



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Frederico Goytacazes de Araujo

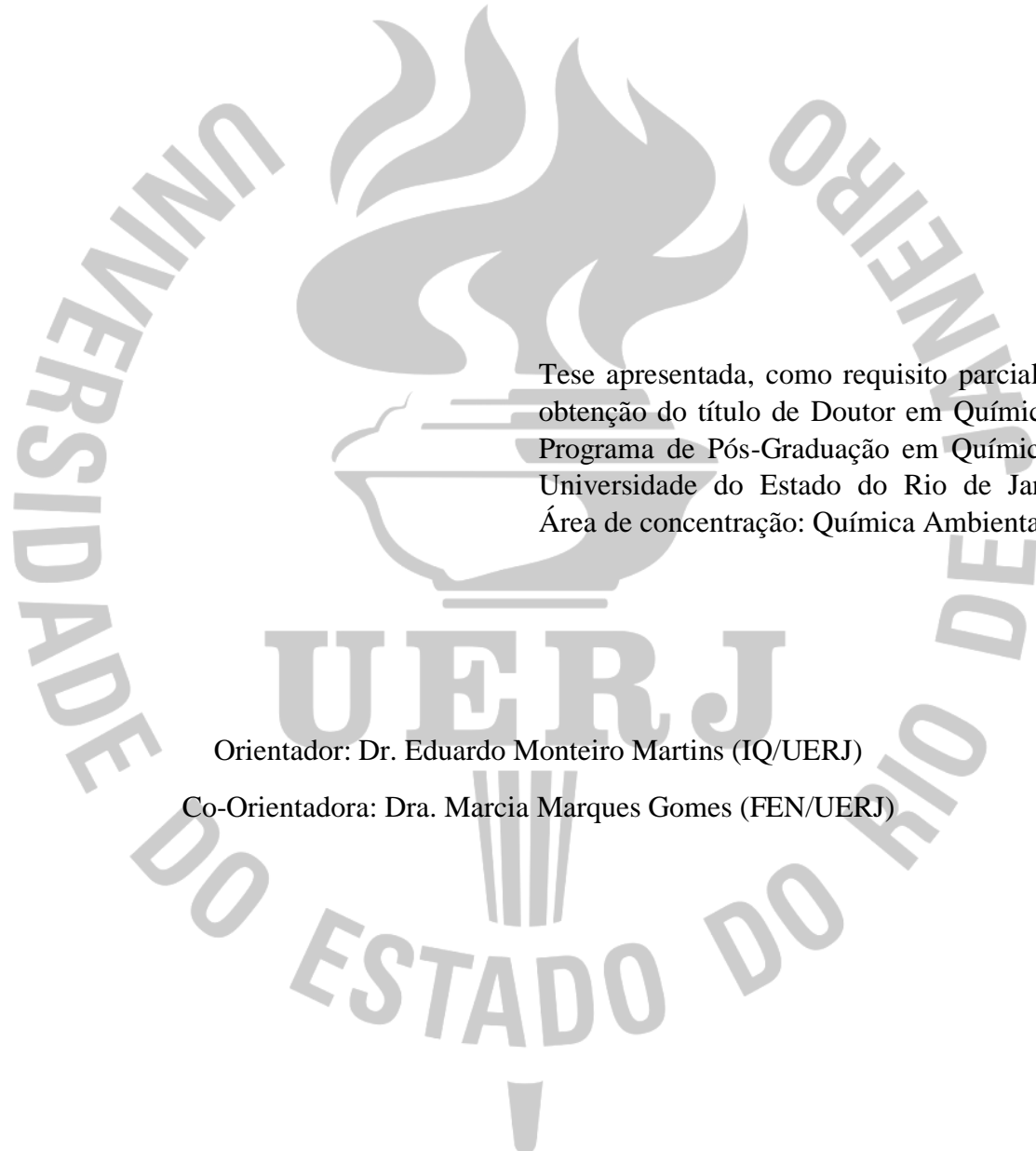
**Desenvolvimento e validação de metodologia por UPLC-MS/MS para
determinação de produtos farmacêuticos, produtos de cuidados pessoais e
desreguladores endócrinos na bacia hidrográfica do rio Guandu - RJ**

Rio de Janeiro

2020

Frederico Goytacazes de Araujo

Desenvolvimento e validação de metodologia por UPLC-MS/MS para determinação de produtos farmacêuticos, produtos de cuidados pessoais e desreguladores endócrinos na bacia hidrográfica do rio Guandu - RJ



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química, ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Química Ambiental.

Orientador: Dr. Eduardo Monteiro Martins (IQ/UERJ)

Co-Orientadora: Dra. Marcia Marques Gomes (FEN/UERJ)

Rio de Janeiro

2020

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

A663 Araujo, Frederico Goytacazes de.

Desenvolvimento e validação de metodologia por UPLC-MS/MS para determinação de produtos farmacêuticos, produtos de cuidados pessoais e desreguladores endócrinos na bacia hidrográfica do rio Guandu - RJ. – 2020.

188 f.

Orientadora: Eduardo Monteiro Martins

Co-Orientadora: Marcia Marques Gomes

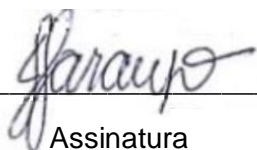
Dissertação (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Instituto de Química.

1. Água - Qualidade – Teses. 2. Água - Poluição – Teses. 3. Rio Guandu (RJ) – Teses. I. Martins, Eduardo Monteiro. II. Gomes, Marcia Marques. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. IV. Título.

CDU 628.1

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


Assinatura

28/09/2020

Data

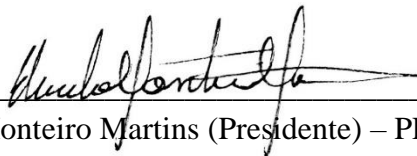
Frederico Goytacazes de Araujo

Desenvolvimento e validação de metodologia por UPLC-MS/MS para determinação de produtos farmacêuticos, produtos de cuidados pessoais e desreguladores endócrinos na bacia hidrográfica do rio Guandu - RJ

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química, ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Área de concentração: Química Ambiental

Aprovada em: 09/06/2020

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Eduardo Monteiro Martins (Presidente) – PPGQ – IQ – UERJ



Prof^a. Dra. Marcia Marques Gomes – PEAMB – FEN – UERJ



Prof^a. Dra. Mônica Regina da Costa Marques – PPGQ – IQ – UERJ



Prof^a. Dra. Juliana Fonseca de Lima – PPGQ – IQ – UERJ



Prof^a. Dra. Renata Santana Lorenzo Raices – IFRJ – Campus Maracanã



Prof^a. Dra. Vanessa Gomes Kelly de Almeida – PPGQ – IQ – UFRRJ

Rio de Janeiro

2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos pilares da minha vida, primeiramente a **Deus** e à **Nossa Senhora Aparecida, às pessoas especiais da minha vida:** minha mãe Inúbia, meu pai Jorge, meu irmão Bernardo, minha amada esposa Débora e aos meus **Anjos bons**, que infelizmente não podem estar fisicamente mas com certeza do céu estão muito felizes: Vô Jair, Vó Therezinha, Tia Cida e Tio Celso.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo Professor Eduardo Monteiro Martins, agradeço pela oportunidade de ser orientado por essa pessoa fantástica, tranquila, humana e amiga. Sempre pensando no bem do seu aluno, pensando que existe uma vida fora da pós-graduação, incentivando-nos a sempre buscarmos qualificação e uma posição no mercado de trabalho. Obrigado pelas conversas, comentários, dicas, sugestões, paciência, dedicação, compreensão e confiança, mesmo sabendo que estaria a quase 500 km de distância. Você é o cara!

A minha coorientadora Professora Marcia Marques, que viabilizou tal projeto, permitindo a realização de toda a parte experimental em seu laboratório (LABIFI) na Faculdade de Engenharia da UERJ. Gostaria de agradecer também a parceria desde o início, na concepção do projeto até o término do projeto, sempre organizada, objetiva, dinâmica e sempre disposta a ajudar mesmo que tivesse outros afazeres em sua lista de prioridade.

A minha amada esposa Débora, que em todo momento não me deixou desistir, muito pelo contrário, foi me incentivando e motivando a continuar o doutorado, mesmo estando bem longe da UERJ. Sem você, sem sua ajuda e força, com certeza eu teria trancado e não teria prosseguido no doutorado. Então essa vitória também é sua.

Ao amigo e Professor Glauco Bauerfeldt, pelas valiosas contribuições no exame de qualificação, no desenvolvimento do projeto, nos artigos... Além disso tudo, muito obrigado sempre pelos conselhos, bate-papos, visitas e etc.

Aos colegas que a Química Avançada me deu: Andreia, Camylle, Diego, Emanuel, Gustavo, Jessica, Jônatas e Natalia. Obrigado pelo excelente convívio e companheirismos na sala de aula, provas, e-mails, seminários, WhatsApp...

Ao amigo Rodrigo Coutinho da Silva, muito obrigado pelo companheirismo e amizade durante esses 48 meses. Não posso de maneira nenhuma deixar de te agradecer, por toda a ajuda (carro, mão de obra, tempo...) durante esse período, principalmente após minha vinda para o ES. Muito obrigado amigo.

À Priscila Cunha, Gabrielle Araújo e a todo pessoal da Ecotoxicologia do LABIFI, meus sinceros agradecimentos. Sem vocês, não teria sido possível realizar os ensaios ecotox. Muito obrigado pela disponibilidade e ajuda de vocês, pois sem dúvida vocês foram fundamentais para o componente de Ecotoxicologia da tese.

Não posso deixar de agradecer à Vanda Azevedo. Vanda muito, muito obrigado por tudo que você fez por mim após a minha ida para o ES. Foram inúmeras autorizações para entrar na UERJ durante os fins de semana, autorizações para colocar o carro alugado no

estacionamento da UERJ, para descarregar 16 L de amostra coletada a cada campanha, etc. Vanda foi peça importantíssima para a conclusão desse projeto, mesmo eu estando no ES.

Ao Deivisson por toda a ajuda no tratamento dos dados que permitiu a avaliação de risco ecológico para a tese. Sem dúvida, engrandeceu mais ainda o trabalho.

Aos demais integrantes do LABIFI, obrigado pelos momentos de bate-papo, descontração, reflexão e diversão! Cada integrante, aluno de I.C., mestrando e doutorando ajudou nessa longa caminhada de 48 meses.

Ao IFES, meu muito obrigado a todos, por entenderem a minha situação de professor em doutoramento em outro estado. Muito obrigado pela flexibilização de horários e algumas ausências. A todos os alunos, também fica meu agradecimento pelo apoio demonstrado e por entender minha ausência da escola quando foi necessário.

Ao irmão da vida e afilhados, Caio Cerqueira e sua esposa Fernanda, fica o meu muito obrigado pela ajuda durante o desenvolvimento final do projeto, pela companhia, bate papo, hospedagem dentre outros. Muito obrigado queridos!

Ao amigo Danilo Pereira (Waters Cooperation), agradeço pelo treinamento ministrado em 2016, que me tornou totalmente apto para o desenvolvimento do projeto utilizando o UPLC-MS/MS. Meu muito obrigado também por todo o suporte técnico do instrumento quando este era necessário durante os quatro anos de doutoramento.

Aos professores da banca examinadora que de muito bom grado se propuseram em dedicar-se à análise do presente trabalho, deslocando-se para compor a banca e contribuir para o trabalho.

Agradeço à UERJ e seus funcionários pela infraestrutura oferecida e à CAPES pela ajuda financeira. Não posso deixar de agradecer a todo corpo docente do PPGQ-UERJ. Em especial, gostaria de agradecer a Professora Juliana Lima e ao Chefe de Secretaria, Luiz Alberto. Vocês sabem o quanto foi difícil a continuidade do doutorado, estando a 500 km da UERJ. Foram diversas solicitações ao PPGQ, buscando a resolução do problema de distância e a resposta sempre foi positiva. Fica aqui registrado o meu muito obrigado a todo o corpo docente do PPGQ-UERJ.

RESUMO

ARAÚJO, F.G. de *Desenvolvimento e validação de metodologia por UPLC-MS/MS para determinação de produtos farmacêuticos, produtos de cuidados pessoais e desreguladores endócrinos na bacia hidrográfica do rio Guandu-RJ*. 2020. 188 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (PPCPs - do inglês *Pharmaceuticals and Personal Care Products*) e desreguladores endócrinos (EDs - do inglês *Endocrine Disruptors*) são micropoluentes presentes em concentrações que variam de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$, potencialmente perigosos para o ambiente bem como para humanos. Entre os PPCPs, amplamente consumidos encontram-se: Trimetoprim (TMP), Bromazepam (BZP), Clonazepam (CZP), Diazepam (DZP), Ibuprofeno (IBP) e Benzofenona (BEN). Os EDs, por sua vez, são substâncias que prejudicam o funcionamento normal do sistema endócrino. Entre eles estão o 4-Nonilfenol (4NP), Bisfenol A (BPA) e Dietiftalato (DEP). O método analítico utilizou a extração em fase sólida (SPE - do inglês *Solid Phase Extraction*) como preparo de amostra e determinação por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas sequencial (UPLC-MS/MS - do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry tandem*). Para a SPE utilizou-se cartuchos C18 - 500 mg, e eluição em duas etapas de 2,5 mL de metanol. Após a otimização da extração e da separação cromatográfica, o método analítico foi validado utilizando-se os parâmetros de validação da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA - do inglês *United States Environmental Protection Agency*) dispostos no guia 8000D. O método desenvolvido foi sensível, robusto e seletivo. Os LDs e os LQs para o método variaram entre 0,844 e 8,13 ng L^{-1} para o LD e 10,0 e 50,0 ng L^{-1} para LQ; Os valores de precisão (%DPR) e exatidão ficaram dentro dos valores preconizados pelo guia USEPA 8000D (DPR < 20%) e exatidão entre (50 e 120%). Todas as curvas analíticas apresentaram valores de $R^2 > 0,990$. Para o 4NP, BPA, CZP, DEP, IBP e TMP, foi evidenciado o efeito de matriz. O método validado foi aplicado nas amostras de água superficiais coletadas em Nova Iguaçu (NIG), Paracambi (PBI), Rio de Janeiro (RIO) e Seropédica (SER), entre os meses de abril/2018 e março/2019. Foi possível detectar todos os analitos em todas as amostras coletadas. Em SER, foi quantificado DEP e BPA em 100% das amostras. Em NIG, PBI e RIO foi quantificado DEP e BZP em 100% das amostras. Entretanto, outros analitos apresentaram alto percentual de quantificação, como por exemplo, IBP 91% em NIG, BPA 91% em PBI, DZP 82% no RIO e 82% de BPA em SER. A avaliação de risco evidenciou que o BPA e DZP apresentaram coeficientes de risco (RQ) alto ($\text{RQ} > 1$) na bacia hidrográfica do Rio Guandu. Para a concentração ambiental medida (MEC - do inglês *Measured Environmental Concentrations*), o BPA apresentou RQ de 0,92. Todas as amostras apresentaram efeito de toxicidade aguda, através do teste de Dunnett, todas as amostras foram consideradas como tóxicas, com exceção da uma amostra (PBI – Out/2018). Todas as amostras coletadas apresentaram atividade estrogênica. Uma amostra de PBI apresentou um valor de equivalente de 17β -Estradiol (EQ-E2) aproximadamente 6 vezes superior ao valor de referência ($1,00 \text{ ng L}^{-1}$).

Palavras-chave: Desenvolvimento de método analítico. Desreguladores Endócrinos. PPCPs. UPLC-MS/MS. Rio Guandu.

ABSTRACT

ARAÚJO, F.G. de *Development and validation of UPLC-MS/MS methodology for the determination of pharmaceuticals, personal care products and endocrine disruptors in the Guandu river basin-RJ*. 2020. 188 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine disruptors (EDs) are micropollutants present in tests using $\mu\text{g L}^{-1}$ and ng L^{-1} , which are potentially dangerous for the environment as well as for humans. Among the PPCPs, widely consumed in themselves: Trimethoprim (TMP), Bromazepam (BZP), Clonazepam (CZP), Diazepam (DZP), Ibuprofen (IBP) and Benzophenone (BEN). EDs, in turn, are substances that impair the normal functioning of the endocrine system. Among them are 4-Nonylphenol (4NP), Bisphenol A (BPA) and Diethylphthalate (DEP). The analytical method used for Solid Phase Extraction (SPE) as sample preparation and determination by Ultra Efficiency Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry *tandem* (UPLC-MS/MS). For an SPE, use C18 - 500 mg cartridges and elution in two steps of 2.50 mL of methanol. After the optimization of the extraction and chromatographic separation, the analytical method was validated, using the validation parameters of United States Environmental Protection Agency (USEPA) according 8000D guide. The method developed was, sensitive, robust and selected. The LODs and LOQs for the method, varying between 0.844 and 8.13 from L^{-1} for LOD and 10.0 and 50.0 ng L^{-1} for LOQ; The precision values (% RSD) and the accuracy remain within the values recommended by the USEPA 8000D guide (RSD <20%) and accuracy between 50 and 120%. All analytical curves show values of $R^2 > 0.990$. For the 4NP, BPA, CZP, DEP, IBP and TMP, matrix effect was evidenced. The method was applied to surface water bottles collected in Nova Iguaçu (NIG), Paracambi (PBI), Rio de Janeiro (RIO) and Seropédica (SER), between April/2018 and March/2019. It was possible to detect all analytes in all collected samples. In the SER, DEP and BPA were quantified in 100% of the specifications. In PBI, SER and RIO, DEP and BZP were quantified in 100% of the colors. However, other analytes showed a high percentage of quantification, for example, IBP 91% in NIG, BPA 91% in PBI, DZP 82% in RIO and 82% in BPA in SER. A risk assessment evidenced by the BPA and DZP micropollutants shows high high risk coefficient ($\text{RQ} > 1$) in the Guandu River basin. For Minimum Environmental Concentration (MEC), BPA presented an RQ of 0.92. All samples showed an acute toxicity effect, through the Dunnett test, all samples were considered toxic, except for one sample (PBI - Oct / 2018). All samples collected showed estrogenic activity. A PBI sample showed an equivalent value of 17β -Estradiol (EQ-E2) approximately 6 times higher than the reference value (1.00 ng L^{-1}).

