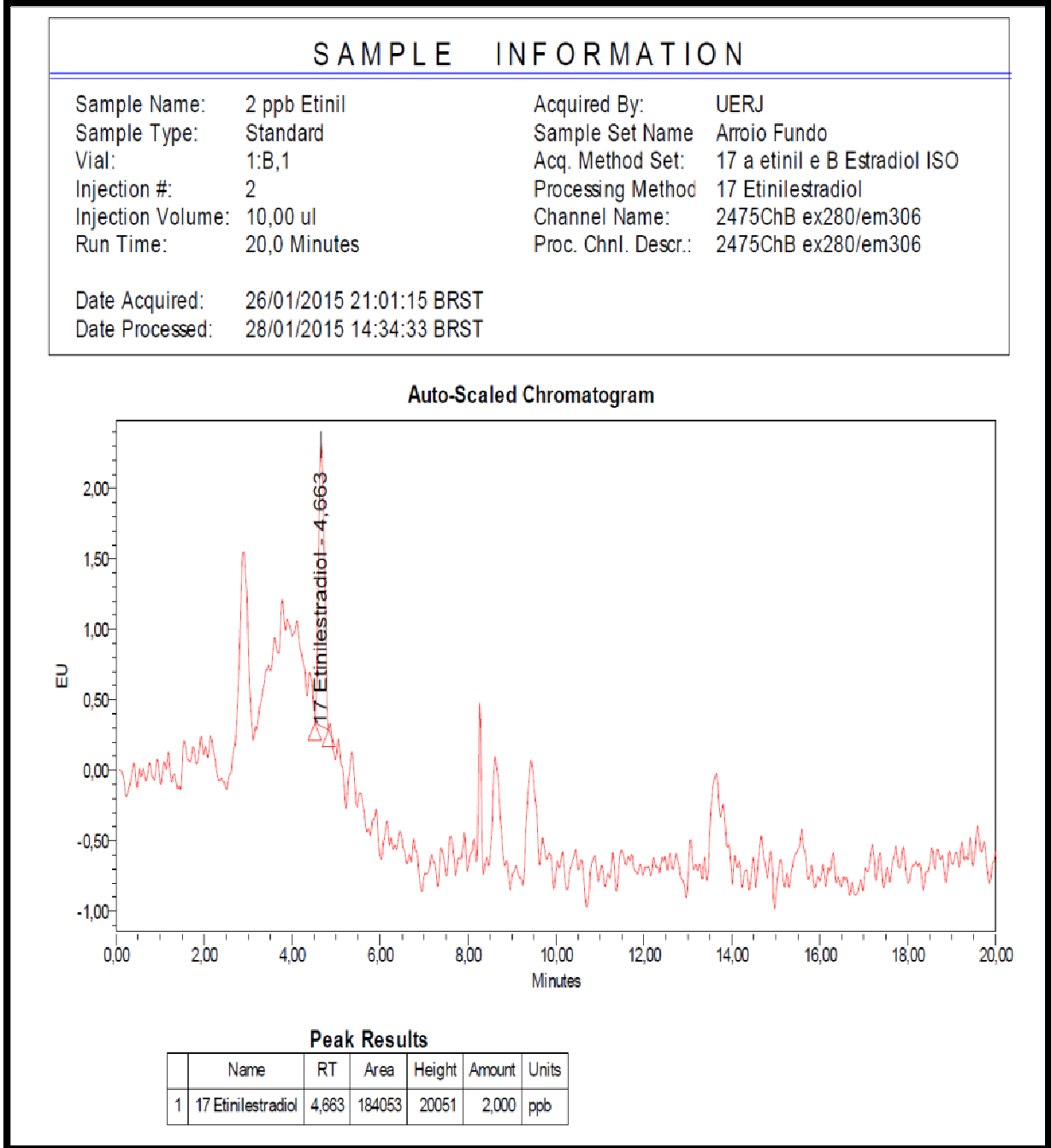
- Da Silva, F. V., Rodrigues, J. L., Batista, B. L., & De Oliveira, D. P. (2007). Alquilfenóis e alquilfenóis etoxilados: Uma visão ambiental. *Revista Brasileira de Toxicologia*, 20, 1–12.
- De Aragão, N. M., Veloso, M. C. D. C., & De Andrade, J. B. (2009). Validação de métodos cromatográficos de análise- Um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida DE alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. *Quimica Nova*, 32(9), 2476–2481. doi:10.1590/S0100-40422009000900043
- De Paiva Pessoa, G., Dos Santos, A. B., De Souza, N. C., Alves, J. A. C., & Do Nascimento, R. F. (2012). Desenvolvimento de metodologia para avaliar remoção de estrogênios em estações de tratamento de esgotos. *Quimica Nova*, 35(5), 968–973.
- Di Carro, M., Scapolla, C., Liscio, C., & Magi, E. (2010). Development of a fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of endocrine-disrupting compounds in waters. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398, 1025–1034. doi:10.1007/s00216-010-3985-0
- Dias R.V.A; Sanson A.L; Afonso R.J.C.F.A; Aquino S.F; Padua V.L. (2013). Avaliação da ocorrência de fármacos e interferentes endócrinos em manancial de abastecimento de água para consumo humano na região metropolitana de belo horizonte - mg, (1), 1–8.
- Escandar, G. M. & Pérez, R. L. (2014). Liquid chromatography with diode array detection and multivariate curve resolution for the selective and sensitive quantification of estrogens in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 835, 19–28. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2014.05.015>
- European Commission. (2011). 4th Report on the implementation of the “Community Strategy for Endocrine Disrupters” a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife (COM (1999) 706). *Vasa*, 17. Retrieved from <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>
- Ghiselli, G., & Jardim, W. F. (2007). Interferentes endócrinos no ambiente. *Quimica Nova*, 30(3), 695–706. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422007000300032>
- Herbert, C. G., & Johnstone, R. A. W. (2003). *Mass Basics*. (CRC PRESS, Ed.) New York (1st ed.). New York.
- Hoffmann Edmond de, S. V. (2007). *Mass Spectrometry*. (JohnWiley & Sons Ltd, Ed.) (3rd ed.). West Sussex: WILEY.
- Instituto Nacional de Metrologia, N. e Q. I. (2010). *Orientação sobre validação de métodos e ensaios químicos, DOQ CGCRE008, 2003*.

- Inea.rj.gov.br. Disponível em: <www.inea.rj.gov.br/portal/MegaDropDown/Monitoramento/Qualidadedaagua/aguasInteriores/Qualificaodeaguas/RHV-BaiadeGuanabara1> Acesso em 15 de janeiro de 2015.
- Johnson, A. C., & Williams, R. J. (2004). A Model To Estimate Influent and Effluent Concentrations of Estradiol Sewage Treatment Works, (1), 3649–3658.
- Johnson, I., Harvey, P. (2002). Study on the scientific evaluation of 12 substances in the context of endocrine disrupter priority list of actions, (November), 17S.
- Keith, L. H. (1997). *Environmental Endocrine Disruptors*. (Wiley, Ed.) (1^o ed.). New York: John Wiley e Sons.
- Khetan, S. K. (2014). *Endocrine Disruptors in the Environment*. (Wiley, Ed.) (1^o ed.). New Jersey: John Wiley e Sons.
- Lemke Thomas L., Williams David A., Roche Victoria F., Z. S. W. (2008). *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. (W. Lippincott, Ed.) (6^o ed.). New York: The Point.
- Levi, Y., Cargouët, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S., (2004). Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Science of the Total Environment*, 324, 55–66. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.10.035>
- Mello, G.S.L; Ikebara, C; Felici, M.F.; Bigeli, V. S. (2013). panorama da contaminação das águas superficiais por estrogênios no brasil, (1), 1–11.
- Nagpal, N., & Meays, C. (2009). Water Quality Guidelines for Pharmaceutically-active- Technical Appendix.
- Neale, M., & Ishikawa, R. (2014). Endócrinos químicos rompimento: Situação regulamentar na UE. Retrieved January 26, 2014, from <http://www.specchemonline.com/articles/view/endocrine-disruption-chemicals-regulatory-status-in-the-eu#.UuW8OxBTviU>
- NERLScience. (2015). EPA Science Inventory EDC EXPOSURE METHODS. Retrieved February 13, 2015, from http://cfpub.epa.gov/si/si_publicrecord_report.cfm?dirEntryId=56099
- Orlando, R. M., Cordeiro, D. D., Ana Elisa Barreto Mathias, K. R. R., & Gil, E. D. S. (2009). Pré-Tratamento de Amostras. *Vita et Sanitas*, 122–139.
- Pereira, R. de O. (2011). *Formação de subprodutos do estrona e 17b-estradiol na oxidação utilizando cloro e ozônio em água. Rio Preto, SP.2011. 192 f. Tese (Doutorado em ciências)- Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Paulo.*

- Portal Cidade Olímpica. Disponível em: <<http://www.cidadeolimpica.com.br/noticias/meio-ambiente-rios-e-lagoas-mais-limpos-para-as-olimpiadas-de-2016/>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2015).
- Portal Secretaria Municipal de Meio Ambiente. Disponível em: <<http://www0.rio.rj.gov.br/smac>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2015)
- Santamarta, J. (2001). A ameaça dos disruptores endócrinos. *Agroecologia E Desenvolvimento Rural Sustentável*, 2, 18–29.
- Schechter, A. (2012). *Dioxins and Health*. (Wiley, Ed.) (3^o ed.). Dallas: John Wiley e Sons.
- Scott, R. P. W. (2003). *Liquid Chromatography*. (L. LIBRARY4SCIENCE, Ed.) Book (1st ed.). New York.
- Silverstein Robert M., Webster Francis X., K. D. J. (2006). *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. (LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora, Ed.) (7^o ed.). Rio de Janeiro.
- Snyder, S. a, Drewes, J., Dickenson, E., Snyder, E. M., Vanderford, B. J., Bruce, G. M., & Pleus, R. C. (2009). *State of Knowledge of Endocrine Disruptors and Pharmaceuticals in Drinking Water*. *Water Intelligence Online* (Vol. 8). Retrieved from http://stats.lib.pdx.edu/proxy.php?url=http://search.proquest.com/docview/21338004?accountid=13265\nhttp://wq5rp2ll8a.search.serialssolutions.com/?ctx_ver=Z39.88-2004&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&rft_id=info:sid/ProQ:pollution&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:m
- Skoog Douglas A, Holler F. James, N. T. A. (2001). *Principios De Análisis Instrumental*. (M. G. Hill, Ed.) (5th ed.). Madrid.
- Waters.com. Disponível em: <<http://www.waters.com/waters/library.htm?cid=514434&lid=1530367>> Acesso em 20 de outubro de 2014.
- Wenzel, A., Müller, J., & Ternes, T. (2003). Study on endocrine disrupters in drinking water, 1–152. Retrieved from http://www.europa.nl/research/endocrine/pdf/drinking_water_en.pdf
- Willoughby Ross, Sheehan Ed, M. S. (2002). *A Global View of LC/MS* (2^o ed.). Pittsburg: Global View.
- Zapatán, R., Chacon, P., Rodas, P., & Redrován, H. (2012). Pentaclorofenol. Retrieved February 12, 2015, from <http://www.epa.gov/oppfead1/safety/spanish/healthcare/handbook/Spch10.pdf>

ANEXOS

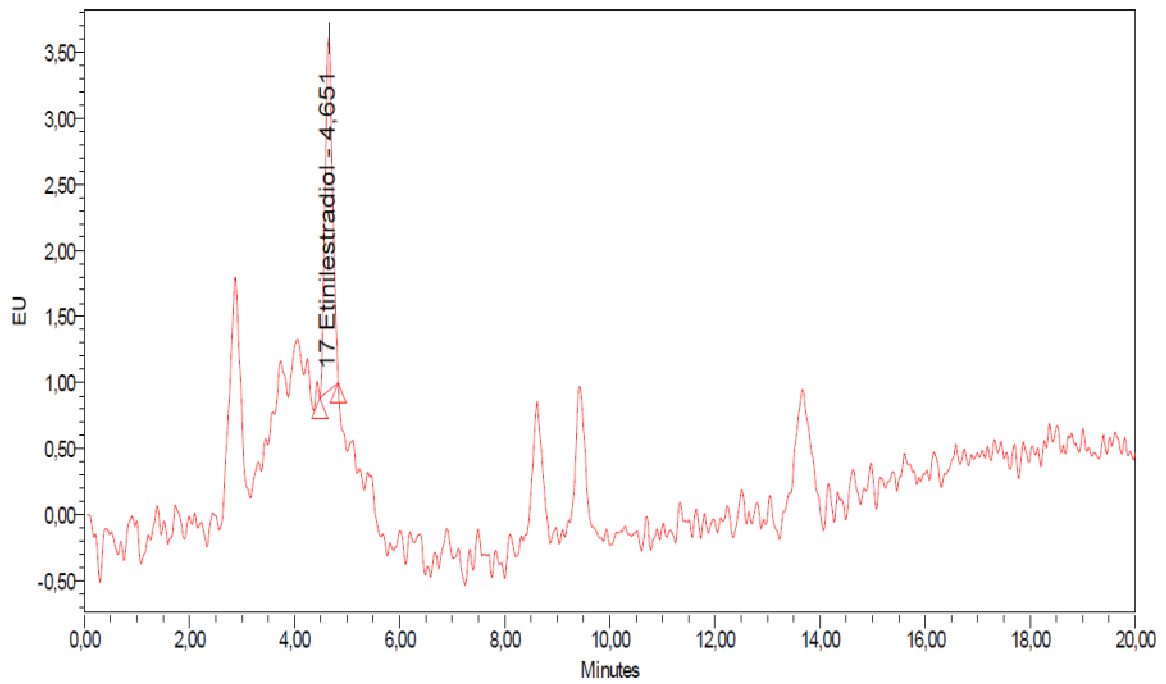
Anexo I - Injeção (2) dos pontos relativos à curva de calibração do 17 α -Ethinilestradiol.



SAMPLE INFORMATION

Sample Name: 3 ppb Etilnil	Acquired By: UERJ
Sample Type: Standard	Sample Set Name: Arroio Fundo
Vial: 1:B,1	Acq. Method Set: 17 a etinil e B Estradiol ISO
Injection #: 2	Processing Method: 17 Etilnilestradiol
Injection Volume: 15,00 ul	Channel Name: 2475ChB ex280/em306
Run Time: 20,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.: 2475ChB ex280/em306
Date Acquired: 26/01/2015 20:00:17 BRST	
Date Processed: 28/01/2015 14:34:33 BRST	

Auto-Scaled Chromatogram



Peak Results

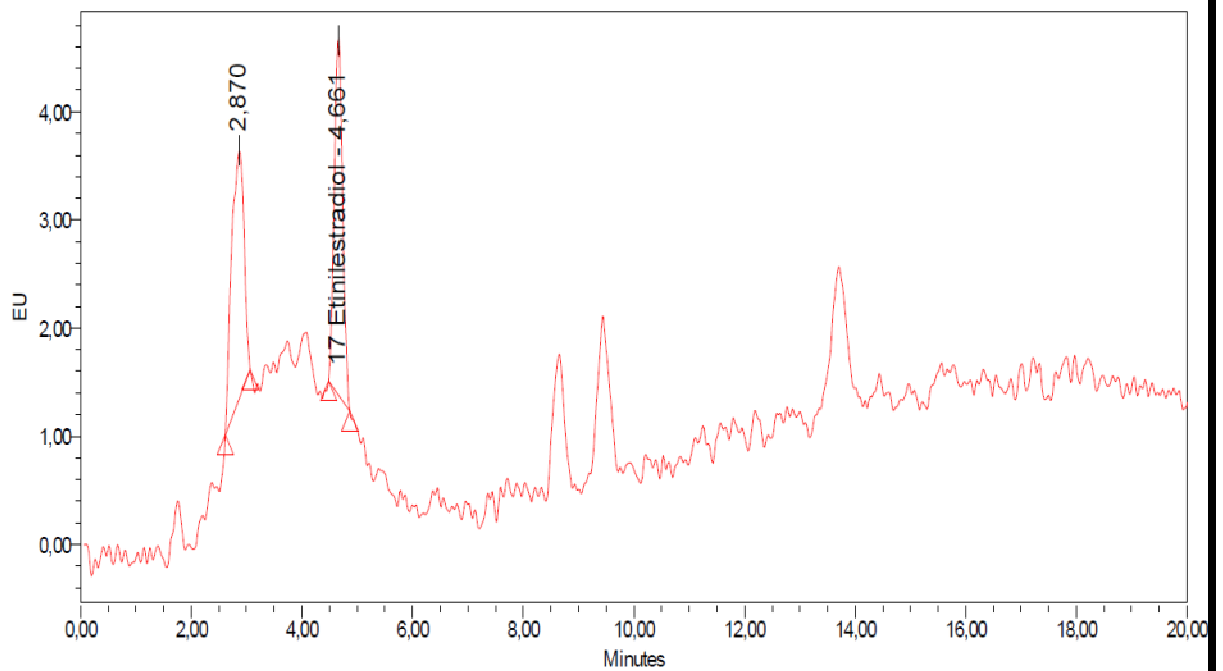
#	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	17 Etilnilestradiol	4,651	266318	26689	3,000	ppb

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: 4 ppb Etilnil	Acquired By: UERJ
Sample Type: Standard	Sample Set Name: Arroio Fundo
Vial: 1:B,1	Acq. Method Set: 17 a etinil e B Estradiol ISO
Injection #: 2	Processing Method: 17 Etinilestradiol
Injection Volume: 20,00 ul	Channel Name: 2475ChB ex280/em306
Run Time: 20,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.: 2475ChB ex280/em306

Date Acquired: 26/01/2015 18:59:12 BRST
Date Processed: 28/01/2015 14:34:33 BRST

Auto-Scaled Chromatogram



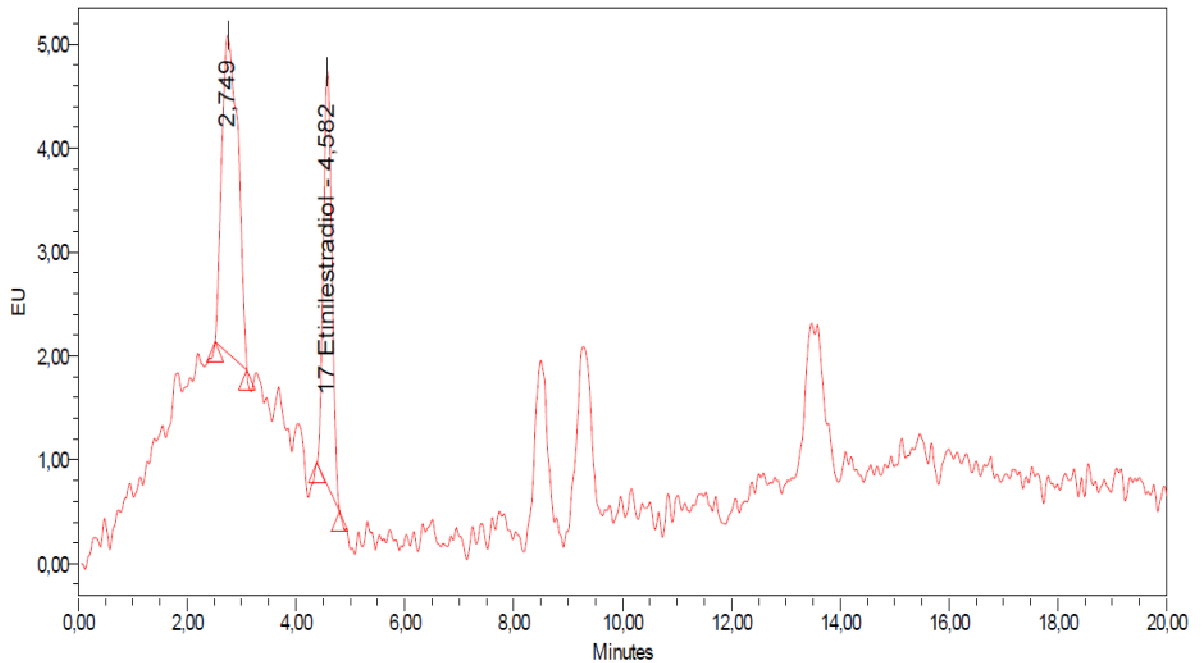
Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		2,870	362617	22907		
2	17 Etinilestradiol	4,661	347080	33028	4,000	ppb

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: 6 ppb Etilil	Acquired By: UERJ
Sample Type: Standard	Sample Set Name Arroio Fundo
Vial: 1:B,1	Acq. Method Set: 17 a etinil e B Estradiol ISO
Injection #: 2	Processing Method 17 Etililestradiol
Injection Volume: 30,00 ul	Channel Name: 2475ChB ex280/em306
Run Time: 20,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.: 2475ChB ex280/em306
Date Acquired: 26/01/2015 17:58:06 BRST	
Date Processed: 28/01/2015 14:34:33 BRST	

Auto-Scaled Chromatogram



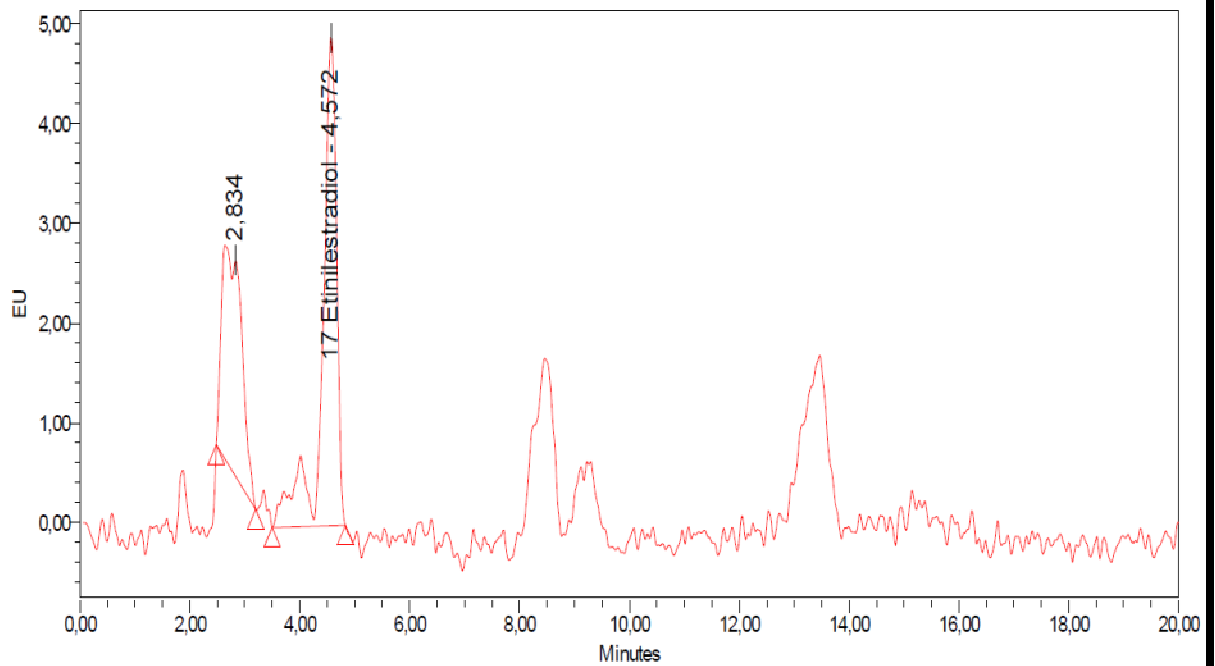
Peak Results

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		2,749	633369	30595		
2	17 Etililestradiol	4,582	435205	39938	6,000	ppb

SAMPLE INFORMATION

Sample Name: 10 ppb Etilil	Acquired By: UERJ
Sample Type: Standard	Sample Set Name: Arroio Fundo
Vial: 1:B,1	Acq. Method Set: 17 a etinil e B Estradiol ISO
Injection #: 2	Processing Method: 17 Etililestradiol
Injection Volume: 50,00 ul	Channel Name: 2475ChB ex280/em306
Run Time: 20,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.: 2475ChB ex280/em306
Date Acquired: 26/01/2015 15:55:35 BRST	
Date Processed: 28/01/2015 14:34:33 BRST	

Auto-Scaled Chromatogram

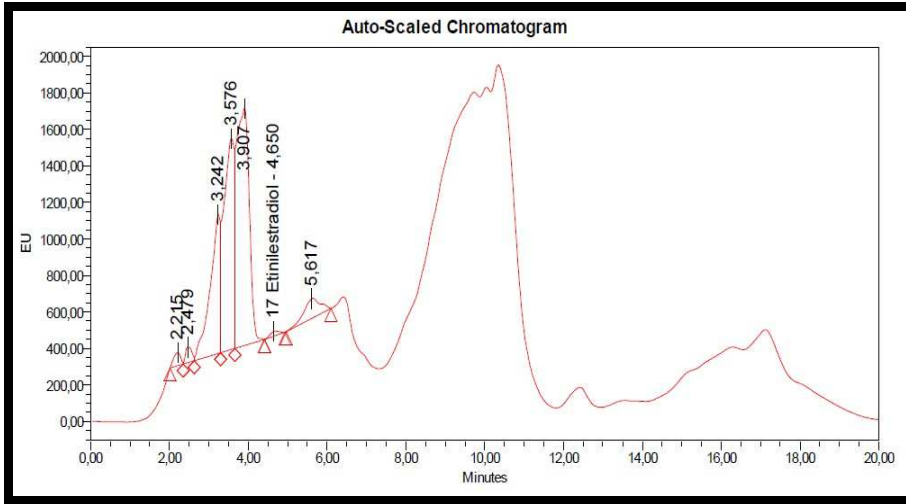


Peak Results

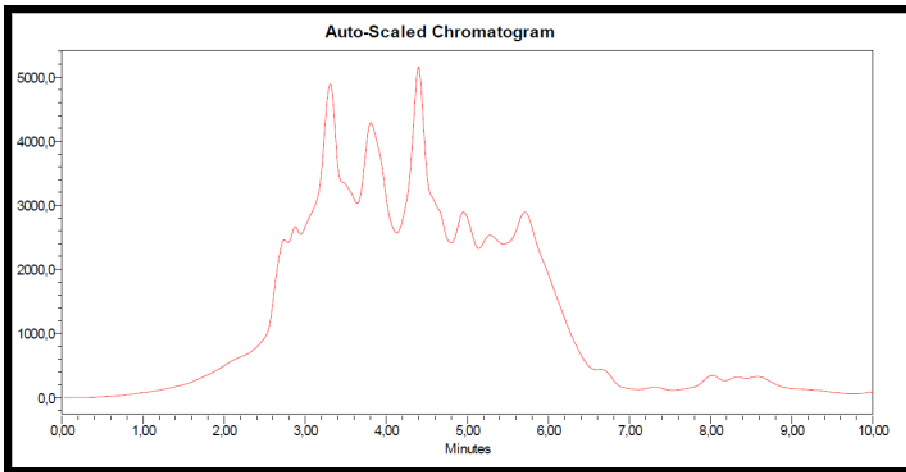
	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		2,834	566865	21651		
2	17 Etililestradiol	4,572	888735	49047	10,000	ppb

Anexo II - Injeção das amostras relativas às análises do 17 α -Ethinilestradiol através de cromatografia líquida para o rio Arroio Fundo.