Keywords: Development of analytical method. Endocrine disruptors. PPCPs. UPLC-MS/MS. Guandu River.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura dos PPCPs estudados nesse projeto.....	33
Figura 2 - Estrutura de algumas classes de antibióticos já encontrados no meio ambiente .	34
Figura 3 - Estrutura química das três subclasses de benzodiazepínicos.....	36
Figura 4 - Estrutura dos EDs estudados nesse projeto.....	42
Figura 5 - Estrutura do alquilfenol etoxilado.....	45
Figura 6 - Rotas de biodegradação do alquilfenol etoxilado	46
Figura 7 - Região integrante da bacia do Rio Guandu	61
Figura 8 - Locais de amostragem da bacia do rio Guandu	65
Figura 9 - Esquema de funcionamento do espectrômetro de massas sequencial	71
Figura 10 - Imagem esquemática de uma placa de ensaio YES	82
Figura 11 - Cromatograma, no modo TIC, de alguns analitos para o gradiente nº 3	86
Figura 12 - Cromatograma, no modo TIC, de alguns analitos para o gradiente nº 5	86
Figura 13 - Percentual de retenção (% Retenção) dos analitos em cada cartucho testado	88
Figura 14 - Carga máxima de adsorção do cartucho OASIS HLB.....	89
Figura 15 - Carga máxima de adsorção do cartucho Bond Elut C18	89
Figura 16 - Carga máxima de adsorção do cartucho Silicycle C18.....	90
Figura 17 - Percentual de recuperação dos analitos	91
Figura 18 - Cromatograma, no modo TIC, para o DZP comprovando a seletividade	94
Figura 19 - Precisão (repetitividade) e precisão intermediária da metodologia	95
Figura 20 - Exatidão (recuperação) da metodologia	96
Figura 21 - Curvas analíticas (Intra-dia 1, Intra-dia 2 e Inter-dia) para o TMP	99
Figura 22 - Curvas analíticas das amostras aquosas sintéticas para o CZP.....	102
Figura 23 - Teste F para avaliação do efeito de matriz	104
Figura 24 - Análise da robustez do método analítico desenvolvido.....	106
Figura 25 - Cromatograma, no modo TIC, para TMP, avaliando a validade das amostras .	107
Figura 26 - Validade da curva analítica para 4NP, BEN, BPA, BZP e CZP.....	108
Figura 27 - Validade da curva analítica para DEP, DZP, IBP e TMP.....	108
Figura 28 - Comparação entre as três curvas analíticas para o IBP	109
Figura 29 - Monitoramento da temperatura para os quatro pontos amostrais	110
Figura 30 - Monitoramento do pH para os quatro pontos amostrais	110
Figura 31 - Monitoramento do ORP nos quatro pontos amostrais	111
Figura 32 - Monitoramento da condutividade nos quatro pontos amostrais	112
Figura 33 - Monitoramento da turbidez dos quatro pontos amostrais	113
Figura 34 - Monitoramento do teor de sólidos totais dissolvidos nos quatro pontos amostrais	114
Figura 35 - Monitoramento da concentração de OD nos quatro pontos amostrais	114
Figura 36 - Cromatogramas, no modo TIC, com quantificação do TMP.....	115
Figura 37 - Log C dos analitos das amostras coletadas em NIG.....	116
Figura 38 - Log C dos analitos das amostras coletadas em SER.....	117

Figura 39 - Log C dos analitos das amostras coletadas em PBI.....	118
Figura 40 - Log C dos analitos das amostras coletadas no RIO	119
Figura 41 - Risco ecológico (RQ) para cada analito	123
Figura 42 - Risco ecológico (RQ) para cada analito em função das MECs	124
Figura 43 - Curva dose-resposta dos padrões para ensaio YES.	128
Figura 44 - CE ₅₀ obtidos com três controles positivos com E2.....	128
Figura 45 - Valores EQ-E2 dos pontos amostras da bacia do rio Guandu – RJ.....	129
Figura 46 - Cromatograma, no modo TIC, para o 4NP comprovando a seletividade	153
Figura 47 - Cromatograma, no modo TIC, para o BEN comprovando a seletividade	153
Figura 48 - Cromatograma, no modo TIC, para o BPA comprovando a seletividade	154
Figura 49 - Cromatograma, no modo TIC, para o BZP comprovando a seletividade	154
Figura 50 - Cromatograma, no modo TIC, para o CZP comprovando a seletividade	155
Figura 51 - Cromatograma, no modo TIC, para o DEP comprovando a seletividade	155
Figura 52 - Cromatograma, no modo TIC, para o IBP comprovando a seletividade	156
Figura 53 - Cromatograma, no modo TIC, para o BEN comprovando a seletividade	156
Figura 54 - Curvas analíticas (Intra-dia 1, Intra-dia 2 e Inter-dia) para o 4NP	157
Figura 55 - Curvas analíticas (Intra-dia 1, Intra-dia 2 e Inter-dia) para o BEN	157
Figura 56 - Curvas analíticas (Intra-dia 1, Intra-dia 2 e Inter-dia) para o BPA.....	158
Figura 57 - Curvas analíticas (Intra-dia 1, Intra-dia 2 e Inter-dia) para o BZP	158
Figura 58 - Curvas analíticas (Intra-dia 1, Intra-dia 2 e Inter-dia) para o CZP	159
Figura 59 - Curvas analíticas (Intra-dia 1, Intra-dia 2 e Inter-dia) para o DEP.....	159
Figura 60 - Curvas analíticas (Intra-dia 1, Intra-dia 2 e Inter-dia) para o DZP.....	160
Figura 61 - Curvas analíticas (Intra-dia 1, Intra-dia 2 e Inter-dia) para o IBP.....	160
Figura 62 - Curvas analíticas das amostras aquosas sintéticas para o 4NP.....	161
Figura 63 - Curvas analíticas das amostras aquosas sintéticas para a BEN	161
Figura 64 - Curvas analíticas das amostras aquosas sintéticas para o BPA	162
Figura 65 - Curvas analíticas das amostras aquosas sintéticas para o BZP.....	162
Figura 66 - Curvas analíticas das amostras aquosas sintéticas para o DEP	163
Figura 67 - Curvas analíticas das amostras aquosas sintéticas para o DZP	163
Figura 68 - Curvas analíticas das amostras aquosas sintéticas para o IBP.....	164
Figura 69 - Curvas analíticas das amostras aquosas sintéticas para o TMP.....	164
Figura 70 - Cromatograma, no modo TIC, para 4NP, avaliando a validade das amostras ...	165
Figura 71 - Cromatograma, no modo TIC, para BEN, avaliando a validade das amostras...	166
Figura 72 - Cromatograma, no modo TIC, para BPA, avaliando a validade das amostras...	167
Figura 73 - Cromatograma, no modo TIC, para BZP, avaliando a validade das amostras ...	168
Figura 74 - Cromatograma, no modo TIC, para CZP, avaliando a validade das amostras ...	169
Figura 75 - Cromatograma, no modo TIC, para DEP, avaliando a validade das amostras ...	170
Figura 76 - Cromatograma, no modo TIC, para DZP, avaliando a validade das amostras ...	171
Figura 77 - Cromatograma, no modo TIC, para IBP, avaliando a validade das amostras ...	172
Figura 78 - Comparação entre as três curvas analíticas para o 4NP.....	173
Figura 79 - Comparação entre as três curvas analíticas para o BEN.....	173
Figura 80 - Comparação entre as três curvas analíticas para o BPA	174
Figura 81 - Comparação entre as três curvas analíticas para o BZP	174
Figura 82 - Comparação entre as três curvas analíticas para o CZP	175

Figura 83 - Comparação entre as três curvas analíticas para o DEP	175
Figura 84 - Comparação entre as três curvas analíticas para o DZP	176
Figura 85 - Comparação entre as três curvas analíticas para o TMP	176
Figura 86 - Cromatogramas, no modo TIC, com quantificação do 4NP	177
Figura 87 - Cromatogramas, no modo TIC, com quantificação do BEN	177
Figura 88 - Cromatogramas, no modo TIC, com quantificação do BPA	178
Figura 89 - Cromatogramas, no modo TIC, com quantificação do BZP	178
Figura 90 - Cromatogramas, no modo TIC, com quantificação do 4NP	179
Figura 91 - Cromatogramas, no modo TIC, com quantificação do DEP	179
Figura 92 - Cromatogramas, no modo TIC, com quantificação do DZP	180
Figura 93 - Cromatogramas, no modo TIC, com quantificação do IBP	180

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de produtos químicos prejudiciais ao meio ambiente	28
Tabela 2 - Fontes de micropoluentes em ambientes aquáticos.....	29
Tabela 3 - Propriedades físico-químicas dos PPCPs estudados nesse trabalho	32
Tabela 4 - EDs mais comuns e respectivos usos	41
Tabela 5 - Propriedades físico-químicas dos EDs estudados nesse trabalho.	42
Tabela 6 - Parâmetros aferidos na validação	58
Tabela 7 - Padrões analíticos utilizados no trabalho	63
Tabela 8 - Coordenadas geográficas dos pontos amostrais	65
Tabela 9 - Testes para escolha da melhor fase sólida.....	68
Tabela 10 - Testes de massa máxima percolada pelos cartuchos	69
Tabela 11 - Testes realizados para a escolha do solvente de eluição e o volume de eluição .	70
Tabela 12 - Níveis de concentração das amostras aquosas sintéticas para cada analito	74
Tabela 13 - Resumo do ensaio de toxicidade crônica com microcrustáceo <i>C. dubia</i>	80
Tabela 14 - PPCPs e EDs quantificados por UPLC-MS/MS deste trabalho	83
Tabela 15 - Propostas de gradientes para desenvolvimento do método cromatográfico.....	84
Tabela 16 - Condições empregadas no sistema UPLC-MS/MS	87
Tabela 17 - LD e LQ do método desenvolvido	97
Tabela 18 - Parâmetros avaliados na linearidade para os micropoluentes aqui abordados ..	101
Tabela 19 - Parâmetros das curvas analíticas das amostras aquosas sintéticas	103
Tabela 20 - Valores de PNEC para cada analito	122
Tabela 21 - Ecotoxicidade crônica para <i>C. dubia</i> expostas a amostras de água superficial .	126
Tabela 22 - Resultado com base no Teste de Dunnett,.....	127
Tabela 23 - Análise da toxicidade das amostras do Rio Guandu durante ensaio YES.....	131

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

4NP	4-Nonilfenol
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABS	Absorbância
ACN	Acetonitrila
AINE	Anti-Inflamatórios não Esteroides
ANA	Agência Nacional de Águas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APE	Alquilfenóis Etoxilados
BEN	Benzofenona
BPA	Bisfenol A
BZP	Bromazepam
CCL	Lista de Contaminantes Candidatos a regulação (do inglês <i>Contaminant Candidate List</i>)
CEDAE	Companhia Estadual de Águas e Esgotos
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CO ₂	Dióxido de Carbono
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CPRG	do inglês <i>Chlorophenol Red-β-D-galactoside</i>
CTR	Controle
CZP	Clonazepam
DBO	Demanda Biológica de Oxigênio
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DEHP	Di(2-etilhexil)ftalato
DEP	Dietilftalato
DES	Dietilestilbestrol
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DPR	Desvio Padrão Relativo
DZP	Diazepam
DZP-d5	Diazepam deuterado
E2	17β – estradiol

ED	Desregulador Endócrino (do inglês <i>Endocrine Disruptors</i>)
EMA	Agência Europeia de Medicamentos (do inglês <i>European Medicines Agency</i>)
EQ-E2	Equivalente de 17 β -Estradiol
ETA	Estação de Tratamento de Água
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
ESI	Electrospray
Fc	Fator de Calibração
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (do inglês <i>Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i>).
H ₂ O	Água
HCl	Ácido Clorídrico
HFor	Ácido Fórmico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>High Pressure Liquid Chromatography</i>)
LC-MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (do inglês <i>Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry tandem</i>),
IBP	Ibuprofeno
INEA	Instituto Estadual do Ambiente
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IPCS	Programa Internacional de Segurança Química (do inglês <i>International Programme on Chemical Safety</i>)
ISO	Organização Internacional de Padronização (do inglês <i>International Organization for Standardization</i>)
LABIFI	Laboratório de Biorremediação, Fitotecnologia e Inovação no Tratamento de Água e Efluentes
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MBBR	Reator biológico de leito móvel (do inglês <i>Moving Bed Biofilm Reactor</i>),
MBR	Sistema de biorreatores com membranas (MBR, do inglês <i>Membrane Bio Reactor</i>),
MEC	Concentração Ambiental Medida para o Contaminante
MeOH	Metanol
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas (do inglês, <i>multiple monitoring reaction</i>)

NH ₄ OH	Hidróxido de Amônio
NIG	Nova Iguaçu
NP _n EO	Nonilfenol Etoxilado
OD	Oxigênio Dissolvido
OEDC	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (do inglês <i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORP	Potencial Redox (do inglês <i>Oxidation Reduction Potential</i>)
PABA	Ácido p-aminobenzóico
PBI	Paracambi
PBB	Bifenilas Polibromadas
PCB	Bifenilas Policloradas
PCP	Produtos de Cuidados Pessoais
PI	Padrão Interno
PNEC	Concentração prevista sem efeito
PPCP	Produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (do inglês <i>Pharmaceuticals and Personal Care Products</i>)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RIO	Rio de Janeiro
RQ	Risco ecológico
SDWA	Lei de Água Potável Segura (do inglês <i>Safe Drinking Water Act</i>)
SER	Seropédica
SMZ	Sulfametoxazol
SPE	Extração em Fase Sólida (do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>)
TIC	Cromatogramas de Íons Totais (do inglês, <i>total ion chromatogram</i>)
TMP	Trimetoprim
UCMR	Programa de Monitoramento de Contaminantes não Regulamentados (do inglês <i>Unregulated Contaminant Monitoring Rule</i>)
UE	União Europeia
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a espectrometria de massas sequencial (do inglês <i>Ultra Performance Liquid Chromatography coupled Mass Spectrometry tandem</i>)

USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (do inglês <i>United States Environmental Protection Agency</i>)
UV	Ultra Violeta
VMP	Valor Máximo Permitido
YES	do inglês <i>Yeast Estrogen Screen</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

a	Coeficiente angular
b	Coeficiente linear
r	Coeficiente de Correlação
R^2	Coeficiente de Determinação
S/R	sinal/ruído
δa	Erro Padrão no Coeficiente Angular
δb	Erro Padrão no Coeficiente Linear
σ	Desvio padrão

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	22
1 FORMULAÇÃO DO PROBLEMA E OBJETIVO DO TRABALHO	25
1.1 Formulação do problema	25
1.2 Objetivos	25
1.2.1	26
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 Contaminação ambiental	27
2.2 Micropoluentes	28
2.2.131	
2.2.1.1 Antibióticos	33
2.2.1.2 Benzodiazepínicos	35
2.2.1.3 Protetores solar	37
2.2.1.4 Anti-inflamatório	38
2.2.239	
2.2.2.1 Bisfenol A	42
2.2.2.2 Dietilftalato	43
2.2.2.3 4-Nonilfenol	44
2.3 Ensaio Ecotoxicológicos	47
2.3.1	49
2.3.2 E49	
2.4 Avaliação de risco ambiental	50
2.5 Legislações nacional e internacional sobre PPCPs e EDs em água	51
2.6 Validação da Metodologia Analítica	53
2.7 Bacia Hidrográfica do Rio Guandu	60
3 MATERIAL E MÉTODOS	62
3.1 Reagentes, solventes e materiais	62
3.2 Instrumentação	63
3.3 Métodos	64
3.3.1	64
3.3.2	66
3.3.2.1 Preparo das soluções analíticas	67
3.3.2.2 Otimização do preparo de amostra via extração em fase sólida	67

3.3.3	71
3.3.4	72
3.3.4.1	Seletividade 73
3.3.4.2	Precisão (repetitividade) e precisão intermediária..... 73
3.3.4.3	Exatidão (recuperação)..... 73
3.3.4.4	Linearidade 74
3.3.4.5	Limite de quantificação 75
3.3.4.6	Limite de detecção..... 75
3.3.4.7	Efeito de matriz 76
3.3.4.8	Robustez 77
3.3.5	78
3.4	Método de cálculo do risco para os micropoluentes quantificados 78
3.5	Ensaio de ecotoxicidade 79
3.5.1	79
3.5.2	81
3.5.2.1	Controle positivo E2..... 82
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES 83
4.1	Avaliação das melhores condições de detecção no espectrômetro de massas. 83
4.2	Condições do sistema cromatográfico UPLC-MS/MS 84
4.3	Extração em fase sólida (SPE) 87
4.3.1	87
4.3.2	88
4.3.3	91
4.4	Procedimento experimental desenvolvido para o preparo de amostras por SPE 93
4.4.1	94
4.4.1.1	Seletividade 94
4.4.1.2	Precisão (repetitividade), precisão intermediária e exatidão 95
4.4.1.3	Limite de detecção e limite de quantificação 97
4.4.1.4	Linearidade 98
4.4.1.5	Efeito de matriz 102
4.4.1.6	Robustez 105
4.4.2	106

4.5	Aplicação da metodologia analítica desenvolvida nas águas superficiais	110
4.6	Risco ecológico (RQ)	122
4.7	Ensaio ecotoxicológicos	125
4.7.1		125
4.7.2		127
4.7.2.1	Toxicidade de amostras para <i>S. cerevisiae</i>	129
4.8	Avaliação ambiental da bacia do rio Guandu-RJ	132
	CONCLUSÕES	135
	REFERÊNCIAS	137
	APÊNDICE A	153
	APÊNDICE B	157
	APÊNDICE C	161
	APÊNDICE D	165
	APÊNDICE E	173
	APÊNDICE F	177
	ANEXO A	181
	ANEXO B	182
	ANEXO C	183
	ANEXO D	184
	ANEXO E	185
	ANEXO F	186
	ANEXO G	187
	ANEXO H	188
	ANEXO I	189

INTRODUÇÃO

A poluição dos ecossistemas naturais e antropogênicos é uma questão séria do mundo contemporâneo. O rápido desenvolvimento da economia, indústria dentre outros setores aliado ao uso crescente de produtos químicos e às falhas de articulação institucional que afetam a gestão dos recursos hídricos resultaram em uma série de problemas relativos à quantidade e qualidade da água (PARZYCH *et al.*, 2016; XUE *et al.*, 2017). A preocupação com a disponibilidade dos recursos hídricos justifica-se, pois, tal disponibilidade é afetada não apenas pela escassez quantitativa em algumas regiões, quer seja pela redução da disponibilidade devido à seca e mudanças climáticas, dentre outras causas, quer seja pelo aumento da demanda mundial, ou pela depreciação de sua qualidade. O desenvolvimento desordenado das cidades, incluindo o adensamento populacional, aliado à exploração não-sustentável dos mananciais e ao crescimento populacional, provoca o esgotamento das reservas naturais de água e obriga as populações a buscarem fontes de captação cada vez mais distantes. O mau uso dos recursos naturais, o desmatamento, o desperdício podem ser citados como fatores que podem levar à escassez de água. Atualmente acredita-se que metade da população mundial sofra com a escassez moderada e 10% da população mundial com a escassez extrema de água (ARAÚJO; BAUERFELDT; CID, 2017; JOHNSON *et al.*, 2016).

No Brasil, o despejo de esgoto nos corpos hídricos sem qualquer tratamento é uma das principais causas da depreciação da qualidade da água, mesmo com investimentos em redes coletoras de esgoto e estações de tratamento. Dessa forma, a falta de saneamento adequado compromete um dos usos prioritários deste recurso, qual seja, o abastecimento público, fazendo necessária a busca por fontes de captação mais distantes e tratamentos químicos mais complexos e dispendiosos para tornar a água potável (LEITE; AFONSO; AQUINO, 2010; TUCCI, 2008; VIEIRA *et al.*, 2016).

A presença de micropoluentes ou contaminantes emergentes em matrizes aquosas - definidos como poluentes presentes em níveis de concentrações da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ até mesmo ng L^{-1} - tais como produtos farmacêuticos, produtos de cuidados pessoais, desreguladores endócrinos, surfactantes, defensivos agrícolas dentre outros, tornou-se nos últimos anos, foco de preocupação crescente. Embora tais compostos estejam presentes em baixos níveis de concentração, estes podem ser resistentes aos processos utilizados nas

estações de tratamento de água (ETA) ou nas estações de tratamento de esgoto (ETE) convencionais, levando ao acúmulo dos mesmos em ambientes aquáticos. A persistência desses compostos nas estações de tratamento está relacionada às suas estruturas químicas. Compostos que possuem cadeia carbônica simples, são passíveis de degradação em sistemas de tratamento biológico convencional. Entretanto, para estruturas químicas complexas, as estações de tratamento apresentam baixas eficiências de remoção, sobretudo em sistemas de tratamento biológico. A dificuldade para a degradação desses compostos, está relacionada, por exemplo, com a presença de anéis aromáticos, presença de átomos de cloro ou grupos nitro ligados a anéis aromáticos. Os micropoluentes persistentes podem atingir ambientes aquáticos naturais e podem afetar os ecossistemas aquáticos (ALSBAIEE *et al.*, 2016; ARBELÁEZ *et al.*, 2015; LEITE; AFONSO; AQUINO, 2010; NAM *et al.*, 2014; YANG; ZHOU; CICEK, 2014).

A preocupação sobre a exposição aos micropoluentes, tais como produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal (PPCPs - do inglês *Pharmaceuticals and Personal Care Products*) e os desreguladores endócrinos (EDs - do inglês *Endocrine Disruptors*), objetos de estudo deste trabalho, tem aumentado com o passar dos anos, devido aos danos em potencial que podem causar aos organismos expostos. Estudos apontam a presença desses produtos químicos em ETAs, águas superficiais e águas subterrâneas, devido a uma ineficácia no processo de remoção destes durante o tratamento da água em decorrência de moléculas complexas. Essa ineficiência no processo de tratamento de águas, leva à contaminação dos corpos receptores (ANDREOZZI *et al.*, 2006; BILA *et al.*, 2007; CIRJA *et al.*, 2008)

Devido ao problema da escassez de água enfrentado por diversos países, inclusive o Brasil, faz-se necessário cada vez mais, projetos de monitoramento e estudos sobre os impactos desses compostos sobre a qualidade da água e também sobre diferentes espécies aquáticas e também terrestres.