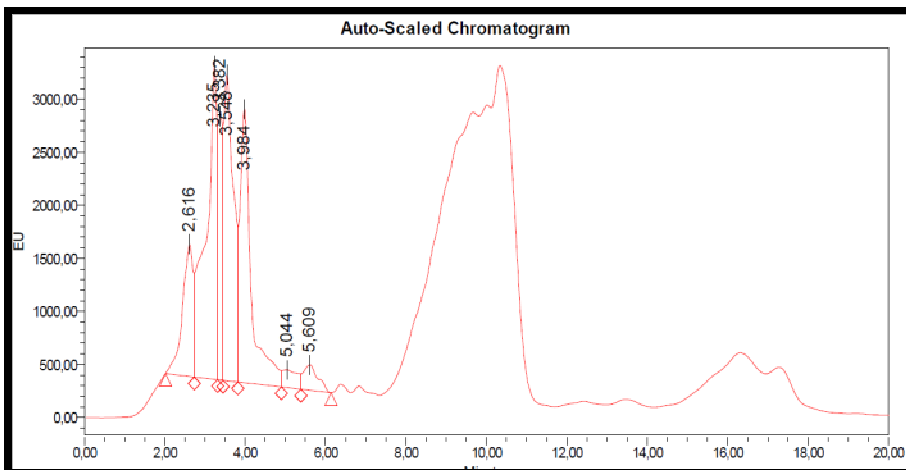
Amostra 090 Julho



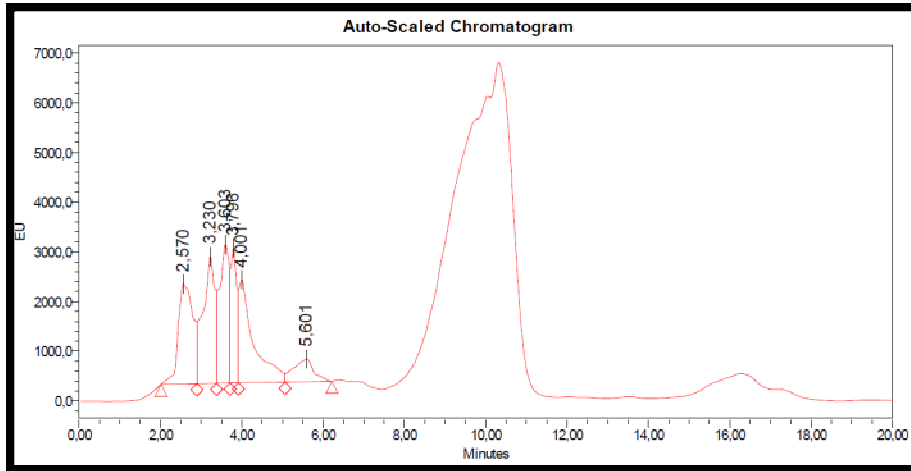
Amostra 0100 Julho



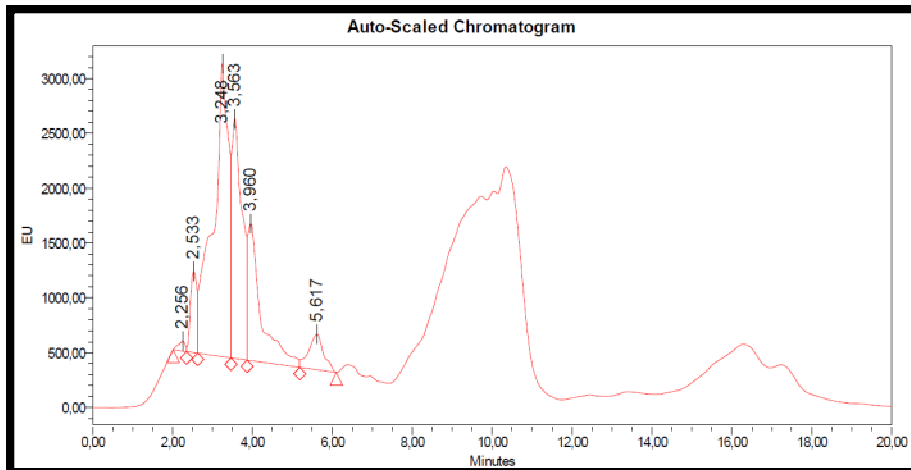
Amostra 090 Agosto



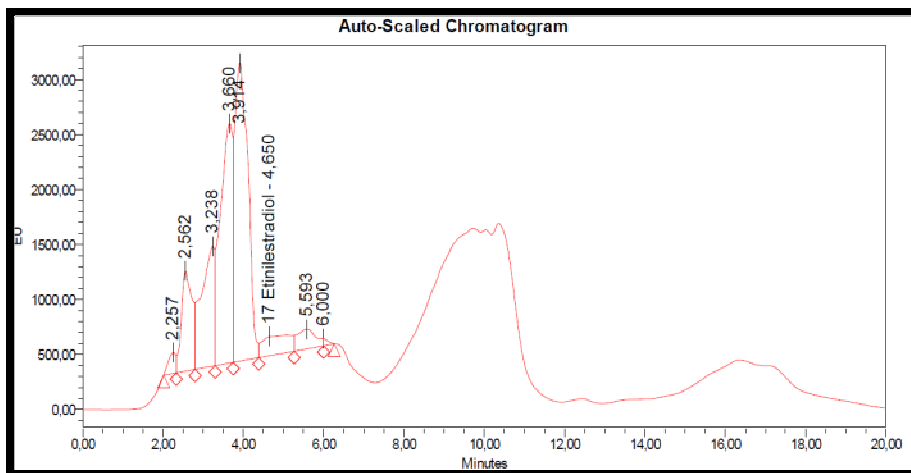
Amostra 0100 Agosto



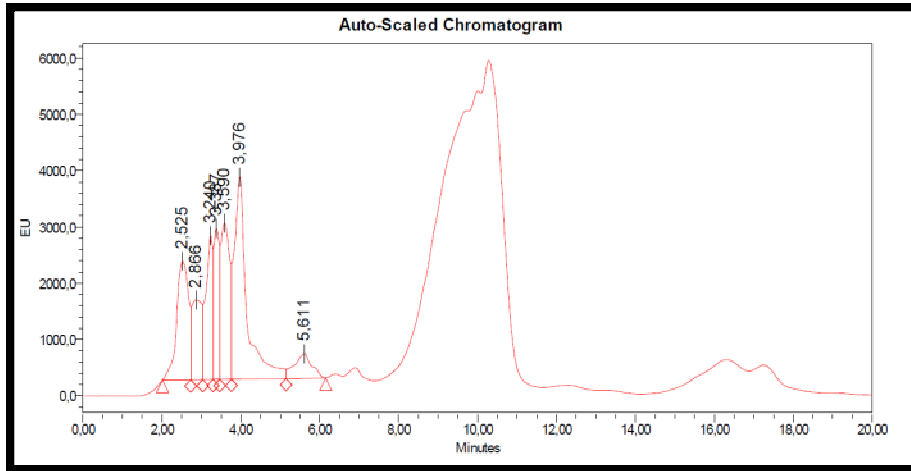
Amostra 090 Setembro



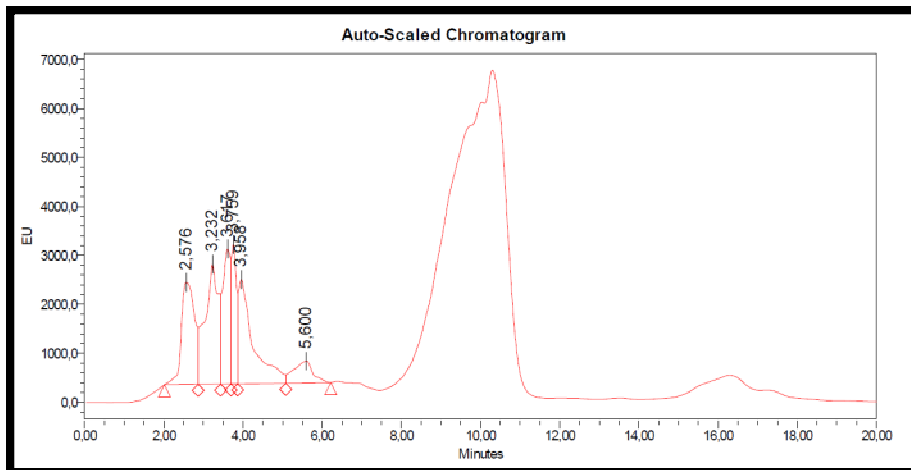
Amostra 0100 Setembro



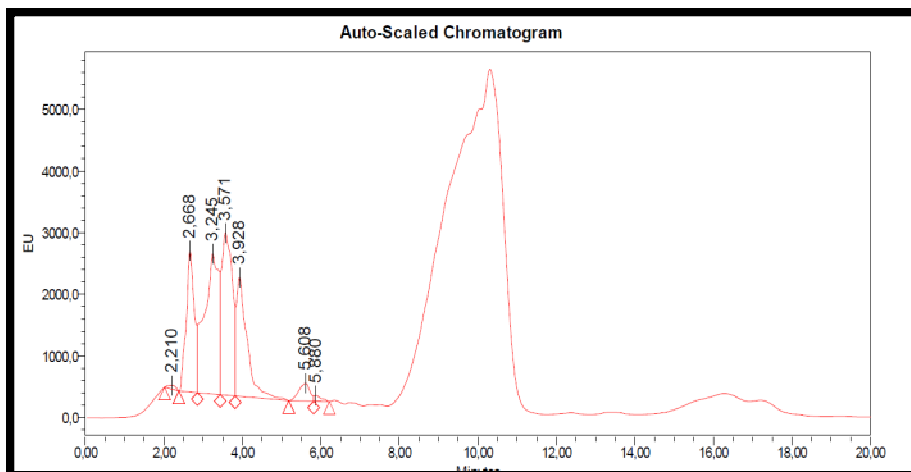
Amostra 090 Outubro



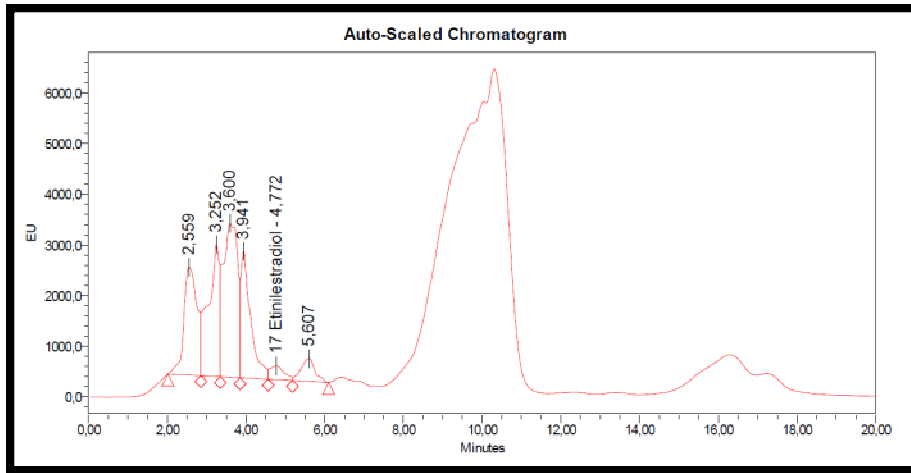
Amostra 0100 Outubro



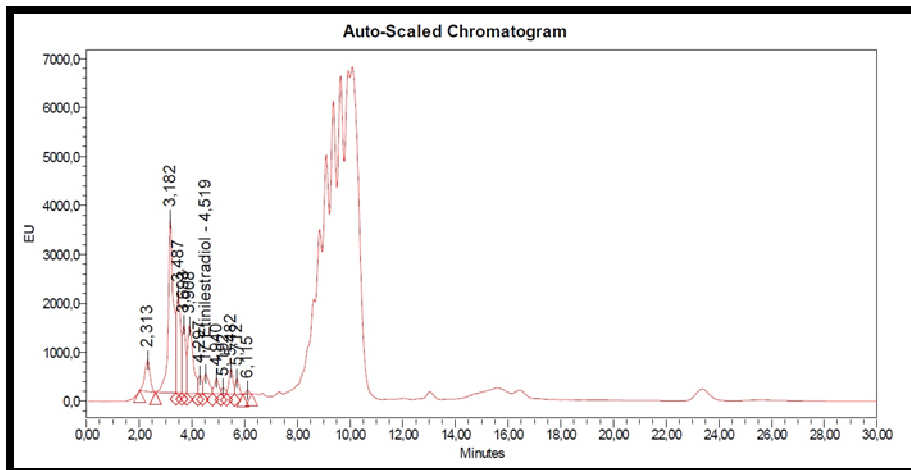