Para uma avaliação quantitativa bem como estudo do destino desses micropoluentes objetivando a garantia da qualidade da água bruta para tratamento ou água potável distribuída para as populações, é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos, que apresentem limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) capazes de determinar micropoluentes em níveis de concentração entre $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} . Uma vez que os micropoluentes estão presentes em níveis de concentração de partes por trilhão (ng L^{-1}), é necessário incorporar uma etapa de concentração no procedimento analítico antes das

determinações cromatográficas (líquida ou gasosa) acopladas à espectrometria de massas, para que se alcance valores de LQ desejáveis (ng L^{-1}). O método de concentração mais utilizado para extrair os micropoluentes de classes variadas da matriz aquosa é a extração em fase sólida (SPE - do inglês *Solid Phase Extraction*). (ARBELÁEZ *et al.*, 2015; CALDAS *et al.*, 2016; GIESY *et al.*, 2002; SILVEIRA *et al.*, 2013).

1 FORMULAÇÃO DO PROBLEMA E OBJETIVO DO TRABALHO

1.1 Formulação do problema

Um dos desafios do século XXI é a manutenção da qualidade da água destinada ao abastecimento público. A situação hídrica é influenciada por mudanças climáticas, aumento populacional resultando no aumento do consumo e principalmente a depreciação da qualidade dos ambientes aquáticos, cada vez mais degradados (ARBELÁEZ *et al.*, 2015; ARAUJO; BAUERFELDT; CID, 2017; TUNDISI, 2008). No Rio de Janeiro e Baixada Fluminense, com aproximadamente 12 milhões de habitantes, a bacia hidrográfica do rio Guandu é o principal manancial utilizado para captação com vistas ao abastecimento para aproximadamente 9 dos 12 milhões de habitantes. Devido ao grande adensamento populacional e as muitas atividades industriais, de mineração e agropecuária na bacia, as águas dessa bacia estão sendo cada vez mais poluídas pelo despejo direto de esgoto doméstico e industrial, muitas vezes resultantes do uso e da ocupação irregular da bacia hidrográfica (ARAUJO *et al.*, 2019).

O presente estudo contribui com conhecimento acerca da presença de micropoluentes relevantes, por meio de um diagnóstico e monitoramento de alguns pontos inseridos na bacia hidrográfica do rio Guandu e fornecimento de dados ambientais sobre o comportamento e distribuição dos PPCPs e dos EDs selecionados na referida bacia hidrográfica. Entretanto, para o fornecimento dos dados ambientais confiáveis, a metodologia analítica deve ser seletiva e sensível, com capacidade de identificar e quantificar contaminantes presentes nas amostras ambientais em níveis de concentração na faixa de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$.

1.2 Objetivos

Este trabalho tem por objetivo geral empregar a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado à espectrometria de massas sequencial (UPLC-MS/MS - do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry tandem*) para

desenvolver e validar uma metodologia analítica para determinação de nove micropoluentes em amostras de águas superficiais, a saber: 4-nonilfenol (4NP), benzofenona (BEN), bisfenol A (BPA), bromazepam (BZP), clonazepam (CZP), diazepam (DZP), dietilftalato (DEP), ibuprofeno (IBP) e trimetoprim (TMP), seguida do estudo com matrizes reais por meio de amostras de água superficial coletadas em quatro pontos amostrais, situados em Paracambi (PBI), Nova Iguaçu (NIG), Seropédica (SER) e Rio de Janeiro (RIO), situados ao longo do curso do rio Guandu e de seus afluentes.

1.2.1 Objetivos Específicos:

- I. Otimizar o preparo de amostra via SPE para extração, limpeza e concentração de nove micropoluentes;
- II. Desenvolver metodologia analítica para determinação de nove micropoluentes por UPLC-MS/MS a partir de amostras de águas superficiais do rio Guandu;
- III. Validar metodologia analítica desenvolvida;
- IV. Aplicar a metodologia desenvolvida e validada para amostras reais de águas superficiais obtidas de corpos hídricos selecionados na bacia hidrográfica do rio Guandu, na cidade do Rio de Janeiro e cidades da Baixada Fluminense;
- V. Identificar e quantificar tais micropoluentes, avaliando a ocorrência destes ao longo do tempo (série histórica) nos pontos de coletas definidos;
- VI. Verificar os efeitos de toxicidade crônica e estrogenicidade sobre dois organismos distintos, o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* e uma cepa geneticamente modificada da levedura *Saccharomyces cerevisiae* respectivamente;
- VII. Avaliar o risco ecológico (RQ) para as amostras coletadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Contaminação ambiental

Os corpos hídricos, na atualidade, estão em risco com redução da qualidade de suas águas, devido aos níveis de contaminação que estão expostos, com numerosos contaminantes orgânicos e inorgânicos, provenientes dos efluentes municipais e industriais, que contém uma variedade crescente de contaminantes, tais como, PPCPs, surfactantes, EDs, defensivos agrícolas, conservantes, bem como seus produtos de transformação, mesmo após o tratamento, que possuem algum corpo hídrico como destino final (ARBELÁEZ *et al.*, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2015; LUO *et al.*, 2014; STIPANIČEV *et al.*, 2017).

Dessa maneira, além dos “fatores naturais” que influenciam a disponibilidade da água, tais como, secas, estiagens, chuvas intensas, dentre outros, há outros fatores que também interferem na qualidade da água, como a poluição dos corpos hídricos, impedindo seus diferentes usos, tais como o abastecimento. Com esse aumento da poluição dos corpos hídricos, aumenta-se a vulnerabilidade da população humana, em virtude da redução de acesso à água de boa qualidade (potável e tratada). A redução da qualidade da água, provoca interferência na saúde (humana e pública), deterioração da qualidade de vida e do desenvolvimento econômico e social (CALDAS, 2009; ARAUJO; BAUERFELDT; CID, 2017; TUNDISI, 2008).

Entre 1930 e 2000, a produção global de produtos químicos aumentou de 1 milhão para 400 milhões de toneladas por ano. Um estudo publicado pelo Gabinete de Estatística da União Europeia (EU), revelou que mais da metade da produção total de produtos químicos, gera compostos prejudiciais para o ambiente e aproximadamente 20% dos produtos químicos apresentam impactos ambientais mais severos, como apresentado na Tabela 1 (GAVRILESCU *et al.*, 2015).

Dessa forma, a contaminação da água por micropoluentes, tornou-se um importante tema de preocupação mundial, devido ao fato do aumento da determinação desses nos corpos hídricos. Estes micropoluentes, cujos efeitos ao meio ambiente e à saúde humana ainda não são totalmente conhecidos, não possuem regulamentação vigente quanto a

limites para valores máximos permitidos (VMP). Os micropoluentes individuais ou associados em misturas complexas são relevantes para a qualidade da água e podem desencadear efeitos tóxicos indesejados (DEBLONDE; COSSU-LEGUILLE; HARTEMANN, 2011; EGGEN *et al.*, 2014; GAFFNEY *et al.*, 2014; ROSAL *et al.*, 2010; STIPANIČEV *et al.*, 2017).

Tabela 1 - Produção de produtos químicos prejudiciais ao meio ambiente

	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Produção total de produtos químicos	330	333	349	351	355	362	338	292	339	347
Total de produtos químicos prejudiciais ao meio ambiente	176	179	191	193	192	194	182	162	184	188
Produtos químicos com impactos ambientais crônicos severos	30	31	34	35	36	36	32	30	34	35

Legenda: Dados em milhões de toneladas.

Fonte: Adaptado GAVRILESCU *et al.*, 2015

2.2 Micropoluentes

O aumento da população global provoca um aquecimento nas economias locais, regionais ou nacionais, promovendo o crescimento daquela região. Como consequência desse crescimento, a produção de produtos químicos também apresenta um incremento. Assim, cada vez mais aumenta-se a contaminação dos corpos hídricos com os micropoluentes, pois estes estão presentes nos efluentes não tratados, ou tratados sem a devida eficácia, apresentando os corpos hídricos como destino final em algum momento do seu ciclo de vida (EGGEN *et al.*, 2014).

Alguns dos micropoluentes, mesmo em baixas concentrações, conferem à água características de toxicidade, deixando-a imprópria para grande parte dos usos. Algumas

classes de micropoluentes que conferem toxicidade à água são: defensivos agrícolas, surfactantes não iônicos, produtos farmacêuticos, EDs, produtos de cuidado pessoal (PCP) e uma ampla gama de novos produtos químicos elaborados artificialmente para uso industrial (compostos sintéticos). Muitos destes compostos pertencentes a essas classes, apresentam características carcinogênicas, mutagênicas e até mesmo teratogênicas (FUNASA, 2014; GAVRILESCU *et al.*, 2015; SILVEIRA *et al.*, 2013; TAN *et al.*, 2015).

A ocorrência e o efeito potencial desses micropoluentes no meio ambiente vem recebendo atenção crescente por parte da comunidade científica, tendo em vista que atualmente eles não são incluídos em programas de monitoramento, e não existe uma legislação estabelecendo valores máximos e mínimos para lançamentos em corpos receptores porém alguns micropoluentes são candidatos a futuras regulações, pois podem ser potenciais ameaças para a saúde humana e a segurança ambiental. Os micropoluentes podem ser divididos em seis categorias a saber: (a) produtos farmacêuticos, (b) PCPs, (c) hormônios esteroides, (d) surfactantes, (e) produtos químicos e (f) pesticidas.

As principais fontes de micropoluentes em ambientes aquáticos são apresentadas na Tabela 2 (CELANO *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2014; SILVEIRA *et al.*, 2013).

Como consequência disso, uma grande variedade de micropoluentes podem e são encontrados em águas superficiais, particularmente em regiões metropolitanas. Atualmente, sabe-se pouco sobre os impactos nos ecossistemas devido à grande diversidade de micropoluentes presentes, exceto para os micropoluentes, que possuem potencial poder de causar perturbações no sistema endócrino de animais (EGGEN *et al.*, 2014; TUCCI, 2008; YANG; ZHOU; CICEK, 2014). Um dos impactos em potencial já amplamente conhecidos refere-se a perturbações no sistema endócrino de animais.

Tabela 2 - Fontes de micropoluentes em ambientes aquáticos

Categoria	Subclasses importantes	Principais fontes	
		Específica	Geral
Produtos farmacêuticos	Anti-inflamatórios não esteroides		Efluentes industriais
	Reguladores de metabolismo lipídico	Efluente doméstico (excreção); efluente hospitalar	lixiviação de aterro sanitário
	Antibióticos		
	β -bloqueadores		
	Estimulantes		
	Anticonvulsivantes.		

Tabela 2 (cont) - Fontes de micropoluentes em ambientes aquáticos

Categoria	Subclasses importantes	Principais fontes	
		Específica	Geral
PCPs	Desinfetantes	Efluente doméstico (banho)	Efluentes industriais de aterro sanitário
	Fragrância		
	Protetor solar		
	Repelentes		
Hormônios esteroides	Estrogênios	Efluente doméstico (excreção)	Efluentes industriais de aterro sanitário
Surfactantes	Surfactantes não iônicos	Efluente doméstico (banho, lavanderia)	
	Inseticidas	Escoamento agrícola; efluente doméstico	
Pesticidas	Herbicidas	(limpeza inadequada, escoamento de jardins,	
	Fungicidas	gramados, estradas e etc)	

Fonte: Adaptado LUO et al., 2014.

Tendo em vista o fato de que as estações convencionais de tratamento de água e de esgotos não foram projetadas especificamente para promover a degradação desses micropoluentes, várias técnicas de tratamento vem sendo testadas ao longo dos anos com foco na remoção dos mesmos (EGGEN *et al.*, 2014; TUCCI, 2008; YANG; ZHOU; CICEK, 2014).

Diante desse problema, surge a necessidade de desenvolver métodos analíticos sensíveis e seletivos para avaliar a incidência desses contaminantes no meio ambiente (ARBELÁEZ *et al.*, 2015; AYMERICH *et al.*, 2016; BEBIANNO *et al.*, 2016; BOIX *et al.*, 2015; REEVE *et al.*, 2017).

2.2.1 Produtos farmacêuticos e produtos de cuidado pessoal (PPCPs)

A ocorrência de produtos farmacêuticos e produtos de cuidados pessoais (PPCPs), e de outros micropoluentes, no ambiente aquático tornou-se uma questão de crescente preocupação ambiental e houve um aumento da preocupação com os potenciais impactos ambientais dos PPCPs, mesmo em baixas concentrações, devido a interações bioquímicas imprevisíveis quando misturadas e às vezes podem se concentrar na cadeia alimentar e especialmente afetar os organismos expostos (CALDAS *et al.*, 2016; CELANO *et al.*, 2014; CUNHA; ARAUJO; MARQUES, 2017; LUO *et al.*, 2014; SILVEIRA *et al.*, 2013).

Alguns PPCPs são persistentes no ambiente aquático e muitos dos que estão sob investigação são compostos biologicamente ativos. Embora ainda não se saiba muito sobre os efeitos dos PPCPs, mesmo que em baixos níveis de concentração, a exposição crônica a esses compostos ao longo da vida pode representar um risco para a saúde humana. Alguns PPCPs já são reconhecidos como desreguladores endócrinos, tais como a BEN e os parabenos, estes últimos usados como conservantes em formulações de vários PCs. Outro fator que deve ser levado em conta, são os possíveis efeitos sinérgicos dos diferentes PPCPs sobre a vida dos seres vivos expostos, através de sua ação não direcionada combinada com muitos outros compostos biologicamente ativos encontrados simultaneamente no meio aquático. Após a sua excreção, eles podem ser encontrados no ambiente em suas estruturais químicas originais, como metabólitos ou como produtos de transformação, que podem ser ainda mais tóxicos (CELANO *et al.*, 2014; SILVEIRA *et al.*, 2013; TRAN; HU; ONG, 2013).

O alto consumo de produtos farmacêuticos é a principal razão para sua presença no ambiente aquático, porém a entrada de produtos farmacêuticos no ambiente aquático também pode ser via processos de fabricação, eliminação de produtos não utilizados ou expirados e processos inadequados de tratamento de água. Uma vez que os produtos farmacêuticos são prescritos com uma dosagem exata para um efeito biológico específico, pouco se sabe sobre o potencial impacto para baixos níveis de concentração. Outra preocupação diz respeito especificamente à categoria dos antibióticos. A ingestão destes compostos pela água potável é suspeita de causar o desenvolvimento de resistência bacteriana. Além disso, muito preocupante é o risco ambiental devido à difusão de antibióticos nas águas superficiais e subterrâneas, uma vez que bloqueiam ou inibem

muitos mecanismos cruciais regulados por bactérias no ambiente aquático (desnitrificação, fixação de nitrogênio, degradação de matéria orgânica, etc) (ALYGIZAKIS *et al.*, 2016; CELANO *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2014).

Os PCPs - termo usado para designar produtos que podem ser encontrados nas seções de saúde e beleza de lojas de medicamentos e departamentos e que podem ser comprados sem receita médica - estão incluídos no consumo diário, sob a forma de sabonetes, loções, cosméticos, protetores solares, desinfetantes dentre outros. De modo diferente dos produtos farmacêuticos, os PCPs não são submetidos a alterações metabólicas, pois são produtos destinados ao uso externo na maioria das vezes, sendo removidos por lavagem. Porém, há casos em que pode haver a absorção destes pela pele, sendo acumulados ou excretados pela urina. Como consequência, grandes quantidades de PCPs são liberados para o ambiente em sua estrutura química original. Um exemplo típico são os parabenos, que estão presentes na formulação de vários PCPs, atuando como conservantes e que apresentam atividade estrogênica. Considerando que os produtos farmacêuticos têm sido amplamente estudados nos últimos anos, menos atenção foi dada à presença de PCPs em compartimentos ambientais e à sua toxicidade. Estudos recentes indicaram que muitos PCPs são ambientalmente persistentes, bioativos e possuem um potencial risco de bioacumulação, em decorrência do caráter lipofílico (log Kow superior a 3,5) (CELANO *et al.*, 2014; FIGUEIREDO *et al.*, 2016).

As propriedades físico-químicas dos PPCPs estudados no trabalho são apresentadas na Tabela 3 e suas estruturas químicas são mostradas na Figura 1.

Tabela 3 - Propriedades físico-químicas dos PPCPs estudados nesse trabalho

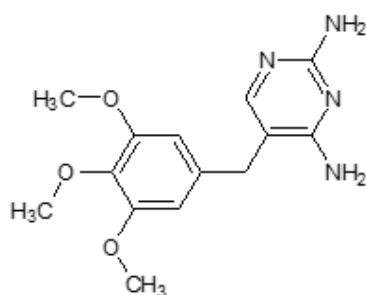
PPCP	MM ^{a,*}	Log Kow [*]	PF ^{b,*}	pKa	Pressão Vapor ^{c,*}	Solubilidade em água ^{d,*}	Constante Lei de Henry ^{e,*}
BEN	1,82x10 ²	3,18	63,5	-----	9,06x10 ⁻³	1,03x10 ²	1,94x10 ⁻⁶
BZP	3,16x10 ²	2,05	200	2,91; 11,1 ^g	1,90x10 ⁻⁷	1,75x10 ²	1,25x10 ⁻¹³
CZP	3,15x10 ²	2,41	218	1,50; 10,5 ^h	7,32x10 ⁻¹¹	3,58x10 ¹	7,02x10 ⁻¹³
DZP	2,84x10 ²	2,82	182	3,31 ⁱ	1,02x10 ⁻⁷	5,88x10 ¹	3,64x10 ⁻⁹
IBP	2,06x10 ²	3,97	94,2	4,50 ^j	1,86x10 ⁻⁴	4,11x10 ¹	1,52x10 ⁻⁷
TMP	2,90x10 ²	0,912	189	7,31 ^k	7,52x10 ⁻⁹	2,33x10 ³	2,39x10 ⁻¹⁴

Legenda: ^a Massa Molecular – g mol⁻¹; ^b Ponto de Fusão - ° C; ^c – mm Hg; ^d – mg L⁻¹, a 25° C; ^e – atm m³ mol⁻¹; ^fAL-HAWASLI; AL KHAYAT; AL MARDINI, 2012; ^gKAPLAN *et al.*, 1974; ^hHAN; YAKATAN; MANESS, 1977; ⁱ TSUME *et al.*, 2012; ^j BERGLUND; KILLANDER;

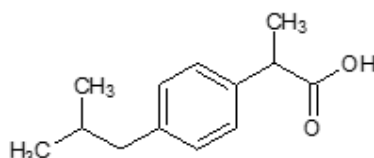
POMPEIUS, 1975; *Dados disponíveis no site: < www.chemspider.com >. Acessado em 05/06/2020.

Fonte: Autor

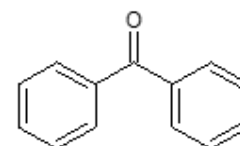
Figura 1 - Estrutura dos PPCPs estudados nesse projeto



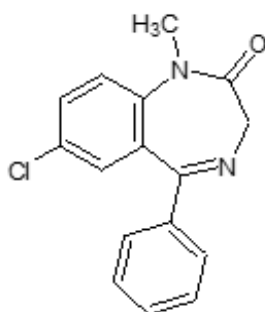
Trimetoprim (TMP)



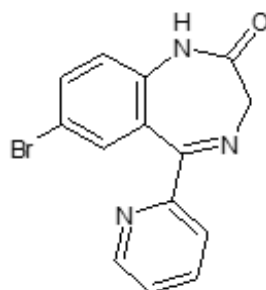
Ibuprofeno (IBP)



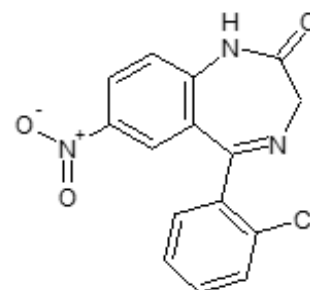
Benzofenona (BEN)



Diazepam (DZP)



Bromazepam (BZP)



Clonazepam (CZP)

Fonte: Autor

2.2.1.1 Antibióticos

Os antibióticos são uma classe de produtos farmacêuticos muito presentes na medicina moderna. Estes são compostos produzidos por um microrganismo ou vias sintéticas que possuem a função de inibir ou eliminar o crescimento de outro microrganismo, como bactérias. Estima-se que o total de antibióticos consumidos ao redor do mundo seja na ordem de 100.000 a 200.000 toneladas por ano. Os antibióticos são utilizados para o tratamento de infecções humanas, mas também são utilizados em medicina veterinária. Alguns deles também são amplamente utilizados como promotores de crescimento na aquicultura, agricultura e pecuária, sendo uma das principais fontes de

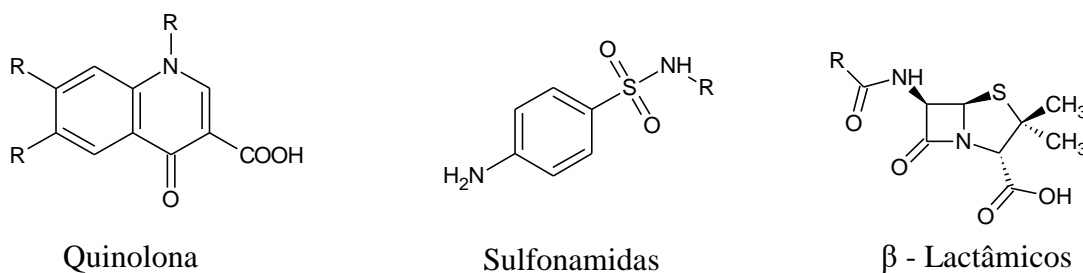
liberação de antibióticos no ambiente. Recentemente, tem havido um crescente interesse pela presença desses compostos no meio aquático, devido alto consumo e pseudo persistência no meio ambiente (CHEN; ZHOU, 2014; GARCÍA-GALÁN; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2010; HIRSCH *et al.*, 1999; KÜMMERER, 2009; LI *et al.*, 2012).