Amostra 090 Dezembro



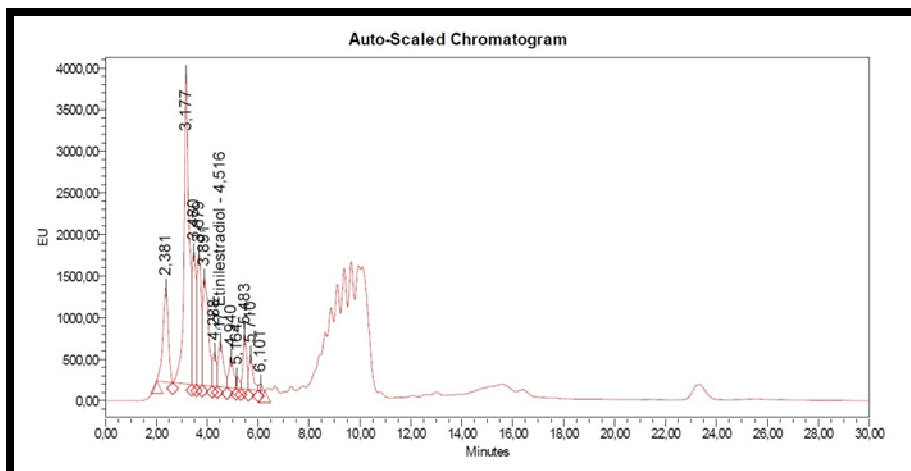
Amostra 0100 Dezembro



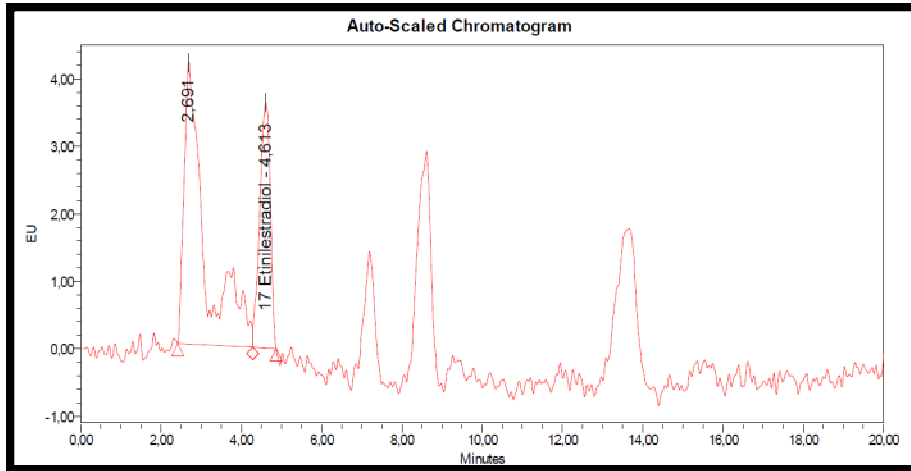
Amostra 090 Janeiro



Amostra 0100 Janeiro

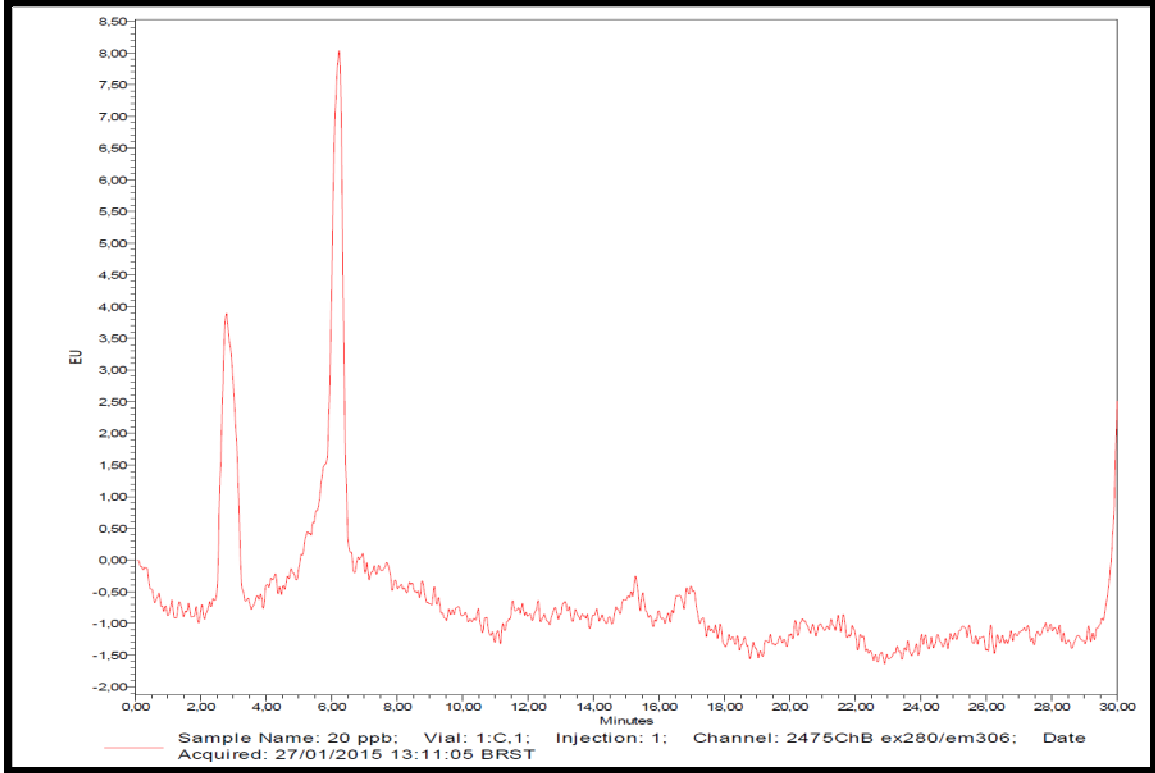


Spike padrão 6 ppb

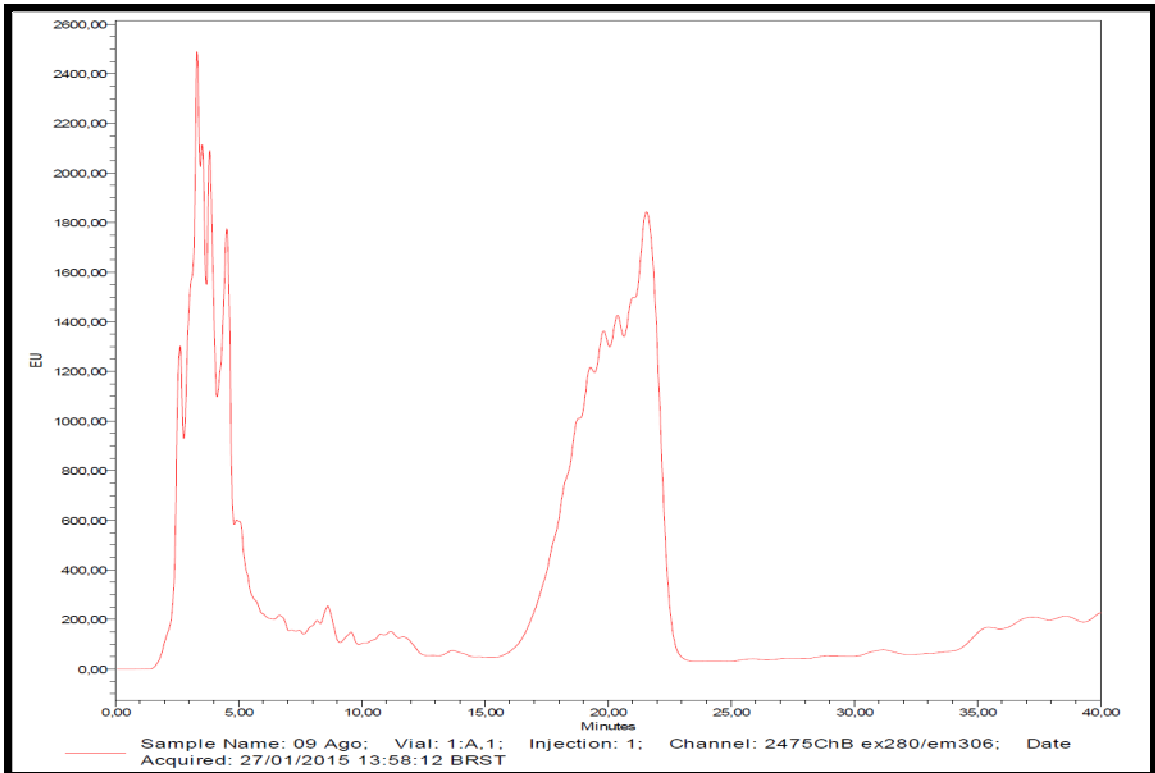


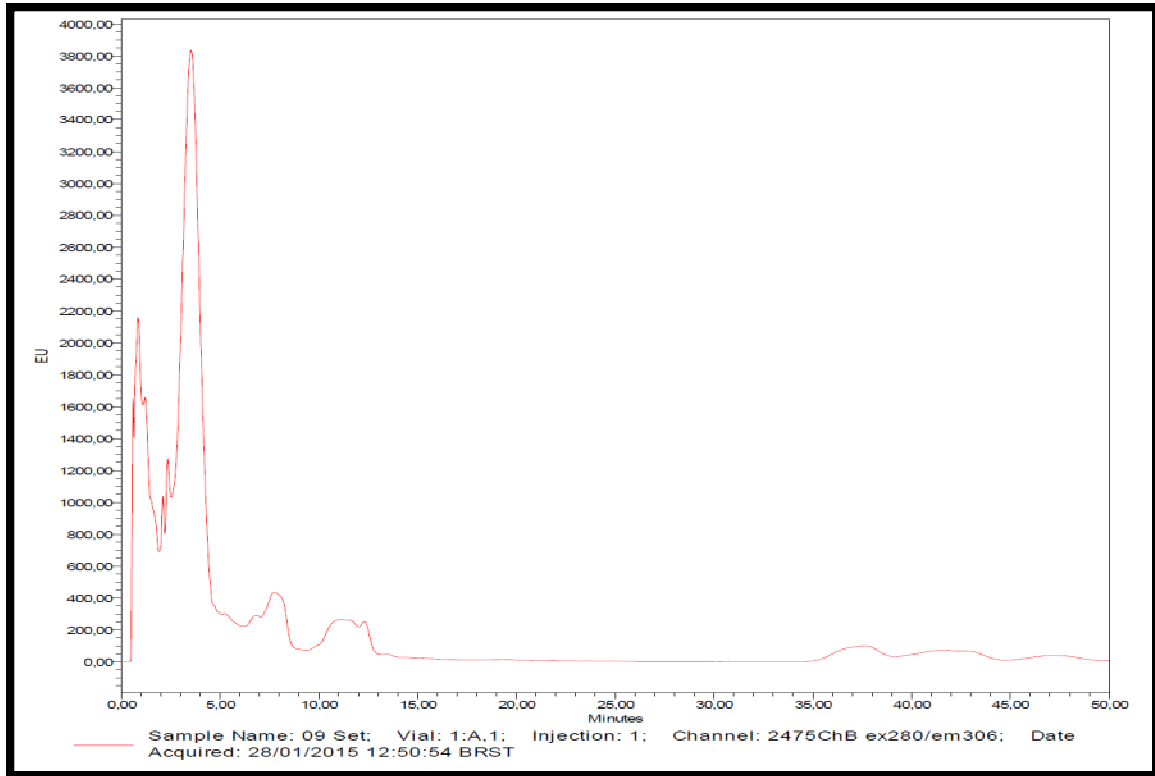
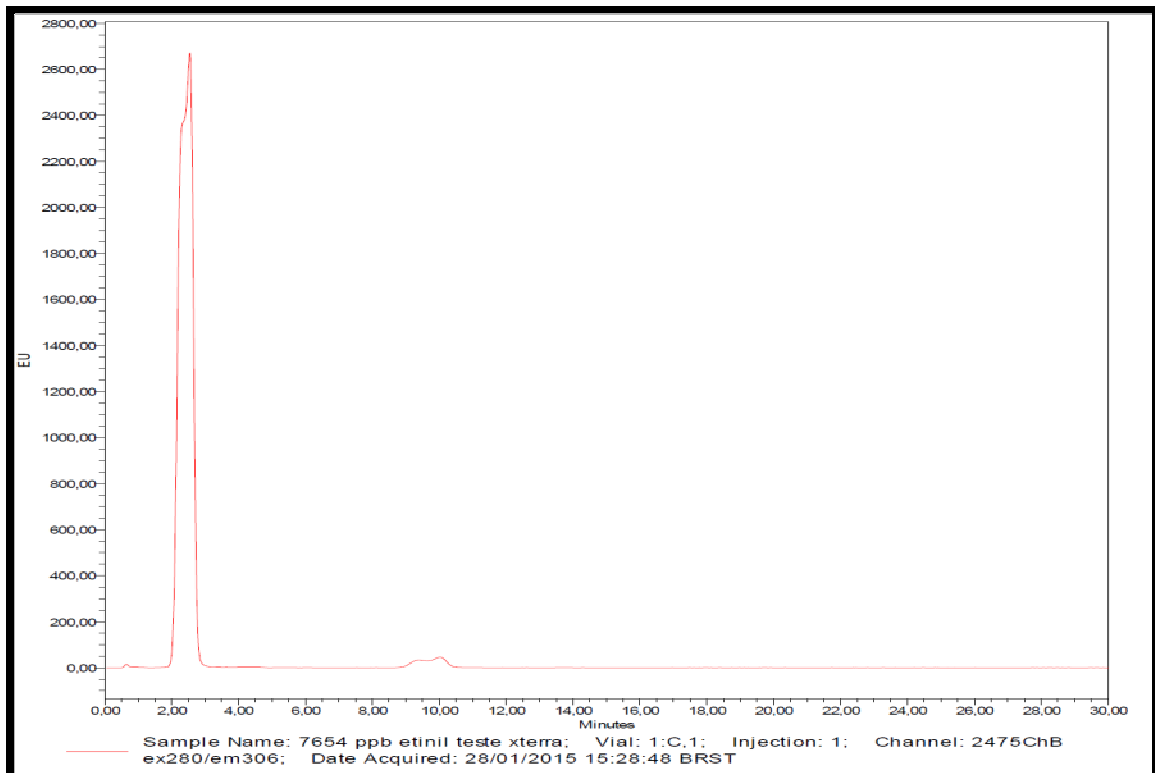
AnexoIII - Cromatograma das otimizações realizadas na metodologia cromatográfica visando aumento de seletividade para amostras do rio do Arroio Fundo.

Teste isocrático 2 padrão 20 ppb

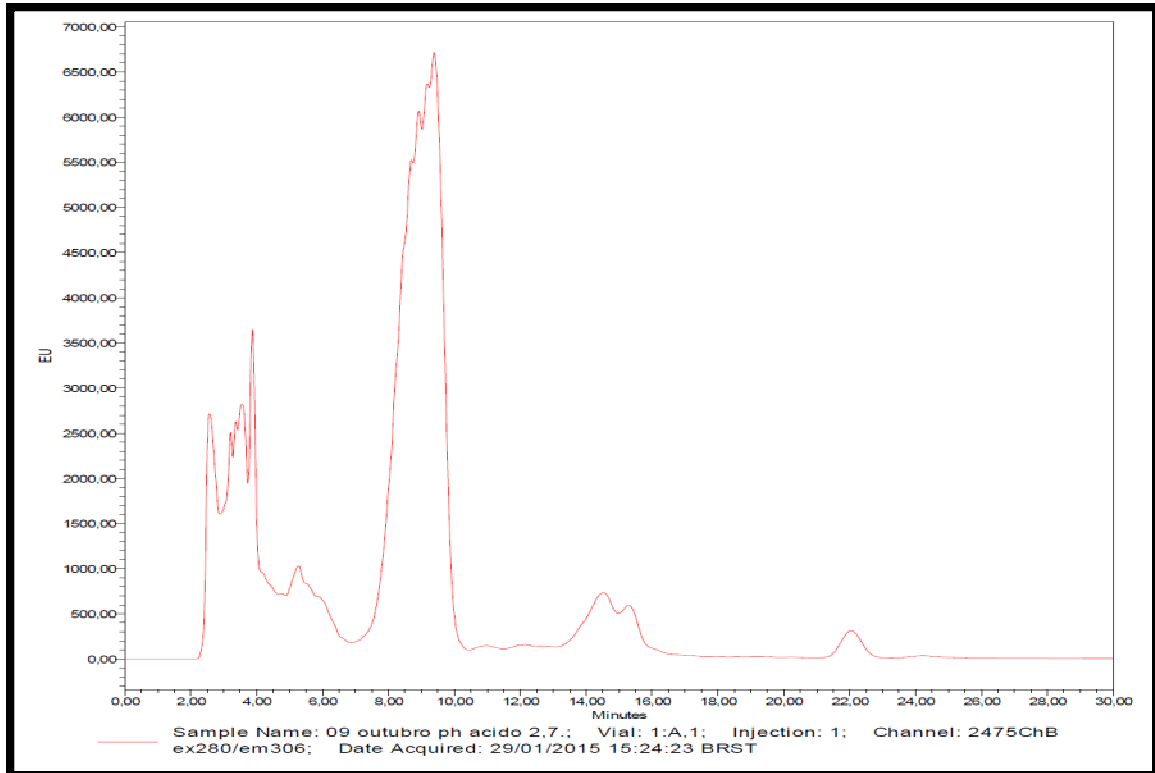


Teste isocrático 2 amostra 090 Agosto



Teste isocrático 3 coluna Xterra RP18 amostra 090 Setembro**Teste isocrático 3 Xterra RP18 padrão 7654 ppb**

Teste isocrático 2 pH 2,7 amostra 09 Outubro



Anexo IV – Resultados obtidos para os compostos através do experimento de adição padrão por espectrometria de massas.

Method: C:\Users\brjfk\l\Desktop\Hormonios_waters.PROMethDB\hormonios.mdb 14 Mar 2015 11:00:47
Calibration: 14 Mar 2015 11:08:28

Name: 20150304-001, Date: 04-Mar-2015, Time: 16:02:28, ID: , Description: Adicao Pad. 5.1

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilnil estradiol	295.2 > 145.1	2.11	617.626		617.626	bb	77.4	-55.0
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.08	147.359		147.359	MM	17.3	-59.8
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	15244.150		15244.150	bb	40.1	-8.8
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.27	37693.086		37693.086	MM	211.5	127.5
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	6055.322		6055.322	bb	151.4	136.6
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.10	1715.924		1715.924	bb	21.5	-59.5

Name: 20150304-002, Date: 04-Mar-2015, Time: 16:08:55, ID: , Description: Adicao Pad. 5.1

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilnil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	666.417		666.417	bb	80.0	-53.5
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.08	163.922		163.922	MM	17.7	-58.8
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.34	16115.371		16115.371	bb	42.7	-2.9
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.27	33877.965		33877.965	MM	192.3	106.8
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	5712.310		5712.310	bb	142.5	122.7
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.10	1690.399		1690.399	bb	21.3	-59.8

Name: 20150304-003, Date: 04-Mar-2015, Time: 16:15:17, ID: , Description: Adicao Pad. 5.1

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilnil estradiol	295.2 > 145.1	2.11	564.316		564.316	bb	74.7	-56.6
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1					MM-		
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	16074.565		16074.565	bb	42.6	-3.1
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.27	36521.664		36521.664	MM	205.6	121.1
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	6529.227		6529.227	bb	163.7	155.8
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.10	1572.811		1572.811	bb	20.5	-61.3

Name: 20150304-004, Date: 04-Mar-2015, Time: 16:21:43, ID: , Description: Adicao Pad. 5.2

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilnil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	1207.773		1207.773	bb	107.9	-47.9
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.07	361.611		361.611	bb	22.6	-56.5
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.34	19023.871		19023.871	bb	51.4	-2.9
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.29	29528.520		29528.520	MM	170.4	52.1
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	5809.333		5809.333	bb	145.1	90.9
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.09	4086.944		4086.944	bb	37.8	-40.1

Name: 20150304-005, Date: 04-Mar-2015, Time: 16:28:11, ID: , Description: Adicao Pad. 5.2

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilnil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	993.540		993.540	bb	96.8	-53.2
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.07	381.509		381.509	MM	23.1	-55.6
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	19082.238		19082.238	bb	51.6	-2.6
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.28	27035.318		27035.318	MM	157.8	40.9
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	5173.952		5173.952	bb	128.6	69.2
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.10	4095.475		4095.475	MM	37.8	-40.0

Name: 20150304-006, Date: 04-Mar-2015, Time: 16:34:39, ID: , Description: Adicao Pad. 5.2

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	881.354		881.354	bb	91.1	-56.0
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.07	463.171		463.171	MM	25.1	-51.7
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	19399.934		19399.934	bb	52.6	-0.8
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.28	27948.193		27948.193	MM	162.4	45.0
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.83	5780.019		5780.019	bb	144.3	89.9
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.09	5115.652		5115.652	bb	44.8	-28.9

Name: 20150304-007, Date: 04-Mar-2015, Time: 16:41:07, ID: , Description: Adicao Pad. 5.3

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	1181.845		1181.845	bb	106.6	-74.2
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1							
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.34	35527.891		35527.891	bb	100.8	-4.9
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.27	65737.703		65737.703	MM	352.9	58.3
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.83	6021.950		6021.950	bb	150.6	-1.6
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.09	6961.289		6961.289	bb	57.5	-54.4

Name: 20150304-008, Date: 04-Mar-2015, Time: 16:47:35, ID: , Description: Adicao Pad. 5.3

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	1139.574		1139.574	bb	104.4	-74.7
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.06	385.150		385.150	bb	23.2	-77.7
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	35352.551		35352.551	bb	100.3	-5.4
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.28	63497.539		63497.539	MM	341.6	53.2
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	6796.900		6796.900	bb	170.7	11.6
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.10	5998.412		5998.412	bb	50.9	-59.6

Name: 20150304-009, Date: 04-Mar-2015, Time: 16:54:03, ID: , Description: Adicao Pad. 5.3

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	1274.393		1274.393	bb	111.3	-73.0
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.05	454.862		454.862	bb	24.9	-76.0
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.34	35721.840		35721.840	bb	101.4	-4.3
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.28	67254.047		67254.047	MM	360.6	61.7
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	7979.528		7979.528	bb	201.4	31.6
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.10	7452.059		7452.059	bb	60.8	-51.7

Name: 20150304-010, Date: 04-Mar-2015, Time: 17:00:31, ID: , Description: Adicao Pad. 6.1

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	1059.326		1059.326	bb	100.2	-41.7
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.07	584.238		584.238	bb	28.1	-34.6
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	18284.945		18284.945	bb	49.2	11.9
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.28	22289.922		22289.922	bb	133.9	43.9
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	11011.233		11011.233	bb	280.0	337.6
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.10	3509.106		3509.106	bb	33.8	-36.3

Name: 20150304-011, Date: 04-Mar-2015, Time: 17:06:58, ID: , Description: Adicao Pad. 6.1

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	890.965		890.965	bb	91.5	-46.8
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.06	747.289		747.289	MM	32.2	-25.1
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	18537.250		18537.250	bb	50.0	13.6
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.28	22412.189		22412.189	bb	134.5	44.6
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	10637.272		10637.272	bb	270.3	322.4
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.09	3334.378		3334.378	bb	32.6	-38.5

Name: 20150304-012, Date: 04-Mar-2015, Time: 17:13:27, ID: , Description: Adicao Pad. 6.1

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	988.249		988.249	bb	96.6	-43.9
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.07	577.077		577.077	bb	28.0	-46.2
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	18385.998		18385.998	bb	49.5	12.6
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.28	24412.027		24412.027	bb	144.6	55.5
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	9779.053		9779.053	bb	248.1	287.6
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.10	4214.510		4214.510	MM	38.6	-27.1

Name: 20150304-013, Date: 04-Mar-2015, Time: 17:19:55, ID: , Description: Adicao Pad. 6.2

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	1303.747		1303.747	bb	112.8	-45.5
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.08	577.077		577.077	bb	28.0	-46.2
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	18752.002		18752.002	bb	50.6	-4.5
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.28	22745.904		22745.904	bb	136.2	21.6
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.83	9555.151		9555.151	bb	242.3	218.8
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.09	4599.417		4599.417	bb	41.3	-34.5

Name: 20150304-014, Date: 04-Mar-2015, Time: 17:26:22, ID: , Description: Adicao Pad. 6.2