Muitos dos antibióticos prescritos não são completamente absorvidos ou metabolizados, e uma fração considerável (80-90%) é excretado via urina e/ou fezes, em sua forma ativa ou em seus metabólitos para o meio aquático. As ETAs apresentam uma taxa de remoção variável entre 10% a 90%. Essa variação se dá devido as propriedades físico-químicas dos antibióticos, como por exemplo, solubilidade em água, log Kow, pKa e a tecnologia de tratamento adotada. Dessa forma, as ETAs podem estar despejando nos corpos hídricos quantidades cada vez maiores desses compostos, visto que o grande uso desses produtos farmacêuticos (GARCÍA-GALÁN; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2010; YAN *et al.*, 2013).

Em contraste com as propriedades e efeitos desejados a partir da aplicação terapêutica de antibióticos, essas mesmas propriedades são muitas vezes desvantajosas para os organismos alvo e não-alvo presentes no meio ambiente (KÜMMERER, 2009). A presença desses antibióticos em ambientes aquáticos representam uma ameaça para os organismos, pois oferecem uma exposição crônica, podendo induzir o desenvolvimento de agentes patogênicos resistentes aos antibióticos (LLORCA *et al.*, 2014; YAN *et al.*, 2013).

Algumas classes de antibióticos que estão entre os mais prescritos, estão as quinolonas, sulfonamidas e β -lactâmicos, com suas estruturas apresentadas na Figura 2. Estes compostos já, foram observados em águas residuais, lamas de esgoto, sedimentos, solos e alimentos em muitas regiões e países. Muitos rios e oceanos têm sérios problemas de contaminação com antibióticos, e antibióticos em água podem ser potencialmente bioacumulados em organismos aquáticos (KÜMMERER, 2009; LI *et al.*, 2012).

Figura 2 - Estrutura de algumas classes de antibióticos já encontrados no meio ambiente



Fonte: Autor

Para a interferência no crescimento celular bacteriano, os antibióticos devem interagir com estruturas vitais ou bloquear uma rota metabólica. As sulfonamidas inibem a síntese dos ácidos nucléicos. Esta classe de antibióticos inibe a formação do ácido fólico, que por sua vez é um precursor essencial para a síntese dos ácidos nucléicos. Essa inibição se dá pela semelhança entre as estruturas das sulfonamidas e o ácido p-aminobenzoico (PABA). Ao capturar a sulfonamida, não há produção de folato, um passo essencial para a produção do DNA bacteriano. A sulfametoxazol (SMZ - 5-metil-3-sulfanilamidoisoxazole), apresenta um amplo espectro que inibe a enzima diidropteroate sintetase. Quando em quantidades suficientes, a SMZ é utilizado pela enzima da bactéria (diidropteroate sintetase) em vez do PABA, formando análogos não funcionais do ácido fólico (BEDOR *et al.*, 2008; QUINN *et al.*, 2005).

Já o TMP (2,4-diamino-5-(3,4,5-trimetoxibenzil-pirimidina) é apresentado na Figura 1 é um derivado sintético da pirimidina, inibe a atividade da diidrofolato-redutase, um passo posterior na síntese do ácido fólico pelas bactérias. Quando combinados, a SMZ e o TMP potencializam a ação de cada um, resultando em um aumento da atividade contra a ação das bactérias (BEDOR *et al.*, 2008; QUINN *et al.*, 2005).

O TMP é um pó cristalino, branco ou branco amarelado, praticamente inodoro. Muito solúvel em água, ligeiramente solúvel em clorofórmio e metanol (MeOH), pouco solúvel em etanol e acetona e praticamente insolúvel em éter etílico. Outras propriedades físico-químicas do TMP podem ser vistas na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** e a estrutura química na Figura 1 (ANVISA, 2010).

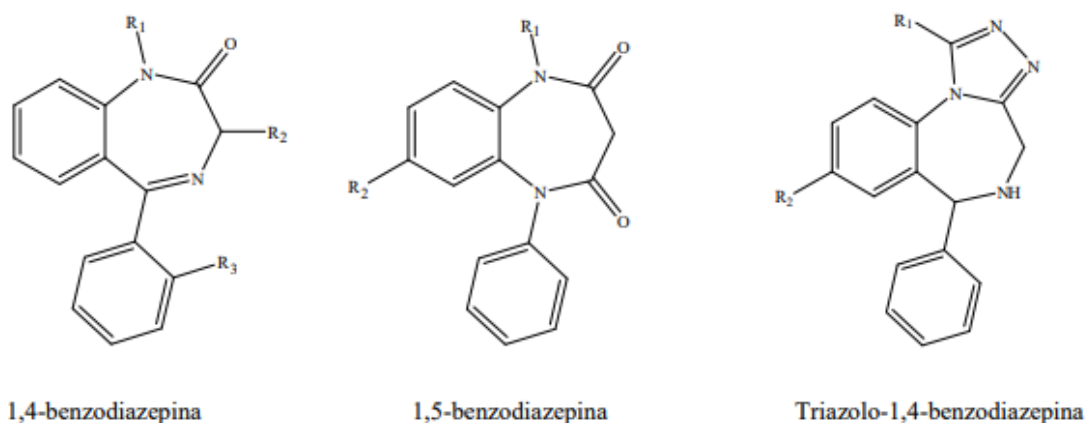
2.2.1.2 Benzodiazepínicos

Os benzodiazepínicos são caracterizados pela presença de um anel benzênico fundido a um anel de 7 membros contendo dois átomos de nitrogênio e cinco átomos de carbono. Os benzodiazepínicos podem ser agrupados em três subclasses: derivados da 1,4 benzodiazepina; 1,5 benzodiazepina; derivados da triazolo-1,4-benzodiazepina. As três subclasses dos benzodiazepínicos são apresentados na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** Os benzodiazepínicos são produtos farmacológicos psicoativos que são frequentemente prescritos para alívio da ansiedade. Estes são também amplamente

utilizados para o tratamento de epilepsia e insônia. Estudos demonstraram que esses compostos podem causar danos aos sistemas psicomotores e cognitivos (ALMEIDA *et al.*, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2013; KURKO *et al.*, 2015; NUNES; BASTOS, 2016).

Os benzodiazepínicos vêm sendo cada vez mais empregado em “causas ilícitas”, estando dessa maneira relacionados com o uso abusivo. Nos últimos anos, o número de crimes facilitados pelo uso de benzodiazepínicos aumentou, devido a suas propriedades sedativas e amnésicas. As propriedades dos benzodiazepínicos de alteração do humor combinadas com sua habilidade para evitar os efeitos da abstinência de outras drogas têm incentivado a sua disponibilidade no mercado de drogas ilícitas. Nas festas “raves” são conhecidos como “downers” porque reduzem os efeitos das anfetaminas e ecstasy. Casos onde essas drogas são introduzidas em bebidas, com a finalidade de deixar a pessoa que ingeriu incapacitada são muito comuns, principalmente em casos de estupro (CHÈZE; VILLAIN; PÉPIN, 2004; GIL TEJEDOR; HERNANDO; ALEGRÍA, 2007; MCCLEAN *et al.*, 1999; MIYAGUCHI *et al.*, 2006).

Figura 3 - Estrutura química das três subclasses de benzodiazepínicos



Fonte: MAGALHÃES, 2012

Ao entrarem na ETE, alguns produtos farmacêuticos são removidos através de biodegradação ou adsorção nas partículas sólidas que formam o lodo, enquanto outros permanecem inalterado ou parcialmente degradado, produzindo produtos de transformação intermediária. Os benzodiazepínicos são normalmente compostos halogenados, tornando-os resistentes à biodegradação. Uma vez introduzidos no ambiente, estes podem representar uma ameaça para os ecossistemas de água doce devido aos seus efeitos sobre

os organismos não visados, pois podem ter atividades farmacológicas e biológicas inesperadas em organismos não visados, pois este grupo de produtos farmacêuticos atua no sistema nervoso central e endócrino, afetando diretamente a regulação do comportamento e padrões de reprodução (ARBELÁEZ *et al.*, 2015; AYMERICH *et al.*, 2016; BEBIANNO *et al.*, 2016; BOIX *et al.*, 2015; REEVE *et al.*, 2017).

O BZP (7-Bromo-1,3-diidro-5-(2-piridinil)-2H-1,4-benzodiazepin2-ona) é um pó cristalino, branco ou ligeiramente amarelado e inodoro. Apresenta uma solubilidade em água a 25° C de $1,75 \times 10^2$ mg L⁻¹. Ligeiramente solúvel em etanol e cloreto de metileno. Outras propriedades físico-químicas do BZP podem ser vistas na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** e a estrutura química na Figura 1 (ANVISA, 2010).

O CZP (5-(2-clorofenil)-1,3-diidro-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepin2-ona) é um pó cristalino, branco ou ligeiramente amarelado e praticamente inodoro. Apresenta uma solubilidade em água a 25° C de $3,54 \times 10^1$ mg L⁻¹. Ligeiramente solúvel em etanol e cloreto de metileno. Outras propriedades físico-químicas do CZP podem ser observadas na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** e a estrutura química na Figura 1 (ANVISA, 2010).

O DZP (7-Cloro-1-metil-5-fenil-1,3-diidro-2H-1,4-benzodiazepin2-ona) é um pó cristalino, branco ou ligeiramente amarelado e inodoro. Apresenta uma solubilidade em água a 25° C de $5,88 \times 10^1$ mg L⁻¹. Solúvel em clorofórmio e etanol. Outras propriedades físico-químicas do DZP podem ser observadas na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** e a estrutura química na Figura 1 (ANVISA, 2010; SILVA, 2013).

2.2.1.3 Protetores solar

A exposição excessiva à radiação ultravioleta (UV) tem efeitos nocivos para a saúde humana, pois pode causar vários distúrbios da pele, incluindo queimaduras solares, fotodermatose e câncer de pele. Com a crescente conscientização pública sobre esses perigos, a demanda por PCPs contendo filtros de radiação UV em suas formulações aumentou significativamente nos últimos anos. Esses filtros de radiação UV possuem estruturas aromáticas únicas ou múltiplas conjugadas com diferentes grupos químicos. Estes compostos, que podem absorver a radiação UV, não são apenas amplamente

utilizados em muitos produtos cosméticos, como loções protetoras solares, cuidados com a pele e maquiagem facial mas também em plásticos, adesivos, tintas e borrachas para proteger esses produtos da degradação UV. A inclusão generalizada de filtros UV em PCPs e também em produtos de consumo aumenta a exposição humana a esses compostos. Na atualidade, uma grande quantidade de pacotes de alimentos, plásticos e têxteis contêm filtros UV para evitar a degradação do polímero e perdas de qualidade comida. Os filtros UV entram no corpo humano principalmente através da cadeia alimentar (RODRÍGUEZ-GÓMEZ *et al.*, 2015; VALLE-SISTAC *et al.*, 2016; VELA-SORIA *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2017).

Devido ao seu uso extensivo e propriedades físico-químicas, como por exemplo, alta lipofilicidade, os filtros UV podem estar presentes no ambiente em concentrações potencialmente nocivas. Além disso, esses compostos podem causar sérios problemas devido à sua toxicidade endócrina. Particularmente, as benzofenonas, um dos grupos mais comumente utilizados de filtros UV, apesar de os ensaios *in vivo* e *in vitro* demonstrarem que este grupo de compostos apresentam atividade perturbadora do sistema endócrino (VELA-SORIA *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2017).

Em um estudo publicado em 2012, pesquisadores investigaram a ocorrência de benzofenonas, utilizados em formulações de alguns PCPs com fins de proteção de pele e cabelo contra radiação UV em mulheres norte americanas. Os autores descobriram que a exposição a altos níveis de filtros contendo benzofenonas poderia aumentar as chances de um diagnóstico de endometriose devido à sua atividade estrogênica (KUNISUE *et al.*, 2012).

A BEN (1,1-difenilmetanona) é um pó cristalino, branco e inodoro. Apresenta uma solubilidade em água a 25° C de $1,03 \times 10^2 \text{ mg L}^{-1}$. Outras propriedades físico-químicas da BEN podem ser observadas na Tabela 3 e a estrutura química na Figura 1.

2.2.1.4 Anti-inflamatório

O IBP é um produto farmacêutico ácido, pertencente à classe de produtos farmacêuticos anti-inflamatórios não esteroides (AINE). Em todo o mundo, variedades de formulações estão disponíveis para consumo sem receita médica, tais como cápsulas,

comprimidos, suspensão oral dentre outras formas. A eliminação deste produto farmacêutico ocorre principalmente pela via urinária. Cerca de 90% do princípio ativo e de seus metabólitos são excretados por essa via, tendo o ambiente aquático como destino. Outra fonte importante desses produtos farmacêuticos no meio ambiente é a remoção incompleta durante o processo de tratamento de esgoto (COLAÇO, 2013; CUNHA; ARAUJO; MARQUES, 2017; MADIKIZELA; CHIMUKA, 2016).

O IBP entrou em comercialização para promover a substituição de outros produtos farmacêuticos de mesma classe, AINE, porém que tinham efeitos colaterais, tais como irritação gastrointestinal e intolerância no organismo. Por outro lado, o IBP também é um AINE, que também possui propriedades anti-inflamatórias moderadas, porém com efeitos colaterais bem mais suaves do que os anteriores. O IBP não é só eficaz contra inflamações amenas, mas também é eficaz para doenças inflamatórias mais graves (PALMA *et al.*, 2009).

O IBP (ácido (RS)-2-(4-(2-metilpropril)fenil) propanóico) é um pó cristalino branco ou quase branco, com odor característico. Em água apresenta uma solubilidade a 25° C de $4,11 \times 10^1$ mg L⁻¹. Este é muito solúvel em etanol, acetona, MeOH e clorofórmio (ANVISA, 2010). Outras propriedades físico-químicas do IBP estão apresentadas na Tabela 3 e a estrutura química na Figura 1.

2.2.2 Desreguladores Endócrinos (EDs):

Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA - do inglês *United States Environmental Protection Agency*), um desregulador endócrino é “um agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, metabolismo, ligação ou eliminação dos hormônios naturais do corpo, os quais são responsáveis pela homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento”. Já o Programa Internacional de Segurança Química (IPCS - do inglês *International Programme on Chemical Safety*), juntamente com o Canadá, o Japão, os Estados Unidos, a OEDC (do inglês *Organization for Economic Co-operation and Development*) e a União Europeia, utiliza uma definição mais abrangente, e entende que um desregulador endócrino seja “uma substância ou uma mistura de substâncias exógenas que alteram uma ou várias funções do sistema endócrino

e, conseqüentemente, causam efeitos adversos sobre a saúde de um organismo intacto, sua descendência, e/ou (sub) populações” (ARAÚJO; BAUERFELDT; CID, 2018; CAMILLERI *et al.*, 2015; KABIR; RAHMAN; RAHMAN, 2015). Os EDs podem ser classificados em duas categorias:

- a) Naturais: Aqueles que ocorrem naturalmente; nesta categoria temos os produtos naturais que são naturalmente encontrados em alimentos, como por exemplo, fito-estrogênio;
- b) Sintéticos: São aqueles que são sintetizados e esta categoria pode ser reagrupada em:
 - Produtos químicos sintéticos usados como solventes ou lubrificantes industriais e seus subprodutos (Ex.: bifenilas policloradas (PCBs), bifenilas polibromadas (PBBs), dioxinas)
 - Plásticos (Ex. BPA)
 - Plastificantes
 - Alguns agentes farmacêuticos (Ex. dietilestilbestrol (DES)).

Os EDs podem ser agrupados também de acordo com suas origens. São eles:

- a) Hormônios naturais e artificiais;
- b) Medicamentos com efeitos colaterais hormonais;
- c) Produtos químicos de uso industrial e domésticos (Ex.: ftalatos, detergentes alquilfenol etoxilados, retardantes de fogo, plastificantes, solventes, 1,4-diclorobenzeno e policlorados, bisfenóis (KABIR; RAHMAN; RAHMAN, 2015)).

A desregulação ou alteração das funções endócrinas pode estar associada a interferências na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação dos hormônios naturais dos organismos, desencadeando assim uma nova resposta hormonal. Uma substância, ao imitar a ação de um hormônio endócrino, desencadeia de modo exagerado ou em tempo inadequado um estímulo falso, podendo causar prejuízos aos organismos expostos mesmo em baixas concentrações (BILA; DEZOTTI, 2007; CASTRO-CORREIA; FONTOURA, 2015; RODRÍGUEZ-GÓMEZ *et al.*, 2015). Alguns estudos apontam para a capacidade dos EDs de provocar desenvolvimento de algumas doenças como câncer de mama, de útero e de próstata, desenvolvimento sexual anormal, redução de fertilidade masculina dentre outros tipos (ALVES *et al.*, 2007; ARCHER; WOLFAARDT; van WYK, 2017). A Tabela 4 apresenta alguns dos EDs mais comuns e onde estes são usados em nosso cotidiano.

Os EDs presentes nos corpos hídricos são provenientes de fontes pontuais (como esgotos domésticos e efluentes industriais) ou difusas (como os defensivos agrícolas).

Estudos apontam para a resistência de algum desses compostos frente ao processo de degradação realizado nas ETE. Dessa forma, as águas residuais oriundas das ETEs, são descartados nos corpos hídricos receptores, porém estas águas residuais ainda contêm boas quantidades desses compostos. Como pôde ser vista na Tabela 4, alguns desses contaminantes são encontrados em uma alta diversidade de produtos comumente usados na vida cotidiana, eles são continuamente introduzidos nos corpos hídricos.

Normalmente, os EDs são determinados em concentrações que variam entre $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} nos rios e mananciais. No entanto, seus efeitos adversos podem se manifestar mesmo em baixas concentrações, uma vez que pequenas variações hormonais são suficientes para desencadear uma reação endócrina (CAMILLERI *et al.*, 2015; CASTRO-CORREIA; FONTOURA, 2015; FUNASA, 2014). Exemplos clássicos dos efeitos dos EDs no meio ambiente incluem a feminização de peixes machos e a ocorrência generalizada de anti-androgênicos em rios que recebem efluentes de estações de tratamento de esgoto (ARCHER; WOLFAARDT; van WYK, 2017).