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	1177.160		1177.160	bb	106.3	-48.6
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.07	404.933		404.933	bb	23.7	-54.4
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	18383.125		18383.125	bb	49.5	-6.6
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.29	20299.736		20299.736	bb	123.8	10.6
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	9727.076		9727.076	bb	246.7	224.6
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.09	4925.916		4925.916	MM	43.5	-30.9

Name: 20150304-015, Date: 04-Mar-2015, Time: 17:32:44, ID: , Description: Adicao Pad. 6.2

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	1000.430		1000.430	bb	97.2	-53.0
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.06	518.209		518.209	MM	26.5	-49.0
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	18015.166		18015.166	bb	48.4	-8.6
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.28	21700.715		21700.715	bb	130.9	16.9
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	6679.877		6679.877	bb	167.6	120.6
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.10	4232.110		4232.110	MM	38.7	-38.5

Name: 20150304-016, Date: 04-Mar-2015, Time: 17:39:10, ID: , Description: Adicao Pad. 6.3

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	2785.831		2785.831	bb	189.3	-54.2
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.07	1363.541		1363.541	MM	47.5	-54.3
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	37697.039		37697.039	bb	107.3	1.2
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.29	53764.469		53764.469	MM	292.6	31.2
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	11229.680		11229.680	bb	285.7	86.7
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.10	11516.195		11516.195	bb	88.7	-29.6

Name: 20150304-017, Date: 04-Mar-2015, Time: 17:45:38, ID: , Description: Adicao Pad. 6.3

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	2836.208		2836.208	bb	191.9	-53.5
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.07	1032.996		1032.996	MM	39.3	-62.2
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	37672.895		37672.895	bb	107.2	1.2
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.29	53819.180		53819.180	MM	292.8	31.3
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	12421.676		12421.676	bb	316.6	107.0
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.09	12695.548		12695.548	bb	96.8	-23.2

Name: 20150304-018, Date: 04-Mar-2015, Time: 17:52:06, ID: , Description: Adicao Pad. 6.3

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	2783.650		2783.650	bb	189.2	-54.2
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.08	1673.773		1673.773	bb	55.2	-46.9
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	37491.945		37491.945	bb	106.7	0.7
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.29	52328.641		52328.641	MM	285.3	27.9
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	10693.046		10693.046	bb	271.8	77.6
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.09	13093.598		13093.598	bb	99.6	-21.0

Name: 20150304-019, Date: 04-Mar-2015, Time: 17:58:33, ID: , Description: Adicao Pad. 7.1

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	2101.410		2101.410	bb	154.0	-10.5
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.08	877.764		877.764	bb	35.4	-17.6
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	13980.693		13980.693	bb	36.4	-17.4
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.29	23401.816		23401.816	bb	139.5	50.0
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.85	7122.662		7122.662	bb	179.1	179.9
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.10	8234.979		8234.979	bb	66.2	24.9

Name: 20150304-020, Date: 04-Mar-2015, Time: 18:05:01, ID: , Description: Adicao Pad. 7.1

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilil estradiol	295.2 > 145.1	2.09	2077.542		2077.542	bb	152.8	-11.2
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.08	930.013		930.013	bb	36.7	-14.6
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	13980.447		13980.447	bb	36.4	-17.4
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.29	22573.811		22573.811	bb	135.3	45.5
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	8470.002		8470.002	bb	214.1	234.5
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.09	8051.007		8051.007	bb	65.0	22.6

Name: 20150304-021, Date: 04-Mar-2015, Time: 18:11:29, ID: , Description: Adicao Pad. 7.1

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilnil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	1873.339		1873.339	bb	142.2	-17.3
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.07	992.215		992.215	MM	38.3	-11.0
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	13287.925		13287.925	bb	34.3	-22.1
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.29	23368.721		23368.721	bb	139.3	49.8
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	8009.415		8009.415	bb	202.1	215.9
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.10	7932.037		7932.037	bb	64.1	21.0

Name: 20150304-022, Date: 04-Mar-2015, Time: 18:17:50, ID: , Description: Adicao Pad. 7.2

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilnil estradiol	295.2 > 145.1	2.09	1899.163		1899.163	bb	143.6	-30.6
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.07	1541.023		1541.023	bb	51.9	-0.2
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	14227.368		14227.368	bb	37.1	-30.0
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.30	22900.898		22900.898	bb	137.0	22.3
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	6208.653		6208.653	bb	155.4	104.5
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.09	7636.767		7636.767	bb	62.1	-1.4

Name: 20150304-023, Date: 04-Mar-2015, Time: 18:24:17, ID: , Description: Adicao Pad. 7.2

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilnil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	2186.365		2186.365	bb	158.4	-23.5
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.07	1329.942		1329.942	MM	46.7	-10.3
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	14306.678		14306.678	bb	37.3	-29.6
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.30	21453.199		21453.199	bb	129.7	15.8
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	5625.002		5625.002	bb	140.3	84.6
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.10	8452.759		8452.759	bb	67.7	7.5

Name: 20150304-024, Date: 04-Mar-2015, Time: 18:30:38, ID: , Description: Adicao Pad. 7.2

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilnil estradiol	295.2 > 145.1	2.09	2150.351		2150.351	bb	156.5	-24.4
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.07	1668.444		1668.444	bb	55.1	5.9
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	14328.824		14328.824	bb	37.4	-29.4
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.30	23788.924		23788.924	bb	141.4	26.3
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	7088.083		7088.083	bb	178.2	134.5
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.09	7490.683		7490.683	MM	61.1	-3.0

Name: 20150304-025, Date: 04-Mar-2015, Time: 18:37:05, ID: , Description: Adicao Pad. 7.3

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilnil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	3640.193		3640.193	bb	233.4	-43.5
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.08	2769.485		2769.485	bb	82.4	-20.8
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	28198.281		28198.281	bb	78.9	-25.6
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.30	49135.539		49135.539	bb	269.2	20.7
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.85	9360.348		9360.348	bb	237.2	55.0
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.10	16100.858		16100.858	bb	120.2	-4.6

Name: 20150304-026, Date: 04-Mar-2015, Time: 18:43:32, ID: , Description: Adicao Pad. 7.3

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	4026.160		4026.160	bb	253.3	-38.7
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.08	2040.447		2040.447	bb	64.3	-38.2
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	28092.676		28092.676	bb	78.6	-25.9
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.30	48013.797		48013.797	bb	263.6	18.2
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	10652.630		10652.630	bb	270.7	77.0
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.09	16360.591		16360.591	bb	122.0	-3.2

Name: 20150304-027, Date: 04-Mar-2015, Time: 18:50:00, ID: , Description: Adicao Pad. 7.3

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	5544.929		5544.929	bb	331.7	-19.7
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.08	3273.712		3273.712	bb	94.9	-8.7
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	27904.268		27904.268	bb	78.0	-26.4
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.30	48199.551		48199.551	bb	264.5	18.6
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	10331.161		10331.161	bb	262.4	71.5
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.09	16162.933		16162.933	bb	120.6	-4.3

Name: 20150304-028, Date: 04-Mar-2015, Time: 18:56:28, ID: , Description: Adicao Pad. 8.1

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	986.219		986.219	bb	96.5	-43.9
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.06	647.756		647.756	MM	29.7	-30.9
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.34	15322.386		15322.386	bb	40.4	-8.3
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.29	27888.775		27888.775	bb	162.1	74.3
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.85	4984.338		4984.338	bb	123.6	93.2
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.10	5550.886		5550.886	bb	47.8	-9.8

Name: 20150304-029, Date: 04-Mar-2015, Time: 19:02:56, ID: , Description: Adicao Pad. 8.1

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	923.660		923.660	bb	93.2	-45.8
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.08	585.345		585.345	bb	28.2	-34.5
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.34	15069.358		15069.358	bb	39.6	-10.0
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.28	24398.943		24398.943	bb	144.5	55.4
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	5416.663		5416.663	bb	134.9	110.7
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.09	5974.677		5974.677	bb	50.7	-4.3

Name: 20150304-030, Date: 04-Mar-2015, Time: 19:09:24, ID: , Description: Adicao Pad. 8.1

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etilil estradiol	295.2 > 145.1	2.09	872.993		872.993	bb	90.6	-47.3
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.08	598.288		598.288	bb	28.5	-33.7
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	15313.103		15313.103	bb	40.3	-8.3
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.28	27675.682		27675.682	bb	161.0	73.1
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	5644.472		5644.472	bb	140.8	120.0
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.10	5824.613		5824.613	bb	49.7	-6.3

Name: 20150304-031, Date: 04-Mar-2015, Time: 19:15:52, ID: , Description: Adicao Pad. 8.2

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etnil estradiol	295.2 > 145.1							
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1							
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106							
4	4 Pentaclorofenol	264.9					MM-		
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.79	2898.116		2898.116	bb	69.5	-8.5
6	6 Estrona	269.2 > 145.1							

Name: 20150304-032, Date: 04-Mar-2015, Time: 19:22:20, ID: , Description: Adicao Pad. 8.2

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etnil estradiol	295.2 > 145.1							
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1							
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106							
4	4 Pentaclorofenol	264.9					MM-		
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.85	2638.118		2638.118	bb	62.8	-17.4
6	6 Estrona	269.2 > 145.1							

Name: 20150304-033, Date: 04-Mar-2015, Time: 19:28:48, ID: , Description: Adicao Pad. 8.2

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etnil estradiol	295.2 > 145.1							
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1							
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106							
4	4 Pentaclorofenol	264.9					MM-		
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	2519.147		2519.147	bb	59.7	-21.5
6	6 Estrona	269.2 > 145.1							

Name: 20150304-034, Date: 04-Mar-2015, Time: 19:35:15, ID: , Description: Adicao Pad. 8.3

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etnil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	2473.098		2473.098	bb	173.2	-58.1
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.07	2511.058		2511.058	bb	76.0	-26.9
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	34105.797		34105.797	bb	96.6	-8.9
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.29	56303.926		56303.926	bb	305.4	36.9
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	7288.615		7288.615	bb	183.4	19.9
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.09	11767.014		11767.014	bb	90.5	-28.2

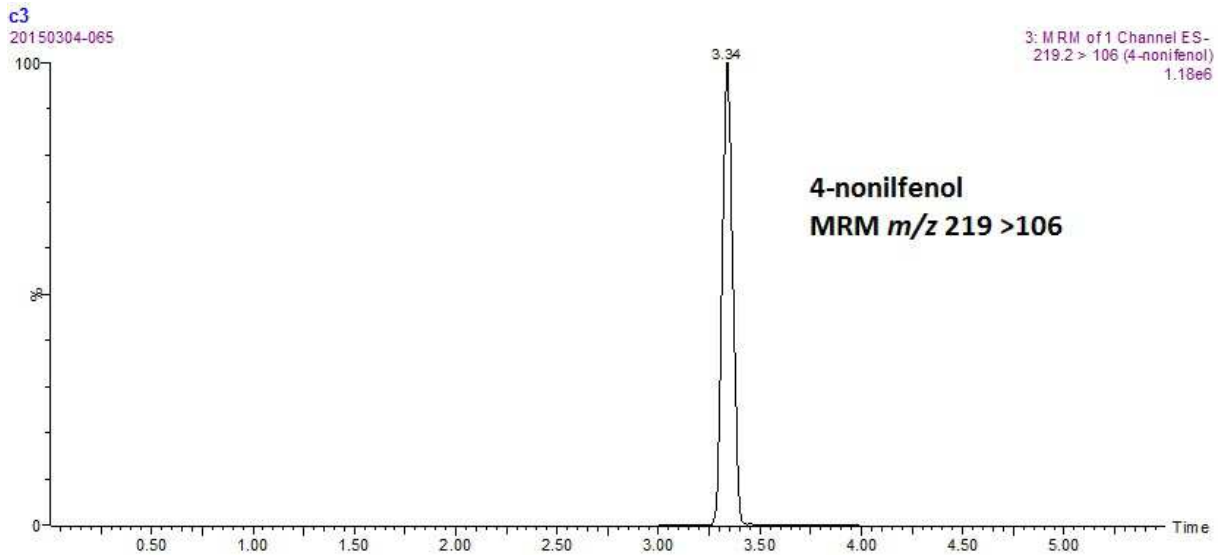
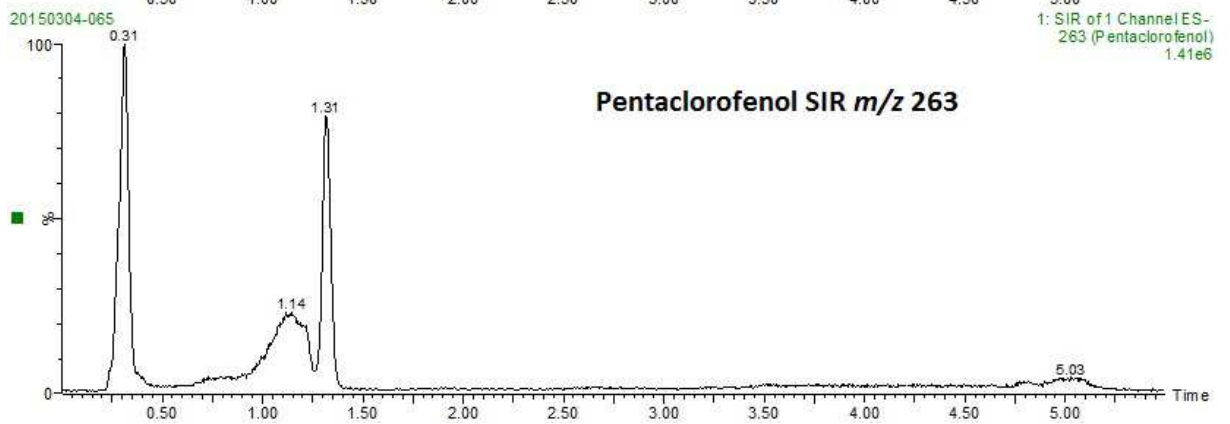
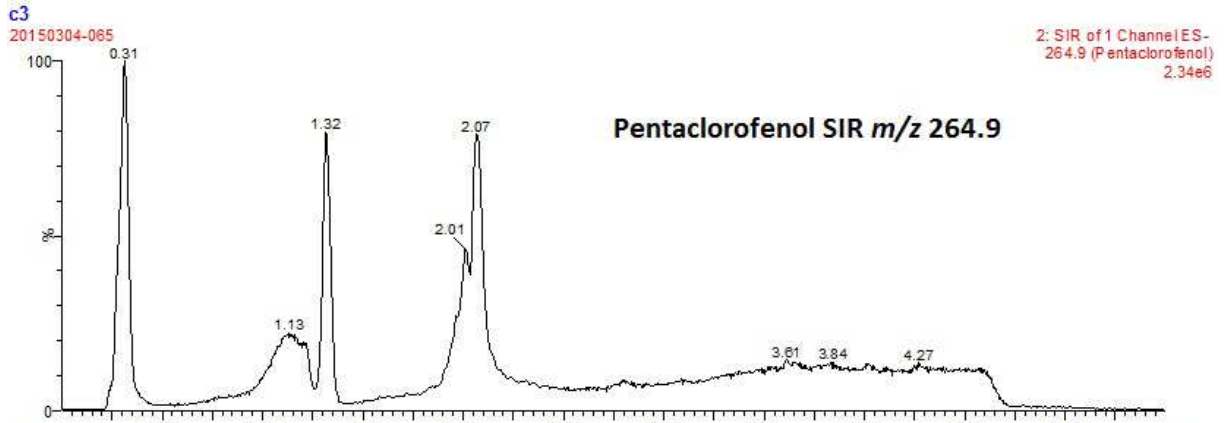
Name: 20150304-035, Date: 04-Mar-2015, Time: 19:41:43, ID: , Description: Adicao Pad. 8.3

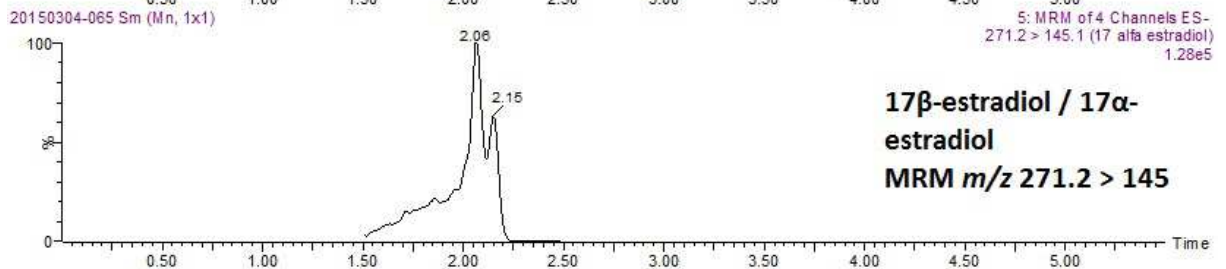
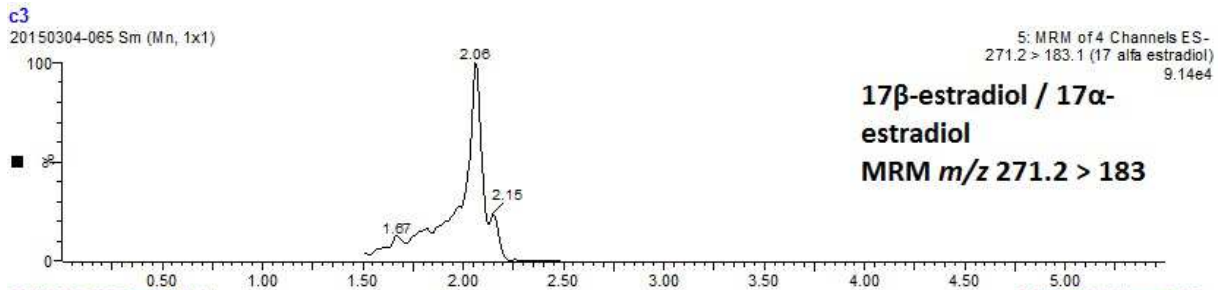
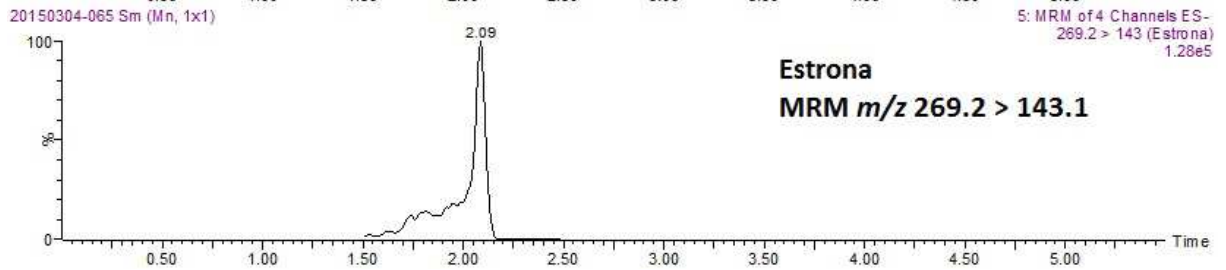
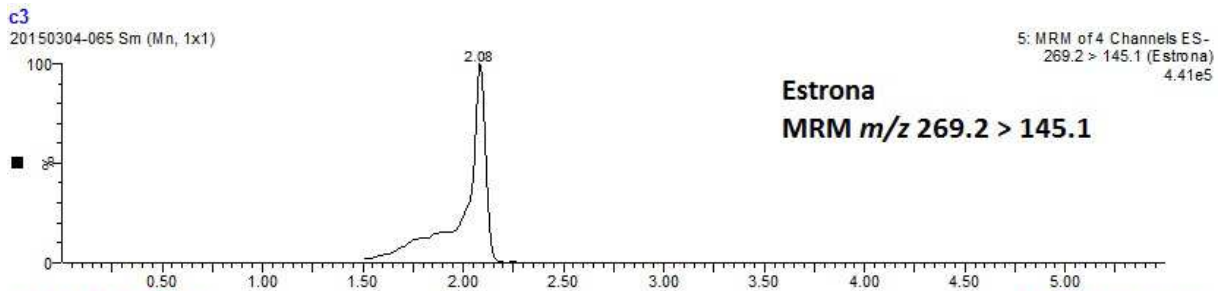
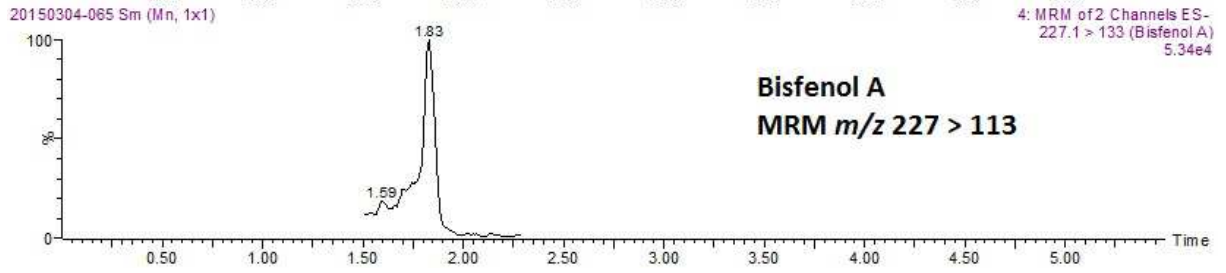
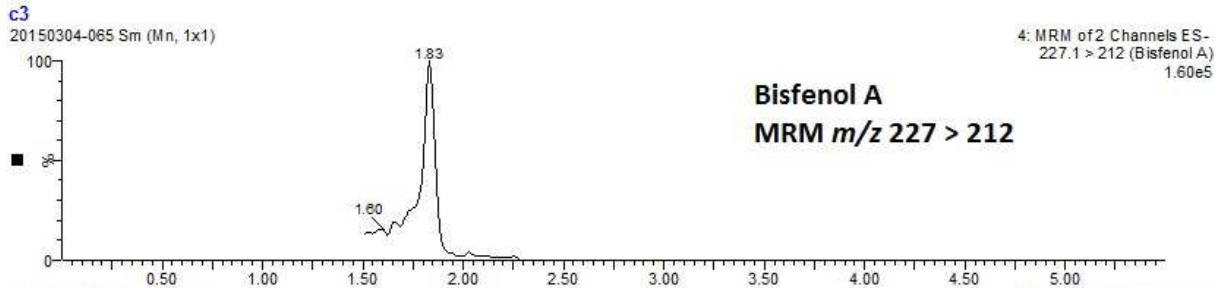
	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etnil estradiol	295.2 > 145.1	2.10	2783.187		2783.187	bb	189.2	-54.2
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.07	2429.948		2429.948	bb	74.0	-28.9
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.35	32982.555		32982.555	bb	93.2	-12.1
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.29	55054.391		55054.391	bb	299.1	34.1
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	6858.251		6858.251	bb	172.3	12.6
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.10	11255.536		11255.536	bb	86.9	-31.0

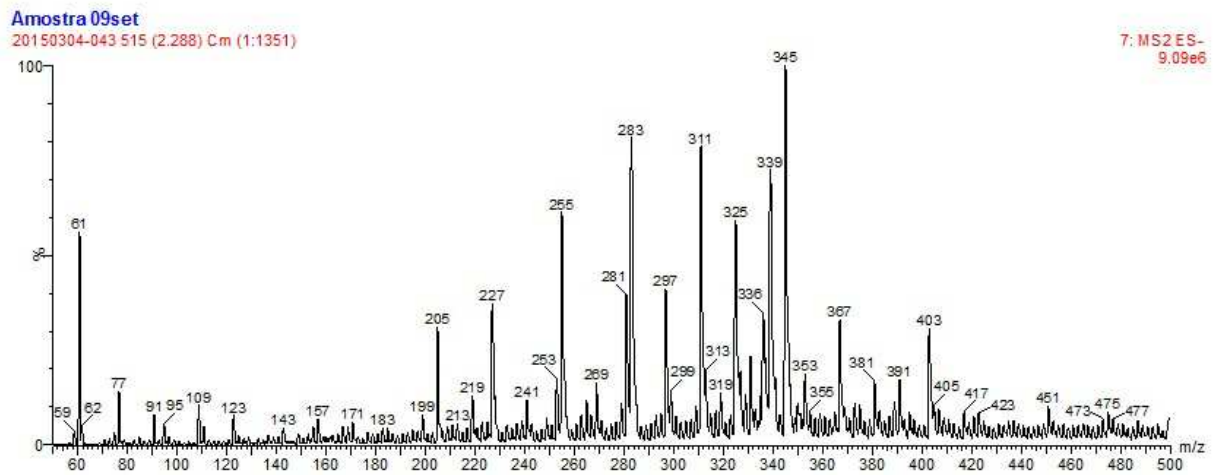
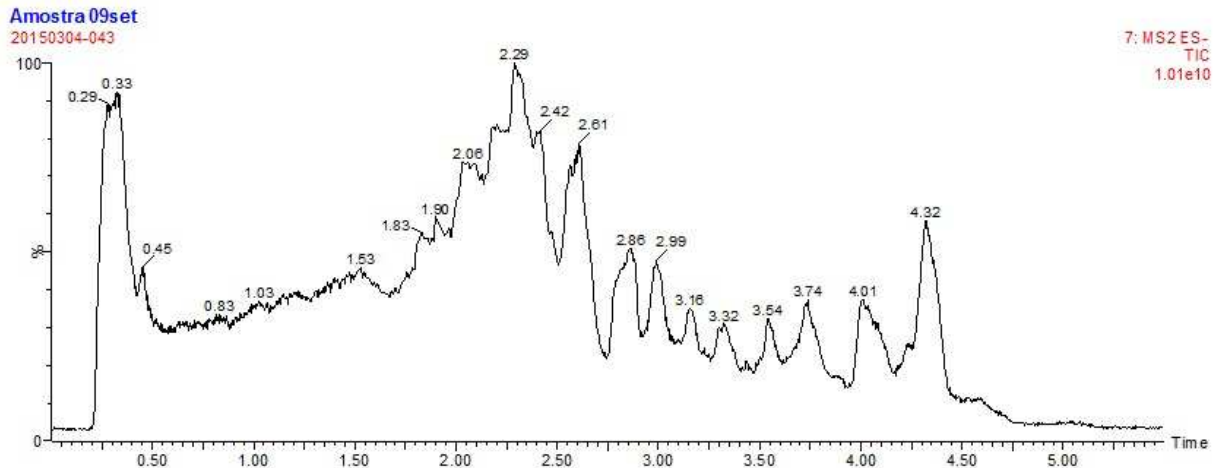
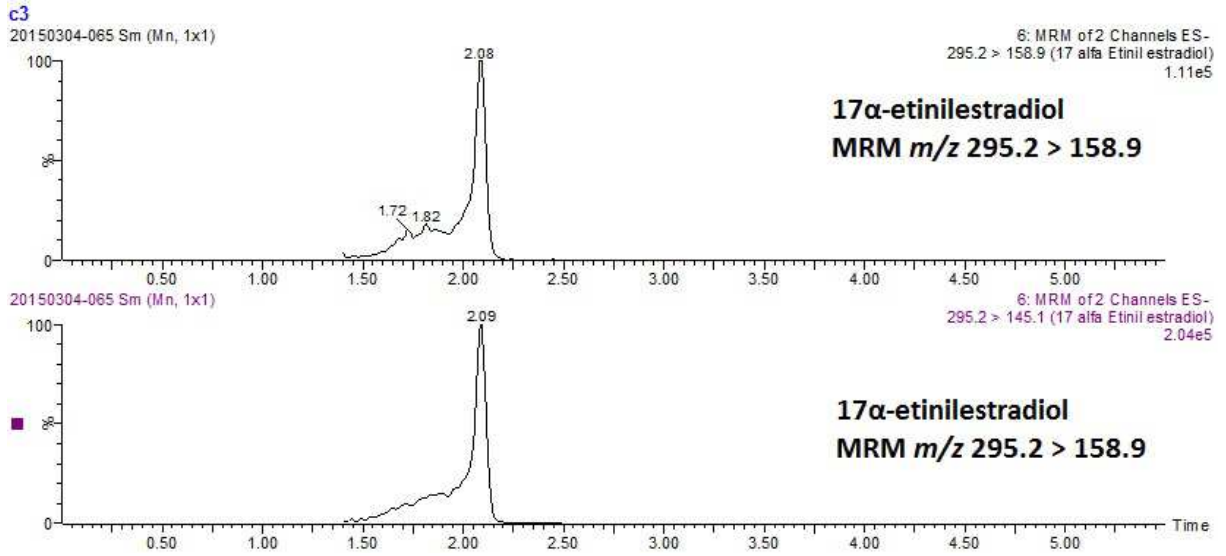
Name: 20150304-036, Date: 04-Mar-2015, Time: 19:48:11, ID: , Description: Adicao Pad. 8.3