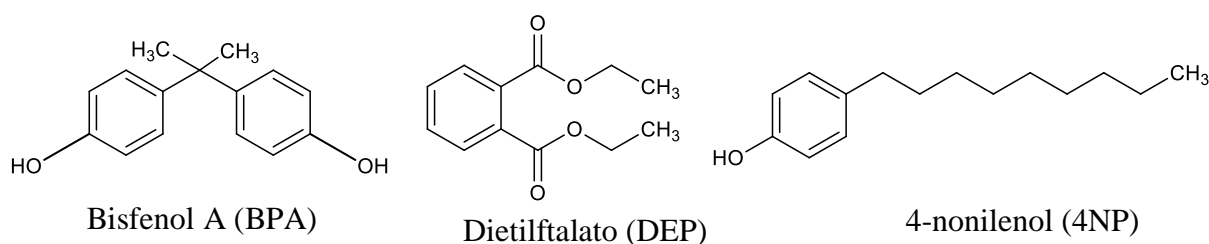
Tabela 4 – EDs mais comuns e respectivos usos

EDs comuns	Uso
Diclorodifeniltricloroetano (DDT)	
Ácido 2.4-diclorofenoxiacético	Pesticidas
Glifosato	
Chumbo	
Cádmio	Produtos infantis
BPA	
Ftalatos	Embalagem de alimentos
Fenol	
Retardantes de chama bromados	Eletrônicos e materiais de construção
Parabenos	
Fragrâncias	Produtos de cuidados pessoais
Ciclosiloxinos	
Nonilfenol	
Alquilfenóis	Surfactantes
Etinil Estradiol (Esteróide Sintético)	Contraceptivos

Fonte: Adaptado KABIR; RAHMAN; RAHMAN, (2015)

Os EDs estudados nesse trabalho são mostrados na Tabela 5 e suas estruturas químicas são mostradas na Figura 4.

Figura 4 - Estrutura dos EDs estudados nesse projeto



Fonte: Autor

Tabela 5 - Propriedades físico-químicas dos EDs estudados nesse trabalho.

ED	MM ^{a,*}	Log Kow [*]	PF ^{b,*}	pKa	Pressão Vapor ^{c,*}	Solubilidade em água ^{d,*}	Constante Lei de Henry ^{e,*}
BPA	2,28x10 ²	3,22	132	9,59 ^f 11,3 ^f	2,27x10 ⁻⁷	1,72x10 ²	9,16x10 ⁻¹²
DEP	2,22x10 ²	2,42	- 4,05	-----	2,10x10 ⁻³	1,08x10 ³	-----
4NP	2,20x10 ²	5,76	91,8	10,7 ^g	6,86x10 ⁻⁴	1,57	5,97x10 ⁻⁶

Legenda: ^a Massa Molecular – g mol⁻¹; ^b Ponto de Fusão - ° C; ^c – mm Hg; ^d – mg L⁻¹, a 25° C; ^e – atm m³ mol⁻¹; ^f – STAPLES et al., 1998; ^g – USEPA, 2005; * Disponíveis em: < <http://www.chemspider.com>>. Acesso em: 5 jun. 2020.

Fonte: Autor

2.2.2.1 Bisfenol A

O BPA é utilizado como monômero na produção de plástico policarbonato, amplamente utilizados em utensílios domésticos, tais como garrafas de água, mamadeiras e é o componente principal da resina epóxi, resina essa utilizada em embalagens de alimentos. Há uma enorme quantidade de fontes de exposição ao BPA, entre elas, alimentos e bebidas enlatadas, bebedouros de policarbonato, protetores de traveseiros, detergentes para louças e roupas, banheira e cerâmica, PCPs como protetor solar, esmaltes, sabonetes dentre outros (BHATNAGAR; ANASTOPOULOS, 2017; CHEN *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2011).

O BPA (2,2-4,4'-dihidroxidifenil propanona) é um pó cristalino branco, com odor característico. Em água apresenta uma solubilidade a 25° C de $1,72 \times 10^2$ mg L⁻¹. Outras propriedades físico-químicas do BPA podem ser vistas na Tabela 5 e a estrutura química na Figura 4.

Há uma grande atenção por parte da comunidade científica sobre o BPA, devido a sua larga produção e sua ampla aplicação industrial em embalagens. Apesar da durabilidade das embalagens, estas promovem a liberação do BPA para o meio que está em contato com a embalagem (BOMFIM *et al.*, 2015). O BPA pode ser transferido da embalagem para o meio devido ao fato das ligações ésteres que ligam os monômeros nos materiais plásticos serem rompidas sob condições de calor, meio ácido ou básico, sendo já registrados em fórmulas infantis, leite humano, produtos enlatados dentre outros (DOERGE *et al.*, 2011; FÜRHACKER; SCHARF; WEBER, 2000; STAPLES *et al.*, 1998). A exposição humana ao BPA produz efeitos adversos na função de reprodução masculina, desestabilização da função normal da glândula tiroide, hipertensão e doenças cardiovasculares (BHATNAGAR; ANASTOPOULOS, 2017; MÍNGUEZ-ALARCÓN; HAUSER; GASKINS, 2016; SEACHRIST *et al.*, 2016).

Estudos apontam os bebês até o segundo ano de vida como o grupo etário mais exposto, pois como já falado, alguns produtos destinados à esta faixa de idade são suscetíveis a presença de BPA, como chupetas, mamadeiras dentre outros. A crescente preocupação com o BPA, surgiu com seu alto potencial estrogênico em animais, mesmo em baixas concentrações, corroborando para a necessidade de metodologias analíticas de determinação deste, que se obtenha resultados confiáveis (BHATNAGAR; ANASTOPOULOS, 2017; BOMFIM *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2011).

2.2.2.2. Dietilftalato

O DEP é um derivado éster do ácido ftálico, membro de uma classe dos ftalados. Esses ftalatos possuem a função de facilitar a produção e aumentar a flexibilização e a resistência do produto como pode ser visto em embalagens plásticas. O DEP é classificado como ftalato de baixa massa molecular, sendo facilmente encontrados em formulações de medicamentos, perfumes, esmaltes, xampus, brinquedos (GÓMEZ-HENS; AGUILAR-

CABALLOS, 2003; VIECELLI *et al.*, 2011). Muitos ftalatos já foram identificados e classificados como EDs e esses compostos possuem uma grande preocupação, pois os ftalatos não são quimicamente ligados ao plástico da embalagem, facilitando a liberação destes para o produto que entra em contato direto (FARAJZADEH; MOGADDAM, 2012).

O potencial de contaminação por ftalatos, em amostras biológicas, ambientais e de alimentos está relacionado a uma série de parâmetros, incluindo pH, tempo de contato, temperatura de armazenamento, estrutura química e o caráter lipofílico do meio em que será inserido. A principal incidência de DEP em amostras de água superficial provém do lançamento de efluentes *in natura* ou sem o devido tratamento (BOŠNIR *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2012). Outra fonte de contaminação se dá através do processo de lixiviação, desde que as condições ambientais sejam suficientes para atender aos parâmetros mencionados acima, pode estar ocorrendo o processo de lixiviação dos ftalatos presentes nas embalagens plásticas para o conteúdo interno. Com relação ao processo de lixiviação, chama-se a atenção para o caso da lixiviação dos ftalatos presentes em garrafas plásticas para o conteúdo interno, para a água mineral, sendo esta uma das mais importantes fontes de contaminação humana. Esta contaminação pode estar relacionada com o processo de engarrafamento da água ou pela reutilização das embalagens plásticas e ao tempo de contato, uma vez que, o aumento do tempo de contato favorece a lixiviação. Devido ao risco à saúde humana, a União Europeia (UE) juntamente com a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu o valor máximo de $8,00 \times 10^3 \text{ ng L}^{-1}$ de DEP em água potável (BOŠNIR *et al.*, 2007; WHO, 2008).

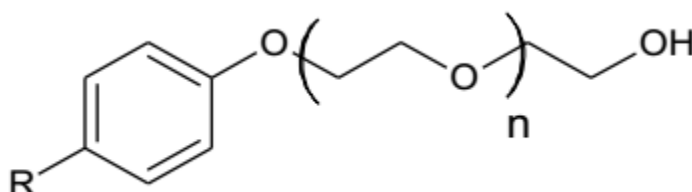
O DEP é um líquido transparente, praticamente sem odor. Em água apresenta uma solubilidade a 25° C de $1,08 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$. Outras propriedades físico-químicas do DEP são apresentadas na Tabela 5 e a estrutura química na Figura 4.

2.2.2.3. 4-Nonilfenol

O 4NP é um produto de degradação dos alquilfenóis etoxilados (APEs) que a estrutura fundamental está apresentada na Figura 5, que pertence à classe dos surfactantes não-iônicos, amplamente utilizados em resinas fenólicas, aditivos plásticos, detergentes, emulsificantes, formulações de defensivos agrícolas dentre outras. O alquilfenol etoxilado

mais relevante, é o nonilfenol etoxilado (NP_nEO), representando cerca de 80% da produção, dos quais 60% possuem como destino final o meio ambiente (ARAÚJO; BAUERFELDT; CID, 2017).

Figura 5 - Estrutura do alquilfenol etoxilado



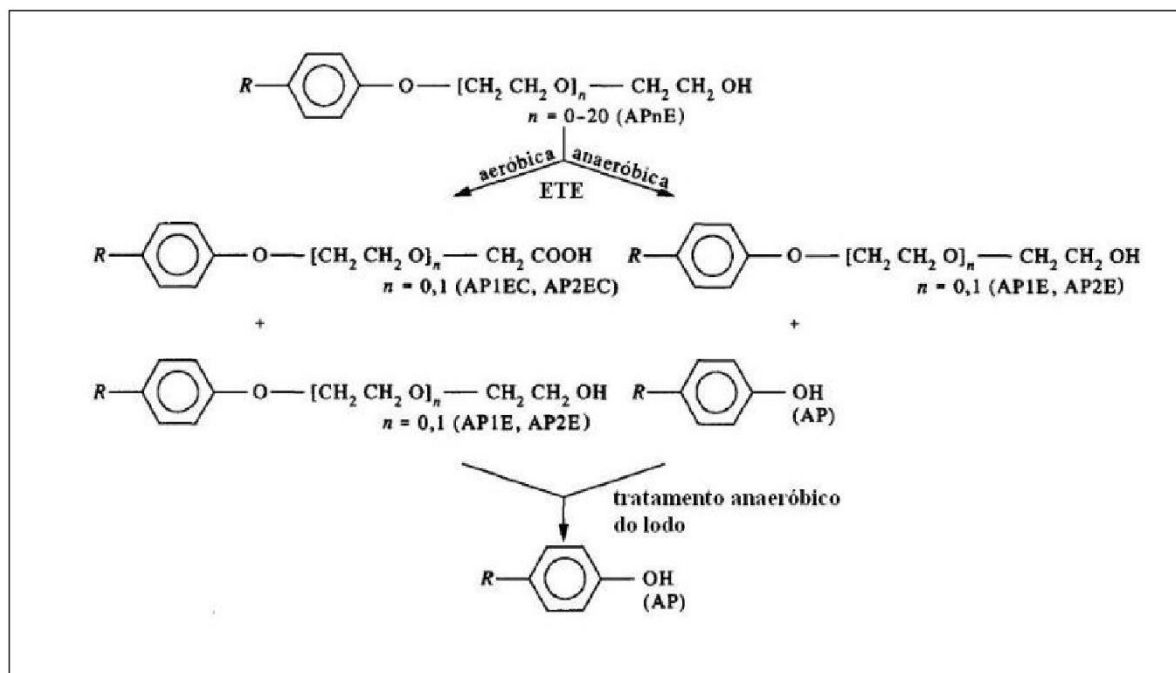
Fonte: Autor

APEs são comumente encontrados em quantidades consideráveis no meio ambiente, como por exemplo em águas superficiais de rios e lagos, acumulados em espécies aquáticas, incluindo plantas, algas e peixes e principalmente em ETEs, onde eles são biodegradados formando vários metabólitos, como por exemplo o nonilfenol etoxilado, nonilfenol dietoxilado, ácido nonilfenoxiacético, alquilfenol etoxilado, alquilfenol dietoxilado, 4NP e octilfenol entre outros (SILVA et al., 2007).

A formação do 4NP a partir da biodegradação, com ausência de oxigênio, dos APEs, se dá através da perda de unidades de óxido de etileno, como ilustrado na Figura 6 para formar etoxilados de baixo peso molecular ou através da formação de etoxilados carboxilados e em dióxido de carbono (CO₂) e água em último estágio, formando vários metabólitos, incluindo o nonilfenol etoxilado, nonilfenol dietoxilado, ácido nonilfenoxiacético, alquilfenol etoxilado, alquilfenol dietoxilado, 4NP e octilfenol entre outros (SILVA et al., 2007).

Estudos já demonstraram que os produtos de degradação dos APEs são mais persistentes e tóxicos do que as substâncias de origem, possuindo ainda a capacidade de causar desregulação dos hormônios naturais, por interagir como receptor de estrogênio (RENNER, 1997).

Figura 6 - Rotas de biodegradação do alquilfenol etoxilado



Fonte: SILVA et al., (2007)

A biodegradação dos APEs com ausência de oxigênio (processo anaeróbico) é favorecida entre 4 a 8 vezes para a completa biodegradação do precursor e formação do 4NP quando comparada sob condições de presença de oxigênio. Ahel e colaboradores (1994) demonstraram que o 4NP pode ser degradado por exposição solar. Estes autores demonstraram que tal composto apresenta um tempo de meia vida de 10-15 horas quando estes estão próximos a superfície, sendo dessa forma, mais expostos a radiação solar. Entretanto para camadas mais profundas, com profundidades entre 20 e 25 cm, o tempo de meia vida é atenuado, sendo aproximadamente 1,5 vezes mais devagar do que na superfície (15-22,5 horas) (AHEL *et al.*, 1994; ARAUJO; BAUERFELDT; CID, 2017; SOLÉ *et al.*, 2000; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK *et al.*, 2009).

Observou-se que 4NP era capaz de induzir a proliferação de células de tumor da mama. A capacidade de competição deste com o local de ligação do receptor de estrogênios naturais, como por exemplo, o hormônio 17β -estradiol (E2) também já foi observado (SOARES *et al.*, 2008). Após a descoberta dos perigos que o 4NP e seus precursores poderiam causar nas pessoas, seu uso e de seu precursor foi banido em muitos países sendo substituído por outros tensoativos que apresentassem maior segurança para a população e o ambiente.

O 4NP é um pó branco, sem odor. Em água, apresenta uma solubilidade de 1,57 mg L⁻¹ a 25° C. Outras propriedades físico-químicas do 4NP podem visualizadas na Tabela 5 e a estrutura química na Figura 4.

2.3 Ensaios Ecotoxicológicos

O monitoramento ambiental, independentemente da matriz ambiental em foco (água, solo ou ar) geralmente inclui variáveis físico-químicas tradicionais, tais como pH, condutividade, oxigênio dissolvido (OD), demanda química de oxigênio (DQO) dentre outros, e mais recentemente, em nível de pesquisa principalmente, a determinação de contaminantes-alvo, inclusive micropoluentes com o uso da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (HPLC-MS/MS - do inglês *High Pressure Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry tandem*), UPLC-MS/MS ou cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS - do inglês *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*). Para os casos dos micropoluentes, estes apresentam um gargalo relacionado com a limitada disponibilidade de métodos analíticos e de mão de obra qualificada. Outra limitação está relacionada com a incapacidade de previsão dos efeitos tóxicos de misturas complexas de substâncias químicas (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011).

Dessa forma, os ensaios ecotoxicológicos com a aplicação de protocolos definidos e a utilização de organismos bioindicadores, permitem prever os efeitos tóxicos de uma matriz ambiental e, a partir destes, é possível antever os possíveis efeitos dos contaminantes nos ecossistemas. Tal abordagem permite, inclusive avaliar o efeito sobre os organismos vivos resultantes da interação de diferentes contaminantes presentes na matriz ambiental, mesmo que a natureza dessa contaminação não seja conhecida.

Os ensaios ecotoxicológicos não substituem as análises químicas, mas são complementares a elas, uma vez que as análises químicas determinam, dentre outras coisas, a(s) concentração(ões) do(s) contaminante(s) existente(s) na amostra e os testes de toxicidade avaliam o efeito desses poluentes sobre os sistemas biológicos.

Os ensaios ecotoxicológicos, são ensaios conduzidos principalmente em laboratório onde é possível estabelecer condições experimentais controladas e específicas para cada

ensaio (RIBO, 1997). Nestes ensaios, os organismos-testes são expostos a diferentes amostras, que podem apresentar diferentes níveis de concentração dos contaminantes de interesse, e os efeitos tóxicos (efeito agudo ou crônico) produzidos por tal exposição são observados e quantificados (HILL; TERAOKA; HEIDEMAN, 2005).

Os organismos que podem ser utilizados nos ensaios com matrizes aquosas pertencem, basicamente, a um dos quatro níveis tróficos: (i) organismos produtores (ex: microalgas fotossintéticas); (ii) consumidores primários (ex: microcrustáceos); (iii) consumidores secundários (ex: peixes) e (iv) decompositores (ex: bactérias decompositoras). Tais organismos denominados organismos-teste ou bioindicadores podem ser mantidas em laboratório e sua biologia e ciclo de vida são suficientemente conhecidos para que possam ser utilizados como indicadores da toxicidade. Com relação às metodologias dos ensaios e de cultivo desses organismos, normas técnicas validadas por diferentes organismos nacionais e internacionais (ex: ABNT, USEPA, etc) encontram-se disponíveis, permitindo a reprodutibilidade dos resultados.

Os efeitos tóxicos causados por matrizes ambientais contaminadas podem ser classificados como agudos e crônicos. O efeito agudo está relacionado com a observação de organismos que foram geralmente expostos a altos níveis de concentrações da(s) substância(s) de interesse(s) por curto período de tempo, não abrangendo todo o ciclo de vida dos mesmos. Tais ensaios de toxicidade aguda tem por objetivo, avaliar os efeitos mais graves e imediatos sobre os organismos expostos, mesmo após curtos períodos de exposição. Manifestam-se basicamente por meio de percentuais de mortalidade. Já os efeitos crônicos são observados após exposição dos organismos por períodos mais longos a baixos níveis de concentrações da(s) substância(s) de interesse(s), e períodos que englobam todo ou quase todo seu ciclo de vida. Tais ensaios geralmente têm o objetivo de avaliar os efeitos subletais que podem ser provocados nos indivíduos, tais como alterações na taxa de reprodução ou crescimento (SABINO, 2018).

Os efeitos causados nos organismos expostos, estão relacionados tanto ao espectro de contaminantes presentes bem como o nível de concentração dos mesmos (REGINATTO, 1998). Em muitos casos, um contaminante sozinho não é capaz de provocar efeitos tóxicos sobre a biota, porém, contaminantes combinados entre si, pode produzir efeitos aos organismos expostos, assim como apresentar efeitos aumentados, do tipo aditivo ou mais que aditivo (BRESSOLA, 2007; SALOMÃO *et al.*, 2014).

2.3.1 Ensaio YES com *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)

O ensaio YES (do inglês *Yeast Estrogen Screen*) é realizado utilizando cepas geneticamente modificadas provenientes da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com o objetivo de detectar a possível atividade estrogênica de uma amostra ambiental. Para isso, dependendo do nível de concentração dos EDs na amostra, pode ser necessário a utilização de uma etapa de preparo de amostra, com o objetivo de concentrar a amostra ambiental em análise (SILVA, 2015).

Após o período de exposição (72 h), é realizada as leituras espectrofotométricas das amostras, através da mudança de coloração do meio (de amarelo para tons de vermelho). Os resultados da leitura das amostras são comparados aos valores do controle positivo, E2, de forma a se encontrar o nível de concentração equivalente de E2 (EQ-E2) presentes em cada amostra ambiental analisada (SILVA, 2015).

O ensaio do YES sofre o efeito de alguns importantes fatores que podem interferir no resultado do ensaio, ocasionando assim um resultado falso positivo ou falso negativo. Um exemplo de fator que pode ocasionar interferência nos resultados, é a presença de compostos voláteis, que podem ser transferidos de um poço da placa de amostragem para outro. A complexidade da amostra é outro fator capaz de ocasionar interferência nos resultados. Dependendo da complexidade da amostra, está pode conter compostos que são tóxicos às leveduras e por isso podem inibir o seu crescimento durante o período de amostragem ou ainda matá-las. Dessa forma, é fundamental o estabelecimento de controles que permitam aferir tais fatores (SILVA, 2015).

2.3.2 Ensaio com *Ceriodaphnia dubia* (*C. dubia*)

Daphnídeos, representantes do gênero *Ceriodaphnia*, são exemplos de cladóceros planctônicos filtradores normalmente utilizados como organismos-teste nos estudos toxicológicos de efluentes complexos (CERDA; OLIVE, 1993), devido à sua sensibilidade às alterações das condições ambientais, permitindo indicar o estado de saúde dos corpos hídricos. Cladóceros desempenham um papel importante na cadeia trófica dos ambientes

aquáticos, pois por serem consumidores primários (alimentam-se de bactérias e algas), atuam como ponte entre algas e os consumidores secundários, como peixes, por exemplo (MARTINS, 2008), e se distribuem amplamente em ambientes dulciaquícolas (MENDES, 2002).

Ensaio ecotoxicológicos que se utilizam de *C. dubia* apresentam respostas mais rápida ao estresse submetido, necessitando de ensaios com duração de 7 dias, enquanto os ensaios com *D. magna* necessitam de 21 dias para observação dos efeitos adversos. Além da redução do tempo de ensaio, a sensibilidade aos contaminantes em que serão expostos, a *C. dubia* é igual ou até mesmo superior a sensibilidade da *D. magna* (WINNER, 1988).

O teste realizado com *C. dubia* consiste em acompanhar todos os dias, por um período de uma semana, o desenvolvimento de uma população de organismos. Para isso, um número conhecido de indivíduos com 24 h de idade é introduzido na amostra ambiental a ser analisada e a cada dia são verificadas as taxas de natalidade e sobrevivência (MASTERS *et al*, 1991). Os testes que se utilizaram a *C. dubia* chamaram atenção, devido aos organismos poderem ser utilizado para ensaios de toxicidade aguda e crônica e também devido à sua facilidade de cultura em laboratório e ao seu ciclo de vida reprodutivo relativamente curto, o que facilita a realização de testes com compostos química e biologicamente instáveis, além de permitir o monitoramento ambiental de efluentes. Quanto à ocorrência na natureza, esse gênero pode ser encontrado em corpos hídricos pequenos, como lagoas ou em zonas costeiras de lagos e rios, mas a maioria dos membros habita corpos hídricos levemente eutrofizados (VERSTEEG *et al*, 1997). A espécie *C. dubia* é uma representante exótica que foi introduzida no Brasil como organismo-teste para ensaios ecotoxicológicos (ABREU *et al*, 2010).

2.4 Avaliação de risco ambiental

A avaliação de risco ambiental ou risco ecológico (RQ) avalia a probabilidade da ocorrência de um efeito ecológico adverso como resultado da exposição a um ou mais contaminantes. O processo é usado para sistematicamente avaliar e organizar dados, informações, estimativas e incertezas com a finalidade de ajudar a compreender e prever as relações entre os contaminantes e seus efeitos ecológicos de forma que seja útil para a

tomada de decisão do ponto de vista ambiental. Efeitos ecológicos adversos são aqueles que alteram características importantes, estruturais ou funcionais, dos ecossistemas (REBELO; CALDAS, 2014).

Uma avaliação da adversidade ecológica causada pelos micropoluentes pode considerar a classe dos micropoluentes, o tipo, a intensidade, nível de concentração dentre outros fatores. O processo de avaliação risco ambiental pode ser descrito em quatro etapas: 1. Coleta de informações; 2. Formulação do problema; 3. Análise de risco e 4. Caracterização do risco (REBELO; CALDAS, 2014).

Com isso, a avaliação de riscos é uma ferramenta que caracteriza a magnitude dos riscos à saúde humana e/ou aos receptores ecológicos potencialmente expostos aos contaminantes presentes no ambiente (CUNHA; MENDES; MARQUES, 2019). Diferentes estratégias podem ser adotadas na avaliação de riscos, que consideram a eficiência da remediação, o tempo, os custos e os possíveis danos causados por substâncias químicas perigosas e tóxicas.

Uma forma de avaliar o risco potencial representado por diferentes micropoluentes no ambiente aquático é através da utilização do cálculo do quociente de risco ecológico (RQ) proposto pela da Agência Europeia de Medicamentos (EMA - do inglês *European Medicines Agency*) na diretriz sobre avaliação de riscos ambientais (EMEA, 2006).

2.5 Legislações nacional e internacional sobre PPCPs e EDs em água

Quanto à legislação que rege os VMPs para os contaminantes nos diferentes tipos de classificação das águas, dentro dos documentos normativos como parâmetros de qualidade da água, nenhum dos micropoluentes abordados por esse trabalho são encontrados. No Brasil há dois documentos que regulam os VMPs para substâncias específicas em corpos hídricos receptores.

O primeiro aborda o enquadramento e a classificação dos corpos de águas doces, salobras ou salinas (Resolução nº 396/2008 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA) e o outro (Portaria nº 2914 do Ministério da Saúde de 2011) aborda o controle e vigilância da qualidade da água para abastecimento da população, assim como os padrões de potabilidade, estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e

vigilância da qualidade da água para consumo humano e o seu padrão de potabilidade, inclui os VMP de alguns contaminantes em águas para abastecimento humano (BRASIL, 2008; BRASIL, 2011).

Na Portaria nº 2914, nenhum dos micropoluentes abordados nesse trabalho é encontrado. No entanto, há regulamentação para alguns contaminantes que possuem classes semelhantes aos pertencentes no trabalho. Por exemplo, com relação ao padrão de potabilidade para substâncias químicas que representam risco à saúde, a Portaria nº 2914/2011 apresenta o VMP para o di(2-etilhexil)ftalato (DEHP), um plastificante da classe dos ftalatos e também ED, assim como o DEP. O VMP para o DEHP na Portaria nº 2914/2011 é de 800 ng L^{-1} (BRASIL, 2011).

Internacionalmente, é possível encontrar iniciativas para o monitoramento de alguns contaminantes de várias classes, mesmo que ainda não estejam regulados por uma legislação. Como descrito no item 2.2.2.2, a União Europeia (EU) juntamente com a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceram um VMP para o DEP em amostras de água potável. Devido ao risco à saúde humana, o VMP estabelecido foi $8,00 \times 10^3 \text{ ng L}^{-1}$.

Nos Estados Unidos, a USEPA, possui um programa de monitoramento de contaminantes não regulamentados (UCMR - do inglês *Unregulated Contaminant Monitoring Rule*), porém passíveis de breve regulamentação. A seleção dos contaminantes para um determinado ciclo de monitoramento, está baseado em outro “programa de monitoramento” da mesma agência. A USEPA também dispõe de uma lista de contaminantes candidatos a regulação (CCL - do inglês *Contaminant Candidate List*) junto a Lei de Água Potável Segura (SDWA - do inglês *Safe Drinking Water Act*). Nessa CCL, a USEPA identifica contaminantes para regular a água potável para proteger a saúde pública. A agência estabelece limites regulatórios para as quantidades de certos contaminantes na água fornecidos pelos sistemas públicos de água. Esses padrões de contaminantes são exigidos pela SDWA.

A USEPA, utiliza a UCMR para coletar dados de contaminantes suspeitos de estarem presentes na água potável, mas que não estão dispostos na SDWA. Dessa forma, o monitoramento fornece à USEPA e outras partes interessadas dados com representação nacional sobre a ocorrência de contaminantes na água potável, o número de pessoas potencialmente expostas e uma estimativa dos níveis dessa exposição. Esses dados podem apoiar futuras determinações regulatórias e outras ações para proteger a saúde pública.

Nesses programas de monitoramento, seja no UCMR ou via CCL, pode-se observar a disposição de alguns contaminantes que pertencem as mesmas classes dos

micropoluentes abordados nesse trabalho. Para fins de exemplificação, a UCMR 3 (USEPA 815-S-001), tem por finalidade o monitoramento de 28 contaminantes químicos, onde podemos encontrar o 17α -etinilestradiol entre os contaminantes dispostos no documento, pertencente a classe dos EDs (USEPA, 2012). Já a UCMR 4 (USEPA-815-F-16-007), possui dentre os 97 contaminantes monitorados, alguns contaminantes de mesma classe de alguns micropoluentes abordados no trabalho, tais como 4NP e 17α -etinilestradiol (USEPA, 2017).

Em outro documento da mesma agência, o USEPA-822-R-05-005, que dispõe sobre os critérios de qualidade da água para a vida aquática, com relação ao contaminante 4NP. Nesse documento não normativo, pode-se encontrar recomendações sobre a concentração máxima de 4NP em amostras de água doce e água salgada. Segundo o documento, a recomendação para a concentração máxima de 4NP em amostras de água doce é de $2,80 \times 10^4$ ng L⁻¹ e em amostras de água salgada, a recomendação é de $7,00 \times 10^3$ ng L⁻¹ (USEPA, 2005).

Além desses dois programas de monitoramento de contaminantes, a USEPA ainda possui uma legislação federal, dita Lei de Água Potável Segura (SDWA). A SDWA, é a lei que dispõe sobre os padrões de qualidade da água potável para abastecimento público. Nessa legislação vigente nos Estados Unidos, o documento USEPA 816-F-09-004, dispõe sobre o DEHP, um ED que pode causar dificuldades reprodutivas, problemas hepáticos e aumento do risco de câncer. De acordo com o documento, o nível máximo permitido em água potável é de 600 ng L⁻¹ (USEPA, 2009).

2.6 Validação da Metodologia Analítica

Os princípios para o desenvolvimento de uma metodologia analítica são simples e podem ser resumidos em três etapas. A primeira etapa consiste na definição da importância e utilidade de tal método. A segunda é o desenvolvimento do método e a obtenção de resultados consistentes e a terceira etapa envolve o estabelecimento de procedimentos de controle de qualidade adequados para garantir o êxito na primeira e segunda etapa. O objetivo da validação é garantir que os dados sejam cientificamente válidos, de precisão conhecida e adequado para o seu propósito, com resultados confiáveis (USEPA, 2018).

A validação do método é geralmente considerada quando se desenvolve um método de análise não padronizada. Muitas características de desempenho do método estão associadas com o processo de validação da metodologia, tais como seletividade, robustez, LD, LQ, linearidade dentre outros parâmetros (EURACHEM, 2014).

Na avaliação da seletividade, verifica-se o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, que possam estar, porventura, presentes na resposta instrumental do analito. A seletividade garante que a resposta instrumental seja exclusivamente do analito isenta de interferentes. Caso não seja garantida a seletividade (resposta exclusiva do analito), outros parâmetros como linearidade, exatidão e precisão estarão seriamente comprometidas (LEITE, 2008; RIBANI *et al.*, 2004). Uma maneira de avaliar a seletividade do método desenvolvido é via comparação da matriz isenta do(s) analito(s) e a matriz fortificada com o(s) analitos(s), sendo que, nesse caso, nenhum interferente presente na matriz deve apresentar o mesmo tempo de retenção do(s) analito(s) (RIBANI *et al.*, 2004).

Já a robustez do método está relacionada com a medida da sensibilidade que o método desenvolvido apresenta face a pequenas variações. Um método robusto indica que tal método não foi afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros (LEITE, 2008; RIBANI *et al.*, 2004). De acordo com Leite (2008) e Ribani e colaboradores (2004), para um método cromatográfico, pode-se avaliar a robustez desse método através da variação do fluxo da fase móvel, composição da fase móvel, pH e força iônica da fase móvel em HPLC dentre outros parâmetros. Tais pequenas alterações introduzidas no método refletem possíveis alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos.

A linearidade está relacionada com a capacidade do método de fornecer resultados que se apresentam de maneiras proporcionais à concentração do analito, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A relação entre o sinal instrumental medido (área ou altura do pico) e a concentração (ou massa) do(s) analito(s) não é conhecida na maioria dos casos. Dessa forma, a relação matemática entre o sinal instrumental medido e a concentração (ou massa) do(s) analito(s) deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para concentrações (ou massas) do(s) analito(s). Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica (LEITE, 2008; RIBANI *et al.*, 2004).

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático

conhecido como regressão linear. A curva analítica apresenta em sua constituição, dois coeficientes: coeficientes angular (a) e coeficiente linear (b). O coeficiente angular expressa a inclinação da curva analítica aos eixos. Por outro lado, o coeficiente linear expressa a intersecção da curva analítica aos eixos. Além dos coeficientes de regressão a e b, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação (r). O coeficiente de correlação expressa a relação entre x e y, que permite avaliar a curva analítica. Quanto mais próximo da unidade for o valor de r, seja -1 ou +1, maior será a correlação entre os valores de x e y. Um coeficiente de correlação +1, indica uma correlação positiva entre as duas variáveis, enquanto uma correlação -1, indica uma correlação negativa entre as variáveis. Assim como o coeficiente de correlação (r), há também o coeficiente de determinação (R^2), que serve como uma boa ferramenta, para aferir a qualidade da curva analítica, visto que tal coeficiente demonstra a dispersão dos valores com relação aos valores esperados, os resíduos (LEITE, 2008; RIBANI et al., 2004).

A quantificação do(s) analito(s), através da curva analítica, pode ser realizada através de dois modos principais: via padronização externa e/ou via padronização interna. A padronização interna consiste na preparação das soluções padrão de níveis de concentrações conhecidas do(s) analito(s), às quais se adiciona um volume de uma solução padrão de um outro composto, chamado padrão interno (PI). O PI, deve ser similar à substância a ser quantificada e apresentar tempo de retenção próximo a esta substância, não reagir com a substância ou outro componente da matriz, não fazer parte da amostra. Independente dos níveis de concentração do(s) analito(s), a concentração do PI se mantém constante para todos os níveis de concentração da curva analítica. A curva analítica para a padronização interna é obtida através da razão de áreas (área do(s) analito(s)/ área PI) e o nível de concentração do(s) analito(s). A amostra, a ser quantificada, também é analisada após a adição do mesmo volume de PI, proporcionando assim a amostra a ser quantificada, as mesmas condições dos padrões utilizados para a construção da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

O parâmetro que avalia o quão próximo estão as várias medidas efetuadas em uma mesma amostra é a precisão do processo analítico. Precisão retrata a concordância (ou dispersão) entre os vários resultados de cada teste, aplicado repetidamente, todos provenientes da mesma amostra. O grau de concordância dos resultados é frequentemente expresso em função do desvio padrão relativo (%DPR). Dependendo do nível de complexidade da matriz, tem-se uma maior permissão para o valor de %DPR. Em métodos

de análise de traços, por exemplo, é comum a aceitação de DPR até 20%. A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade; precisão intermediária; reprodutibilidade (LEITE, 2008; RIBANI et al., 2004).

A repetitividade representa a concordância (ou dispersão) entre os resultados das sucessivas medições, quando feitas sob as mesmas condições, ditas condições de repetitividade, sendo elas: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições e sob a mesma calibração, mesmo local e repetições em um curto intervalo de tempo. Já a precisão intermediária, está relacionada com os efeitos de alterações dentro do laboratório no grau de concordância dos resultados. Algumas alterações realizadas para a avaliação da precisão intermediária são: trocar o analista, trocar o equipamento, realizar os testes em outro dia ou então a combinação desses fatores. A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas (mudança de analista, laboratório, equipamentos, etc.) e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos (LEITE, 2008; RIBANI et al., 2004).

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro, frequentemente expresso em percentual. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza. A avaliação da exatidão do método pode ser realizado baseados em diferentes metodologias, entre elas o uso de ensaios de recuperação, o qual constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos. A recuperação pode ser definida como a quantidade do(s) analito(s) adicionada na porção da amostra em teste, que é possível de ser extraída e quantificada. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade do analito, recuperando durante todo o processo, em relação a quantidade real presente na amostra (CALDAS, 2009; LEITE, 2008; RIBANI et al., 2004).

O estudo da recuperação consiste na fortificação da amostra, isto é, adição de soluções com diferentes concentrações do(s) analito(s) seguida pela determinação da concentração do(s) analito(s) adicionado(s) (BRITO *et al.*, 2003). Para a determinação da exatidão, há necessidade de outros parâmetros da validação já estejam estabelecidos, tais como, linearidade, robustez e seletividade por exemplo. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (ANVISA, 2017).

Quando se trabalha com análise de constituintes a nível traço, o conhecimento do menor nível de concentração de cada analito que se pode detectar pelo método com confiabilidade é um fator muito importante. O LD representa a concentração mínima de uma substância que pode ser detectada com confiança de 99% quando a concentração do analito é maior do que zero. O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método relação sinal-ruído, método do desvio padrão e por processos estatísticos (LEITE, 2008, RIBANI et al., 2004; USEPA, 2016a). Já o LQ representa a menor concentração de uma substância que pode ser quantificada com exatidão e precisão satisfatória, conforme preconizado pelo guia utilizado para a validação do método desenvolvido, ou seja, o valor de nível de concentração reportado pelo LQ apresenta uma relação o nível de concentração, a precisão e a exatidão (LEITE, 2008; RIBANI et al., 2004).

Nacionalmente, podemos destacar dois guias para validação de metodologias analíticas. São eles:

(i) o documento DOQ-CGCRE-008, elaborado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), em sua 5ª revisão, datada de agosto de 2016. Tal documento intitulado “Orientação sobre validação de métodos analíticos”, possui o objetivo de auxiliar os laboratórios de ensaio na tarefa de demonstrar que um método analítico, tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida. O documento reporta no item 8.2, os parâmetros a serem avaliados para a validação da metodologia. Os itens listados são: Seletividade, Linearidade, LD, LQ, Recuperação, Precisão e a robustez sendo facultativa. Porém, como o documento DOQ-CGCRE-008 do INMETRO é orientativo e não normativo, não se encontra os valores para cada um dos parâmetros descritos anteriormente (INMETRO, 2016).

(ii) Outro guia, que pode ser destacado é a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166, de 24 de julho de 2017, vinculada ao Ministério da Saúde e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Tal RDC dispõe sobre a validação de métodos analíticos e tem como objetivo, de estabelecimento de critérios para a validação de métodos analíticos. A RDC, em seu anexo I, reporta os parâmetros a serem avaliados para a validação da metodologia. Os itens listados são: Exatidão, Precisão, Seletividade, LQ, Linearidade e LD em alguns casos. Para alguns dos parâmetros listados anteriormente, a RDC Nº 166 traz valores de aceitação, como por exemplo, valor mínimo do coeficiente de correlação ($R^2 > 0,99$), porém não traz valores de aceitação para outros parâmetro (ANVISA, 2017).

Em função de um amplo programa de monitoramento de contaminantes realizados pela USEPA, pode-se encontrar em função de cada tipo de programa de monitoramento,

seja CCL ou UCMR, a indicação de qual metodologias analíticas já padronizada pela agência fora usada para o monitoramento. Nesse sentido, pode-se destacar uma metodologia que possui uma semelhança com o trabalho realizado. O documento USEPA-542-815-R-15-012, dispõe sobre o método para a determinação de PPCPs em amostras de águas potáveis por SPE e cromatografia líquida, com ionização por electrospray acoplado a espectrometria de massas sequencial (LC-ESI-MS/MS - do inglês *Liquid Chromatography coupled to Electrospray Ionization Mass Spectrometry tandem*) (USEPA, 2016b).

Houve a necessidade da validação da metodologia, uma vez que o documento USEPA-542-815-R-15-012 dispõe sobre a determinação de PPCPs em amostras de água potável. Em contrapartida, o referido projeto, aqui apresentado, apresenta água superficial como matriz, sendo esta, diferente da matriz descrita no documento acima citado (água potável). Além desse fato, o este projeto aborda micropoluentes de outras classes que não os presentes no documento do USEPA supracitado.

Dessa forma, para a validação do método analítico desenvolvido, não se utilizou nenhum dos dois guias nacionais citados anteriormente, devido à ausência de normas para todos os parâmetros de validação avaliados. Para fins de validação da metodologia analítica desenvolvida, adotou-se os critérios de qualidade globais descritos na validação de ensaios de compostos orgânicos descritos no método USEPA 8000D – *Determinative Chromatographic Separations* (USEPA, 2018).

A Tabela 6 ilustra de maneira resumida os parâmetros de validação utilizados no trabalho.

Tabela 6 - Parâmetros aferidos na validação

Parâmetro	Definição	Cálculo
Robustez	Capacidade de o método desenvolvido permanecer inalterado frente a pequenas alterações em alguns parâmetros.	Verificação de diferença significativa, via teste F, entre as curvas analíticas preparadas sob as condições otimizadas e condições alteradas.
Precisão (repetitividade)	Grau de repetibilidade dos resultados de medições repetidas mantendo-se as mesmas condições. O %DPR deve ser menor do que 20%.	$\%DPR = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$ %DPR – Desvio padrão relativo σ – Desvio padrão das concentrações medidas. \bar{x} - Concentração média.