	# Name	Trace	RT	Area	IS Area	Response	Detecti...	Conc.	%Dev
1	1 17 alfa Etnil estradiol	295.2 > 145.1	2.09	2686.130		2686.130	bb	184.2	-55.4
2	2 17a-estradiol	271.2 > 183.1	2.08	2515.652		2515.652	bb	76.1	-26.8
3	3 4-nonilfenol	219.2 > 106	3.34	32657.939		32657.939	bb	92.2	-13.0
4	4 Pentaclorofenol	264.9	1.29	58519.156		58519.156	bb	316.5	41.9
5	5 Bisfenol A	227.1 > 212	1.84	6523.684		6523.684	bb	163.6	6.9
6	6 Estrona	269.2 > 145.1	2.10	10993.107		10993.107	bb	85.1	-32.4

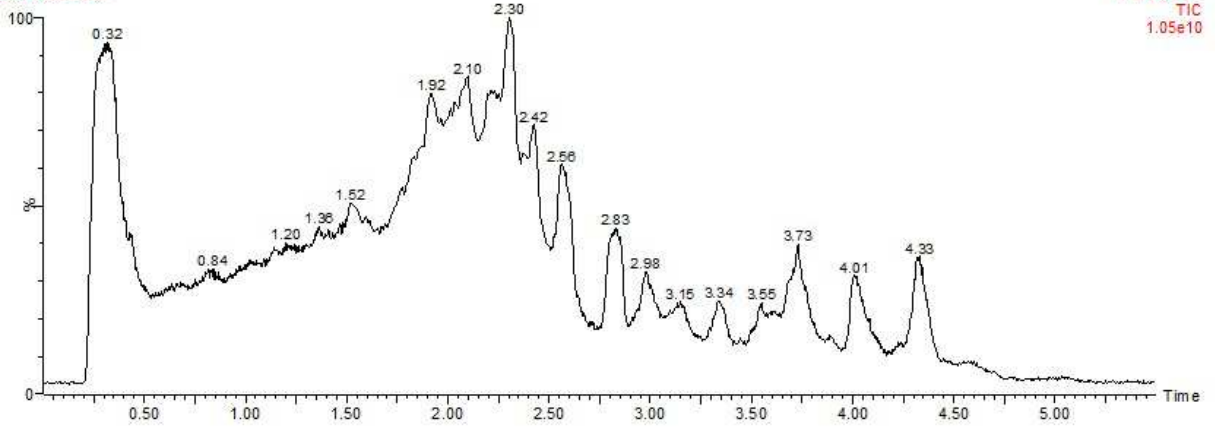
Anexo V – Cromatograma das transições dos compostos desreguladores endócrinos e MRM de amostras realizado no espectrômetro de massas.



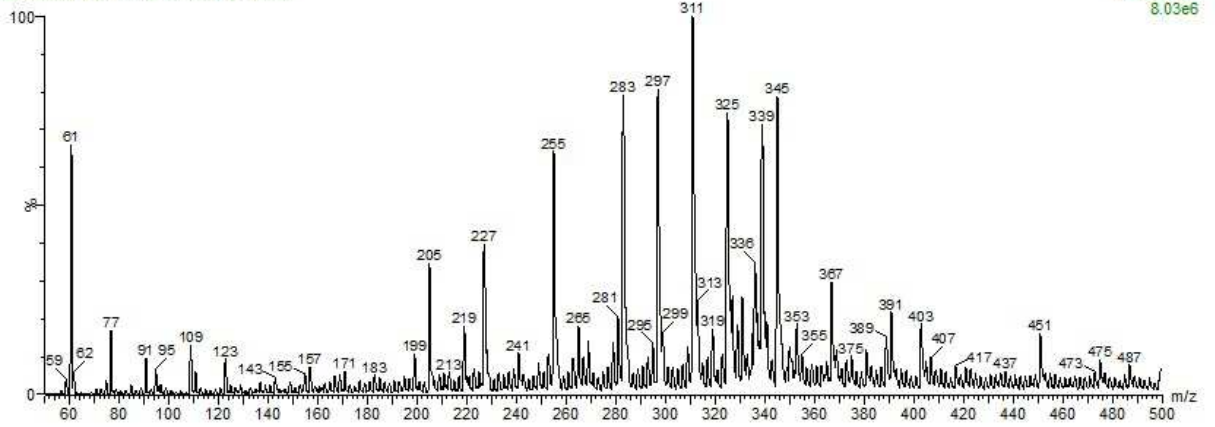




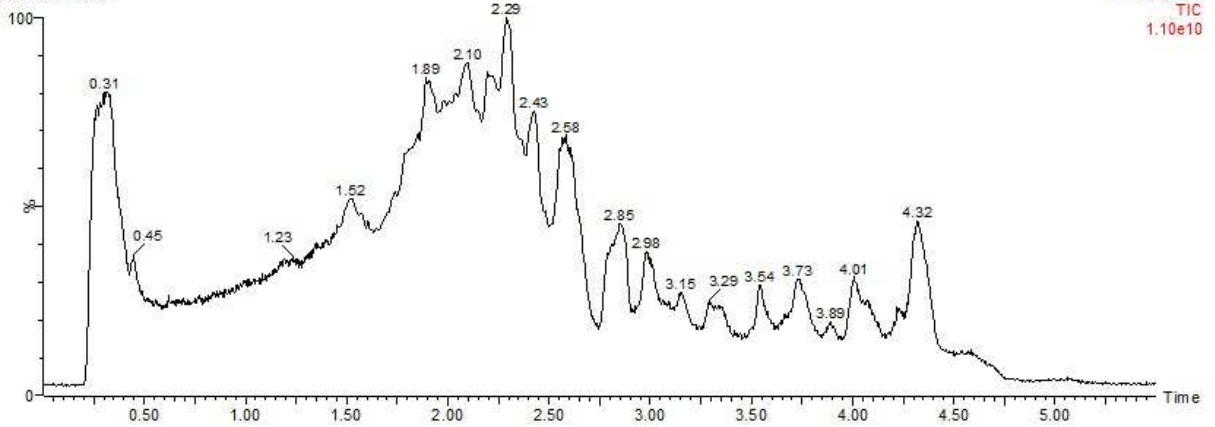
Amostra 10set
20150304-042



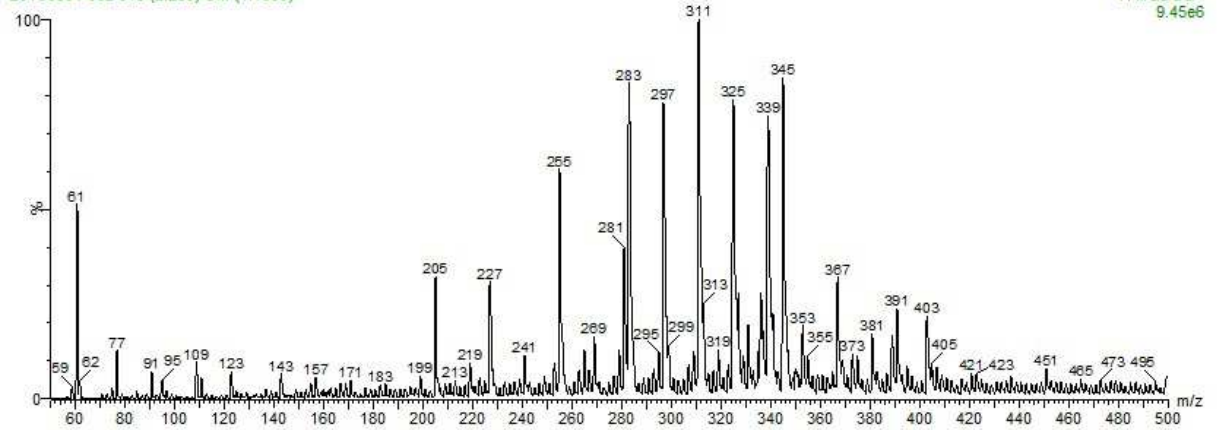
Amostra 10set
20150304-042 517 (2.304) Cm (4:1345)



Amostra 09dez
20150304-052

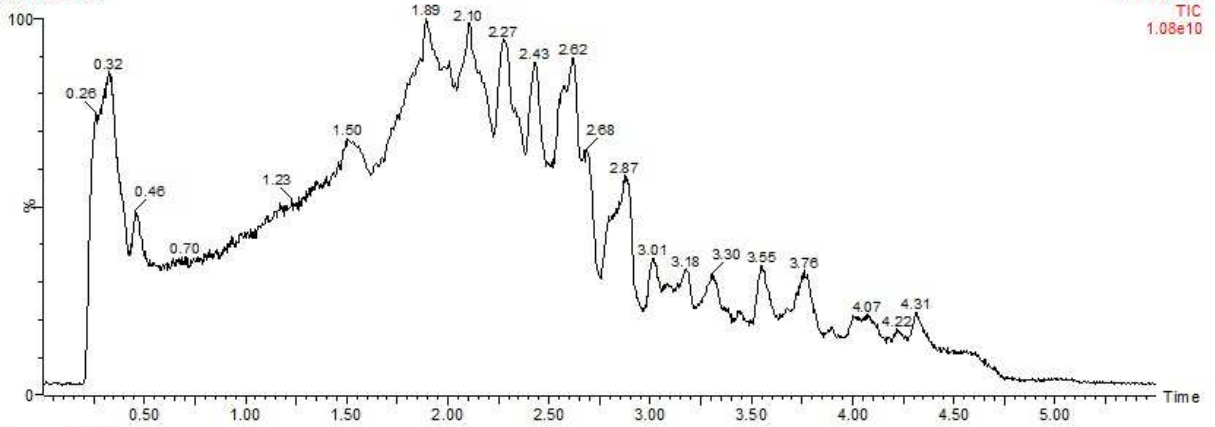


Amostra 09dez
20150304-052 515 (2.289) Cm (1:1339)



Amostra 10dez
20150304-057

7: MS2 ES-
TIC
1.08e10



Amostra 10dez
20150304-057 474 (1.893) Cm (1:1363)

7: MS2 ES-
1.10e7