Tabela 6 (cont) - Parâmetros aferidos na validação

Efeito de matriz	A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição, ocasionando supressão ou magnificação do sinal, comprometendo o resultado.	Verificação de diferença significativa, via teste F, entre as curvas analíticas preparadas, ambas preparadas via fortificação, porém com solventes diferentes: água superficial e água ultrapura.
Exatidão (recuperação)	Concordância entre os resultados de medições sucessivas e o valor de referência (100%). A exatidão deve estar entre 70% e 130%.	$\% \text{ Exatidão} = \frac{\bar{x}}{\text{Conc Fort}} \times 100$ $\bar{x} - \text{Concentração média.}$ Conc Fort- Concentração fortificada.
LD	Concentração mínima de uma substância que pode ser detectada com confiança de 99% quando a concentração do analito é maior do que zero.	$LD = t_{(n-1, \alpha = 0,99)} \cdot \sigma$ $t - t \text{ Student para } n-1 \text{ graus de liberdade e } 99\% \text{ de nível de confiança}$ $\sigma - \text{desvio padrão das amostras de todas as réplicas.}$
LQ	Menor concentração de um analito que se pode quantificar com exatidão e precisão dentro dos valores aceitáveis. É a concentração mais baixa na curva analítica.	Não se aplica.
Seletividade	Capacidade do método quantificar o(s) analito(s) na presença de outros analitos e interferentes presentes na matriz.	Comparação dos cromatogramas da matriz fortificada e não fortificada, evidenciando a ausência de sinal na matriz no mesmo Tret dos analitos
Linearidade	Gráfico de concentrações de padrões conhecidos contra a resposta do instrumento para os analitos de interesse. Para uma curva ser aceita será avaliado o coeficiente de determinação ($R^2 > 0,99$), coeficiente de correlação ($r > 0,995$), erro padrão relativo $< 20\%$.	Não se aplica.

Fonte: adaptado USEPA, (2018).

2.7 Bacia Hidrográfica do Rio Guandu

A bacia hidrográfica do rio Guandu é de fundamental importância para a vida da região metropolitana do Rio de Janeiro, pois engloba quinze municípios de forma integral e parcial, como apresentado na Figura 7. Serve de fonte de água para o abastecimento humano (captação para a ETA Guandu, da Companhia Estadual de Águas e Esgotos (CEDAE) abastecendo quase 9 milhões de habitantes e também para diversos setores produtivos, como a indústria siderúrgica, petroquímica, indústrias de alimentos e bebidas, vestuário, dentre outras formas industriais além de corpo hídrico coletor de esgotos industriais e domésticos (CETESB, 2011).

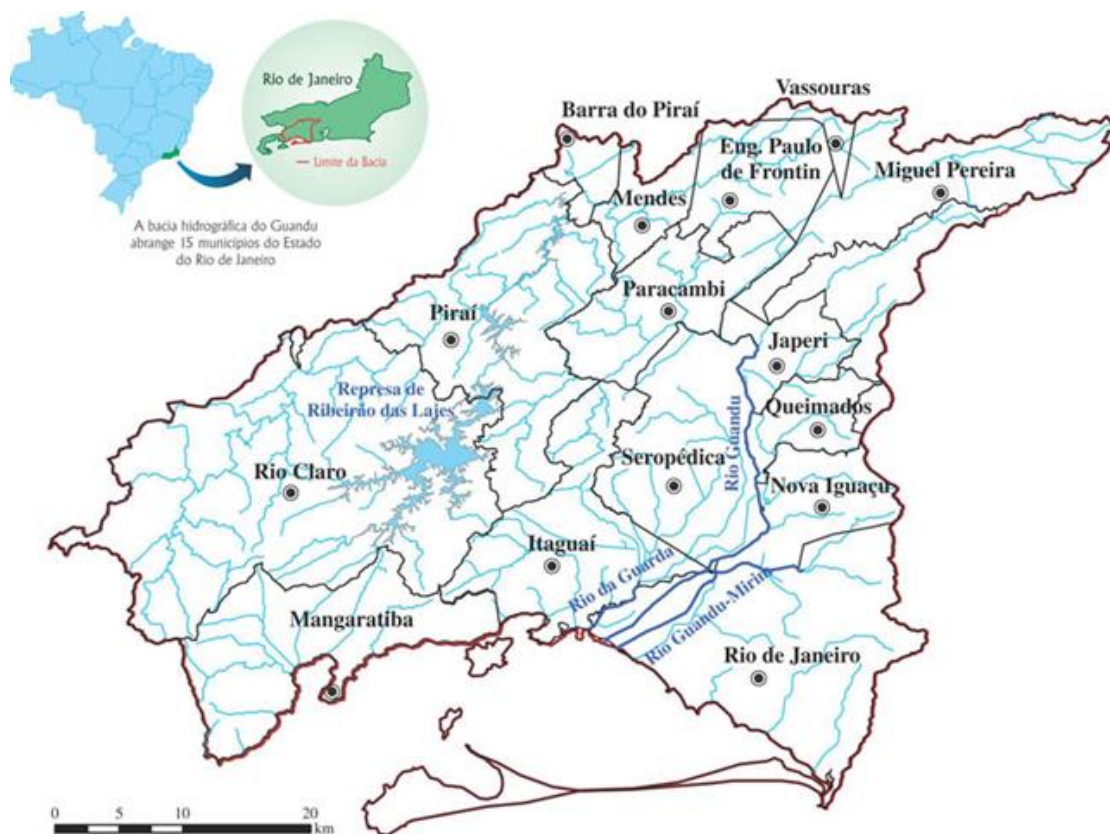
Devido ao fato da região metropolitana possuir uma ampla densidade de moradores, e somado ao fato da existência de vários parques industriais, os problemas ambientais na bacia do rio Guandu passam por lançamento *in natura* de esgotos sanitários, poluição e a contaminação dos mananciais por efluentes industriais e agropecuários, além da extração mineral de areia. A poluição e contaminação das águas, como os principais problemas avaliados, decorrem da precariedade de infraestrutura de saneamento básico (CASTRO; FERREIRINHA, 2013).

Por ser de importância vital para o abastecimento da metrópole fluminense (capital e região da baixada fluminense) e para a manutenção das inúmeras atividades produtivas dependentes das águas desta bacia, se faz imprescindível a adoção de práticas de gestão que assegurem a qualidade das águas e a integração das ações dos dois comitês de bacias existentes (o Comitê da Bacia do Rio Paraíba do Sul e o Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio Guandu), dada a interdependência e complexidade das bacias graças à intervenção socioeconômica e política com base em redes técnicas de infraestrutura. Somado a esse fato, mensalmente, o Instituto Estadual do Ambiente (INEA) coleta amostras de águas superficiais nessa bacia, e faz uma classificação de qualidade. Esta classificação apresenta variação entre excelente, boa, média, ruim e muito ruim, de acordo com os resultados encontrados em outras análises como: demanda biológica de oxigênio (DBO), fósforo total, nitrato, oxigênio dissolvido, pH, turbidez, coliformes termotolerantes, sólidos dissolvidos, temperatura da água e temperatura do ar.

Recentemente, durante o verão de 2019-2020, a qualidade da água do sistema Guandu foi tema de grande repercussão, tendo em vista a contaminação da água nas

torneiras com geosmina, uma cianotoxina resultante do processo de eutrofização do reservatório, evento que deu grande visibilidade ao problema da baixa qualidade do manancial à montante (JANNUZZI, 2020; BARBON, PAMPLONA, 2020).

Figura 7 - Região integrante da bacia do Rio Guandu



Fonte: Comitê Guandu. Disponível em: <[http:// www.comiteguandu.org.br](http://www.comiteguandu.org.br)>. Acesso em: 20 jan. 2018.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental consistiu na validação de um método para determinação de produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (PPCPs) e desreguladores endócrinos (EDs) em águas superficiais, empregando SPE para extração, limpeza e pré-concentração das amostras, e determinação UPLC-MS/MS. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biorremediação, Fitotecnologia e Inovação no Tratamento de Água e Efluentes (LABIFI), do Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente, Faculdade de Engenharia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

3.1 Reagentes, solventes e materiais

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram empregados:

- Metanol (MeOH) grau LC-MS (J.T. Baker[®]);
- Metanol (MeOH) grau HPLC (J.T. Baker[®]);
- Acetonitrila (ACN) grau LC-MS (Bio-Grade);
- Hidróxido de Amônio (NH₄OH) 28,0-30,0% (J.T. Baker[®]);
- Ácido Fórmico (HFor) 88% (J.T. Baker[®]);
- Ácido Clorídrico (HCl) 37% (Sigma Aldrich);
- Água mineral Bioleve;
- Argônio 99,99% (Air Products);
- Água ultrapura (H₂O Milli-Q);
- Cartucho extração em fase sólida (SPE) OASIS HLB (500 mg/ 6 mL);
- Cartucho SPE Bond Elut C18 (500 mg/ 3 mL);
- Cartucho SPE Silicycle C18 (500 mg/ 6 mL);
- Filtro de amostras Nylon (13 mm de diâmetro 0,22 µm de diâmetro do poro);
- Filtro de amostras PVDF Millipore[®] (13 mm de diâmetro 0,22 µm de diâmetro do poro);
- Membrana filtrante PVDF Millipore[®] (47 mm de diâmetro e 0,22 µm de diâmetro do poro).

Os Padrões analíticos utilizados no trabalho são listados na Tabela 7.

Tabela 7 - Padrões analíticos utilizados no trabalho

Sigla	Procedência	CAS NUMBER	Lote	Pureza
17 β - Estradiol (E2)	Sigma Aldrich	50-28-2	071M0087V	> 98%
4-Nonilfenol (4NP)	Sigma Aldrich	104-40-5	LC04112V	99,9%
Benzofenona (BEN)	Sigma Aldrich	119-61-9	Id: 000F90 Batch: 2.0	> 99%
Bisfenol A(BPA)	Sigma Aldrich	80-05-7	BCBN9199V	> 99%
Bromazepam (BZP)	Farmacopéia Brasileira	1812-30-2	1042	> 99%
CPRG	Sigma Aldrich	99792-79-7	10015454	96%
Clonazepam (CZP)	Farmacopéia Brasileira	1622-61-3	B3F01	> 99%
Diazepam (DZP)	Farmacopéia Brasileira	439-14-5	1044	> 99%
DZP d5 (Sol 100 mg L ⁻¹)	Sigma Aldrich	65854-76-4	FE11201502	> 99,9%
Dietilftalato (DEP)	Sigma Aldrich	84-66-2	MKBS8036V	> 99%
Ibuprofeno (IBP)	Sigma Aldrich	15687-27-1	Id: 00WN69; Batch: 5.0	> 99%
Trimetoprim (TMP)	Sigma Aldrich	738-70-5	SZBD010XV	99,7%

Fonte: Autor

3.2 Instrumentação

- Vacuum Supelco VisiprepTM;
- Bomba de vácuo Primatec;
- Micropipetadores automáticos Eppendorf com capacidade variável (10 – 1000 μ L);
- Multiparâmetro Thermo Fischer Orin 5 Star;
- Sistema de purificação de água Milli-Q Direct 8 (Millipore[®])
- Sonda Multiparâmetro Horiba U-52;
- Vortex Vixar;

- Incubadora Nova Ética BOD 411D;
- Espectrofotômetro Spectra Max® M3;
- Banho de ultrassom Ultracleaner 1400A;
- Software TOXSTAT 3.5;
- Balança analítica Ohaus AR2140;
- Gerador de nitrogênio NM32LA (Peak, USA);
- Cromatógrafo em fase líquida de ultra eficiência (UPLC) Waters®, modelo ACQUITY H-Class, equipado com amostrador automático, bomba quaternária, sistema de degaseificação, acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (MS/MS) Waters®, modelo XEVO TQD, com fonte electrospray (ESI), sistema de aquisição de dados Masslynx versão 4.1 e coluna cromatográfica BEH C18 (50,0 x 2,1 mm ID, 1,7 µm).

3.3 Métodos

3.3.1 Amostragem

Para a realização desta pesquisa, foram coletadas amostras em quatro municípios localizados na região da baixada fluminense, trecho da bacia hidrográfica do Rio Guandu. Os municípios onde as coletas foram realizadas foram: Seropédica (SER), Rio de Janeiro (RIO), Paracambi (PBI) e Nova Iguaçu (NIG). Os pontos amostrais e as coordenadas geográficas de cada ponto, podem ser vistos na Tabela 8 e Figura 8. As campanhas para coleta de amostras foram realizadas mensalmente entre os meses de abril de 2018 até março de 2019, com exceção do mês de novembro de 2018, que não foi possível realizar a coleta de amostras para a realização de nenhum ensaio, contemplando assim um ciclo hidrológico completo.

Tabela 8 - Coordenadas geográficas dos pontos amostrais

Amostragem	Coordenada Geográfica	
	S	O
NIG	22°80'64.17"	43°62'60.79"
PBI	22°66'31.23"	43°74'24.14"
RIO	22°89'70.44"	43°73'49.05"
SER	22°81'75.40"	43°62'42.48"

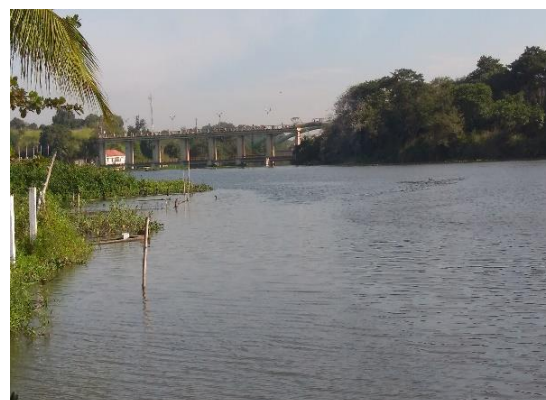
Legenda: Coordenadas geográficas dos pontos de coleta na bacia do rio Guandu – RJ.

Fonte: Autor

Figura 8 - Locais de amostragem da bacia do rio Guandu



(A)



(B)



(C)



(D)

Legenda: (A) RIO; (B) NIG; (C) SER; (D) PBI.

Fonte: Autor

A coleta de amostras para os ensaios de determinação dos nove micropoluentes bem como ensaios ecotoxicológicos, foram baseados no Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras: Águas, sedimentos, comunidades aquáticas e efluentes líquidas, guia elaborado pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) juntamente com a Agência Nacional de Águas (ANA). Como o guia não apresenta um modo de coleta específico para PPCPs nem para EDs, utilizou-se o modo de coleta indicado para a análise de Fenóis por Cromatografia. Dessa forma, utilizou-se frascos âmbar, lavados previamente com a lavagem especial para Ensaios de Compostos Orgânicos Voláteis, com capacidade volumétrica de 4,0 L. Em cada ponto, houve a coleta de 4,0 L de água superficial, para permitir a análise das amostras bem como a possibilidade da realização de uma contraprova caso seja necessário e também para a realização de ensaios ecotoxicológicos. Tais amostras de água superficial foram acondicionamento em caixas térmicas com gelo e mantidas sob refrigeração até o momento da análise (CETESB, 2011). Neste trabalho, o armazenamento em geladeira não foi superior a 24 horas.

Com o auxílio da sonda multiparâmetro HORIBA U52, os dados de data, hora, local de coleta, pH, oxigênio dissolvido (OD), condutividade, sólidos totais dissolvidos, temperatura da água, turbidez, potencial de redox (ORP - do inglês *Oxidation Reduction Potential*) foram coletados e foram registrados no momento da coleta armazenados na memória da sonda HORIBA U52.

3.3.2 Desenvolvimento de método analítico por UPLC-MS/MS

O desenvolvimento do método analítico adotado neste trabalho, foi baseado em condições propostas por Primel, Caldas e Escarrone. No referido trabalho, os pesquisadores fizeram uma revisão bibliográfica de métodos, tanto cromatográficos como para métodos de preparo de amostras, para determinação de PPCPs nas mais diversas matrizes, incluindo água superficial. Foram feitos alguns ajustes para determinar alguns PPCPs diferentes e os EDs. Esses ajustes envolveram tanto a etapa de preparo de amostras quanto a parte cromatográfica, tais como: a escolha do melhor cartucho de SPE, melhor solvente de eluição, a escolha dos solventes da fase móvel, composição da fase móvel, para uma maximização de parâmetros cromatográficos adequados, entre eles relação sinal ruído

(S/R), intensidade (altura), resolução (R) dentre outros (PRIMEL; CALDAS; ESCARRONE, 2012).

3.3.2.1. Preparo das soluções analíticas

As soluções-estoque de cada analito, foram preparadas através da dissolução dos padrões sólidos em MeOH grau HPLC, para a concentração de $1,00 \times 10^3 \mu\text{g mL}^{-1}$ para cada analito, considerando o grau de pureza de cada padrão. As soluções-estoque de cada analito foram estocadas em freezer.

A partir das soluções estoque de cada analito (aprox. $1,00 \times 10^3 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram preparadas solução trabalho para cada analito, na concentração de $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando MeOH grau HPLC como diluente. As soluções trabalho de cada analito foram estocadas em geladeira.

Uma solução trabalho mix, contendo a mistura de todos os analitos para um nível de concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ foi preparada em MeOH grau HPLC, a partir de cada solução trabalho individual. As soluções trabalho individual foram preparadas mensalmente enquanto as soluções trabalho contendo todos os analitos foram preparadas semanalmente. As soluções trabalho (individual e mix) foram estocadas em geladeira.

O padrão interno (PI) de DZP-d5 foi adquirido comercialmente em solução concentrada de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. A solução estoque de DZP-d5, no nível de concentração de $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$, foi preparada por diluição da solução concentrada, utilizando MeOH como solvente.

3.3.2.2 Otimização do preparo de amostra via extração em fase sólida

Para a otimização da etapa de preparo de amostras, preparou-se amostras compostas que foram denominadas amostras aquosas sintéticas. As amostras aquosas sintéticas foram preparadas através da mistura de volumes iguais de cada um dos quatro pontos amostrais, produzindo assim uma amostra composta de todos os pontos amostrais. As amostras

aquosas sintéticas foram utilizadas como uma maneira de preparar uma amostra composta que representasse de maneira mais fidedigna a bacia do rio Guandu como um todo.

O desenvolvimento da metodologia de preparo de amostra, via extração SPE foi dividido em quatro etapas: escolha da melhor fase sólida; carga máxima de adsorção do cartucho; melhor solvente de eluição e otimização do volume do solvente de eluição.

Para a avaliação da melhor fase sólida para a extração dos analitos, foram avaliados três diferentes cartuchos. Um cartucho testado foi o OASIS HLB[®] contendo 500 mg do fase sólida (interação com analitos de caráter hidrofílico e lipofílico) com capacidade de volume de 3 mL. Os outros dois cartuchos testados foram Bond Elut C18[®] contendo 500 mg do fase sólida (interação com analitos de caráter lipofílico) com capacidade de volume 3 mL e Silicycle C18 contendo 500 mg de fase sólida (interação com analitos de caráter lipofílico) com capacidade de volume de 6 mL.

Os experimentos foram realizados condicionando os cartuchos com 5,00 mL de MeOH grau HPLC seguidos de 5,00 mL de água ultrapura (H₂O ultrapura). Em seguida, uma amostra aquosa sintética, fortificada em um nível de concentração 500 ng L⁻¹ para os analitos e 250 ng L⁻¹ para o DZP-d5, com volume final de 200 mL foi percolada através dos cartuchos testados a uma vazão de 5,00 mL min⁻¹.

A escolha do melhor cartucho foi feita com base no poder de retenção de cada fase sólida frente aos analitos. Os extratos proveniente da percolação das amostras aquosas sintéticas foram armazenados e posteriormente injetados no UPLC-MS/MS. Os testes realizados com os três cartuchos diferentes são apresentados na Tabela 9. Todos os testes foram feitos em triplicata. O cálculo do poder de retenção da fase sólida foi feito via comparação com uma solução aquosa sintética “padrão”, com os mesmos níveis de concentração para os analitos e também para o PI, porém esta não foi submetida a etapa de preparo de amostras.

Tabela 9 - Testes para escolha da melhor fase sólida

Teste	Cartucho	Volume de amostra (mL)	Concentração (ng L ⁻¹)	
			Analitos	DZP-d5
a	Bond Elut C18 (3 mL/500 mg)	200	500	250
b	C18 Silicycle (6 mL/500 mg)	200	500	250
c	OASIS HLB (3 mL/500 mg)	200	500	250

Fonte: Autor

Na segunda etapa, foi feita a avaliação da carga máxima de adsorção dos cartuchos testados. Para a determinação da carga máxima de adsorção, foram preparadas amostras aquosas sintéticas com o mesmo nível de concentração tanto para os analitos quanto para o PI ($25,0 \mu\text{g L}^{-1}$) porém com volumes finais diferentes, como apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 - Testes de massa máxima percolada pelos cartuchos

Teste	Cartucho	Volume de amostra (mL)	Massa percolada (μg)	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
				Analito	DZP-d5
a*		250	6,25		
b*	Bond Elut C18 (3 mL/500 mg)	400	10,0	25,0	25,0
c*		500	12,5		
d*		$1,00 \times 10^3$	25,0		
e*		250	6,25		
f*	C18 Silicycle (6 mL/500 mg)	400	10,0	25,0	25,0
g*		500	12,5		
h*		$1,00 \times 10^3$	25,0		
i*		250	6,25		
j*	OASIS HLB (3 mL/500 mg)	400	10,0	25,0	25,0
k*		500	12,5		
l*		$1,00 \times 10^3$	25,0		

Legenda: * Todos os testes utilizaram a seguinte sequência de condicionamento: 5,0 mL MeOH seguido por 5,0 mL H₂O ultrapura.

Fonte: Autor

Dessa forma, foram percolados pelos cartuchos diferentes massas dos analitos. A determinação da carga máxima de adsorção dos cartuchos foi realizada armazenando os extratos das amostras aquosas sintéticas que haviam sido percoladas pelos cartuchos e em seguida, injeção no UPLC-MS/MS. Posteriormente, foi realizada a comparação com uma solução aquosa sintética “padrão” de mesmos níveis de concentração. Todos os testes foram feitos em triplicata.

Na última etapa, foi estudado qual o melhor solvente de eluição bem como, o melhor volume do solvente de eluição a fim de promover a máxima recuperação dos analitos. Tais

escolhas foram feitas baseada na literatura e nas propriedades dos analitos (CUNHA; ARAUJO; MARQUES, 2018; ARAUJO; BAUERFELDT; CID, 2017; ARAUJO; BAUERFELDT; CID, 2018). Para a escolha do melhor volume de eluição, foram preparadas amostras aquosas sintéticas com o mesmo nível de concentração (200 ng L^{-1}) para os analitos. Para o PI, o nível de concentração foi de 200 e 250 ng L^{-1} , devido ao fator de concentração em função dos diferentes volumes de eluição. Os testes realizados, evidenciando cada nível de concentração utilizado em função de cada teste são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Testes realizados para a escolha do solvente de eluição e o volume de eluição

Teste	Cartucho	Volume de amostra (mL)	Concentração (ng L^{-1})		Solvente eluição	Volume solvente eluição (mL)
			Analito	DZP-d5**		
a*						1 x 4,00
b*	Bond Elut C18 (3 mL/500 mg)	500	200	200	MeOH	2 x 2,00
c*				250		1 x 5,00
d*						2 x 2,50
e*						1 x 4,00
f*	OASIS HLB (3 mL/500 mg)	500	200	200	MeOH	2 x 2,00
g*				250		1 x 5,00
h*						2 x 2,50

Legenda: * Todos os testes utilizaram a seguinte sequência de condicionamento: 5,00 mL MeOH seguido por 5,00 mL H₂O ultrapura; ** A concentração inicial depende do fator de concentração a fim de promover uma concentração final de DZP-d5 de $25,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

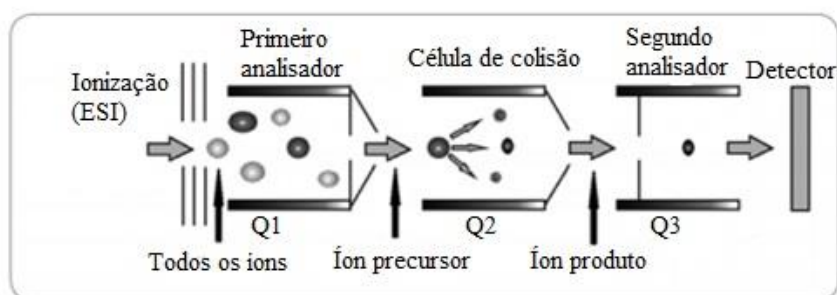
Fonte: Autor

A avaliação do melhor volume do solvente de eluição foi feito, realizando-se a SPE, passando pela etapa de condicionamento e percolação da amostra. Na etapa da eluição, o volume do solvente de eluição foi variado bem como a forma de eluição (eluição única ou em etapas). Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.3.3 Avaliação do sistema cromatográfico, para determinação de PPCPs e EDs

As determinações foram realizadas empregado UPLC-MS/MS que se tornou importante ferramenta analítica para a determinação de micropoluentes, pois o acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas sequencial possibilitou o desenvolvimento de métodos que possuem maior seletividade e sensibilidade. Além disso, foi utilizado o espectrômetro de massas no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM - do inglês, *multiple monitoring reaction*), pois problemas de co-eluição são minimizados. Para um detector de massas sequencial (triplo quadrupolo), o primeiro quadrupolo (ou analisador) é responsável pela seleção do íon precursor. Em seguida, a célula de colisão (ou câmara de colisão), é responsável pela fragmentação do íon precursor que foi selecionado pelo primeiro quadrupolo, graças a colisão com um gás inerte, sob uma energia específica, produzindo assim, íons “filhos”. Finalmente, o último quadrupolo é responsável pela passagem dos íons “filhos”, vindos do íon precursor e são direcionados para o sistema de detecção (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; LANÇAS, 2009). O funcionamento do espectrômetro de massas sequencial é apresentado na Figura 9.

Figura 9 - Esquema de funcionamento do espectrômetro de massas sequencial



Fonte: Adaptado FAKTOR et al., (2012)

Os solventes utilizados para compor a fase móvel foram preparados individualmente. Testes com alguns aditivos de fase móvel foram realizados. Foram testados H₂O ultrapura e MeOH acidificados com HFor e H₂O ultrapura e MeOH alcalinizados com NH₄OH, em ambos os casos para uma concentração final dos aditivos em 0,01%. Todos os solventes foram filtrados à vácuo através de membranas de nylon

0,220 μm e degaseificados em ultrassom durante 20 minutos, à temperatura ambiente. A fase móvel foi armazenada em frascos próprios para solventes, rotulada com informações a respeito da sua composição, data, responsável pelo preparo.

A escolha dos solventes da fase móvel, composição de cada solvente na fase móvel bem como o fluxo da fase móvel e o gradiente de eluição foram baseados em maximização dos parâmetros cromatográficos, tais como, largura de pico, intensidade de sinal, área do pico, resolução, seletividade, dentre outros. A escolha da vazão da fase móvel foi baseada na melhor separação cromatográfica da solução trabalho, com vazões de fase móvel variando entre 300 e 400 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Com relação ao sistema de detecção, foram feitas injeções direta no espectrômetro de massas sequencial (infusão). Nestes testes, foram utilizadas amostras aquosas sintéticas, conforme descrito no item 3.3.2.2, fortificadas para 25,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cada analito e também o DZP-d5. A partir das injeções diretas e de dados da literatura para os analitos, foram otimizadas as condições do espectrômetro de massas de modo a definir o modo de ionização da fonte electrospray (ESI) (ESI+ ou ESI-), voltagem do cone e energia de colisão, temperatura da fonte, temperatura e vazão do gás de dessolvatação para secagem do solvente, voltagem do capilar e do cone extrator. Após a definição destas condições, foram selecionados os íons a serem monitorados para quantificação e qualificação.

3.3.4 Validação do método para determinação dos analitos

Uma vez definidas as melhores condições para determinação dos PPCPs e EDs, foi feita a validação da metodologia. Para todos os ensaios da validação, foram utilizadas amostras aquosas sintéticas conforme descrito no item 3.3.2.2. O método cromatográfico desenvolvido e otimizado foi validado segundo parâmetros de seletividade, precisão (repetitividade), exatidão, linearidade, limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD), efeito de matriz e robustez, seguindo os parâmetros de validação do guia USEPA 8000D (USEPA, 2018).

3.3.4.1 Seletividade

A seletividade é a habilidade de um método analítico de identificar e medir inequivocamente um analito na presença de outros componentes, como metabólitos, impurezas ou componentes da matriz. Para a verificação da seletividade do método, foi realizado o ensaio de injeção no UPLC-MS/MS de uma amostra aquosa sintética fortificada no nível de concentração do LQ de cada analito, e $25,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para o DZP-d5. Uma segunda amostra aquosa sintética foi preparada, porém não fortificada. Comparando-se os cromatogramas das duas amostras aquosas sintéticas injetadas, com a intensidade dos sinais de cada analito nas duas injeções, foi possível avaliar se na matriz (amostra aquosa sintética não fortificada) encontra-se algum interferente que apresente o mesmo tempo de retenção dos analitos, dificultando a determinação dos mesmos, tornando o método não seletivo.

3.3.4.2 Precisão (repetitividade) e precisão intermediária

Foram preparadas trinta amostras aquosas sintéticas (quinze para a precisão intra-dia 1 e mais quinze para intra-dia 2). Para todos os analitos os níveis de concentração avaliados para o ensaio de precisão foi: $50,0$, 250 e 500 ng L^{-1} . Para cada nível de concentração selecionado, foi realizado teste em cinco replicatas verdadeiras e três replicatas falsas. As amostras aquosas sintéticas foram extraídas e analisadas utilizando o método proposto em dois dias distintos, no dia do preparo e o subseqüente. Foi calculado o desvio padrão relativo (%DPR) para cada nível de concentração de um mesmo dia (intra-dia) e de dias diferentes (precisão intermediária), conforme descrito na Tabela 6.

3.3.4.3 Exatidão (recuperação)

Foram preparadas trinta amostras aquosas sintéticas (quinze para a exatidão intra-dia 1 e mais quinze para exatidão intra-dia 2). Para todos os analitos os níveis de

concentração avaliados para o ensaio de precisão foi: 50,0, 250 e 500 ng L⁻¹. Para cada nível de concentração selecionado, foi realizado teste em cinco replicatas verdadeiras e três replicatas falsas. As amostras sintéticas foram extraídas e analisadas utilizando o método proposto em dois dias distintos, no dia do preparo e o subsequente. Foi determinada a porcentagem de recuperação das amostras para cada nível de concentração de um mesmo dia (exatidão intra-dia) e de dias diferentes (exatidão inter-dia) através da comparação da concentração amostra com a concentração nominal, conforme descrito na Tabela 6.

3.3.4.4 Linearidade

Para verificar a linearidade do método, foram construídas curvas analíticas para os PPCPs e os EDs, contendo 6 níveis de concentração, via padronização interna, utilizando-se amostras aquosas sintéticas, fortificadas em diferentes níveis de concentração, conforme apresentado na Tabela 12. Em todas as amostras aquosas sintéticas preparadas, o nível de concentração do DZP-d5 foi fortificado para 250 ng L⁻¹. As amostras aquosas sintéticas foram extraídas, conforme protocolo de preparo de amostra otimizado e posteriormente analisadas em dois dias distintos, no dia do preparo (intra-dia 1) e o subsequente (intra-dia 2), com sete replicatas verdadeiras e três replicatas falsas para cada nível de concentração.

Tabela 12 - Níveis de concentração das amostras aquosas sintéticas para cada analito

Analito	P1	P2	P3	P4	P5	P6
	ng L ⁻¹					
4NP	10,0	100	200	250	300	500
BEN	10,0	100	200	250	300	500
BPA	50,0	100	200	250	300	500
BZP	10,0	100	200	250	300	500
CZP	10,0	100	200	250	300	500
DEP	50,0	100	200	250	300	500
DZP	10,0	100	200	250	300	500
IBP	50,0	100	200	250	300	500
TMP	10,0	100	200	250	300	500

Fonte: Autor

A regressão linear foi realizada pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes de correlação, angular e linear e o erro padrão foram calculados para as curvas analíticas obtidas para os nove analitos.

3.3.4.5 Limite de quantificação

O LQ foi definido como o ponto de menor nível de concentração de cada analito na sua respectiva curva analítica, em que se pode quantificar com precisão e exatidão (USEPA, 2018), respeitando os critérios de exatidão entre 70 e 130% e precisão (%DPR) < 20%, conforme apresentado na Tabela 6.

Assim, o LQ de cada analito será definido como ponto de menor nível de concentração da curva analítica validada (em função de exatidão e precisão), obtida com as amostras aquosas sintéticas, como descrito no item 3.3.2.2.

3.3.4.6 Limite de detecção

O LD foi determinado como a concentração mínima de uma substância que pode ser medida instrumentalmente com confiança de 99% (USEPA, 2018).

A determinação do LD para cada analito foi feita com base no desvio padrão (σ) das concentrações obtidas por quantificação da razão entre as áreas de cada analito pela área do PI em sete replicatas verdadeiras e três replicatas falsas de amostras aquosas sintéticas referentes ao ponto de menor nível de concentração (LQ) das curvas analíticas de cada analito. Conforme descrito na Tabela 6, o LD de cada analito pode ser calculado, via multiplicação do fator t Student, para n-1 graus de liberdade e 99% de confiança e o σ das sete injeções do LQ.

Neste trabalho, os LDs foram estimados por ferramentas estatísticas e não houve a validação desses níveis de concentração dos LDs estimados, uma vez que os sinais referentes aos LDs foram menos intensos do que os sinais dos LQs dos analitos,

dificultando a integração dos sinais e se confundiam com ruídos. Dessa forma, os valores de concentração estimados entre LD e LQ não serão relatados.

3.3.4.7 Efeito de matriz

Para a avaliação do efeito de matriz, foram preparadas duas curvas analítica para cada analito, a fim de se verificar se as curvas apresentaram diferença significativas entre elas, permitindo dessa forma atribuir a presença ou não de efeito de matriz. As duas curvas analíticas apresentaram os mesmos níveis de concentração e a única diferença entre as duas curvas analíticas foi o solvente. Em uma curva analítica, foi utilizado água superficial (matriz) como solvente e na outra curva analítica, foi utilizado H₂O ultrapura. Então foi possível avaliar o efeito que a matriz causa na resposta dos analitos quando comparado com a resposta dos mesmos analitos em água ultrapura.

A curva analítica feita como a matriz (água superficial) como solvente, foi utilizada a mesma curva analítica do ensaio de linearidade, descrita no item 3.3.4.4. A curva analítica que utilizou H₂O ultrapura como solvente, foi preparado amostras aquosas sintéticas, conforme descrito no item 3.3.2.2, porém ao invés da utilização de água superficial, foi utilizado H₂O ultrapura como solvente.

Para a avaliação do efeito de matriz, foi utilizado o teste F, a fim de se verificar se as curvas apresentavam ou não alguma diferença significativa para um determinado nível de confiança. Para tal, foi utilizado um “fator normalizador” entre os níveis de concentrações testados nas duas curvas analíticas. Este fator normalizador foi chamado de Fator de calibração (Fc) e foi calculado conforme Equação 1.

$$Fc = \frac{\frac{\text{Área Padrão}}{\text{Área PI}}}{\text{Concentração}} \quad \text{Equação 1}$$

onde:

Área padrão = área do sinal relativo ao analito;

Área PI = área do sinal relativo ao padrão interno;

Concentração = Concentração nominal em µg L⁻¹.

O F_c foi calculado para cada uma das sete injeções de cada nível de concentração utilizado em cada uma das duas curvas analíticas. A partir do conjunto de valores dos F_c para de cada analito para cada curva analítica (matriz e H_2O ultrapura), foi determinado o σ dos valores dos F_c para cada um dos conjuntos. Em seguida, foi realizado o teste F como apresentado na Equação 2. Foi adotado como critério, no numerador o conjunto de dados com maior valor de desvio padrão.

$$F_{calc} = \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2}$$

Equação 2

onde:

σ_1^2 = desvio padrão do conjunto de F_c da curva analítica com maior valor de σ ;

σ_2^2 = desvio padrão do conjunto de F_c da curva analítica com menor valor de σ .

O valor de $F_{calculado}$ é comparado com o valor de $F_{tabelado}$, levando-se em conta o grau de liberdade. Valores de $F_{calculados}$ acima do valor do $F_{tabelado}$, indicam que as curvas analíticas apresentam diferença significativa dentre de um nível de confiança de 95%.

3.3.4.8 Robustez

Para a avaliação da robustez do método desenvolvido, foi preparada uma curva analítica para cada analito, porém a mesma curva analítica foi analisada sob condições diferentes. Neste teste, foi utilizada a mesma curva analítica do ensaio de linearidade, descrita no item 3.3.4.4. Primeiramente, a curva analítica foi analisada conforme a metodologia desenvolvida. Em seguida, a mesma curva analítica foi analisada com alguma variação da metodologia original. Neste ensaio, houve a alteração no fluxo da fase móvel.

Foram obtidas duas curvas analíticas, que foram analisados sob condições diferentes. Para a avaliação da robustez do método desenvolvido, foi utilizado o mesmo raciocínio do efeito de matriz. Foi calculado um F_c para cada nível de concentração utilizado nas curvas analíticas e de posse do conjunto de todos os F_c , foi avaliado o σ do

Fc e aplicado o teste F, para avaliação se as curvas analíticas (com e sem alteração do fluxo da fase móvel), apresentam ou não alguma diferença significativa, baseado na mesma equação do item anterior (Equação 2).

3.3.5 Ensaio de determinação de PPCPs e EDs em águas superficiais.

Para determinação dos PPCPs e EDs abordados nesse trabalho, foram utilizados 500 mL de amostra de água superficial coletada e as análises foram feitas triplicatas. Foi então feita a extração através do cartucho C18 previamente condicionado com 5,00 mL de MeOH e 5,00 mL de H₂O ultrapura. O cartucho foi eluído com 5,00 mL de MeOH, em duas etapas (2 x 2,50 mL) em um balão volumétrico. Quando foi necessário, o volume final do extrato foi ajustado para 5,00 mL utilizando MeOH. Os extratos foram submetidos a análise por UPLC-MS/MS.

3.4 Método de cálculo do risco para os micropoluentes quantificados

Os valores de concentração prevista em efeito (PNEC) para todos os micropoluentes quantificados nas análises cromatográficas, relacionados a diferentes organismos aquáticos, foram coletados a partir da literatura científica. Como diferentes valores PNEC para cada substância estão disponíveis em diferentes estudos, o menor valor PNEC de cada substância foi escolhido como cenário de exposição para o pior caso.

Em relação aos valores das concentrações ambientais medidas para os contaminantes (MEC), foram considerados diferentes cenários de acordo com os meses monitorados para cada substância:

- (i) MEC com o maior valor quantificado ($MEC_{m\acute{a}x}$);
- (ii) MEC com o menor valor quantificado ($MEC_{m\acute{i}n}$);
- (iii) MEC com o valor médio considerando todas as coletas ($MEC_{m\acute{e}d}$);
- (iv) MEC com o valor do percentil 95 (MEC_{P95}).

O coeficiente de risco foi calculado para todos os analitos detectados, considerando cada ponto amostral da bacia do Guandu utilizando-se os dados de MEC_{P95} e também com os valores de todos os analitos quantificados em todos os pontos amostrais, considerando-se os valores de MEC mínimo, máximo, médio e do Percentil 95. Valores de RQ > 1 são considerados como potencial risco ao ambiente e valores de RQ <1 significa potencial de risco baixo ou inexistente (EMEA 2006; CUNHA; MENDES; MARQUES, 2019). A Equação 4 foi aplicada para o cálculo de risco.

$$RQ = \frac{MEC}{PNEC} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

RQ = Risco Ecológico;

MEC = Concentração Ambiental Medida para o Contaminante;

PNEC = Concentração Prevista sem Efeito.

3.5 Ensaios de ecotoxicidade

Os ensaios de ecotoxicidade foram conduzidos com o apoio da equipe de Ecotoxicologia do LABIFI. Dois ensaios foram conduzidos: O de toxicidade crônica com o bioindicador *C. dubia* e o ensaio que avalia a estrogenicidade da amostra denominado YES tendo como bioindicador, a bactéria geneticamente modificada *S. cerevisiae*.

3.5.1 Ensaio ecotoxicológico com microcrustáceo *C. dubia*

O cultivo do microcrustáceo *C. dubia* e os ensaios de toxicidade crônica seguiram as normas da Organização Internacional de Padronização (ISO - do inglês *International Organization for Standardization*) 20665 (2008) e Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) 13.373 (2017). O efeito de toxicidade crônica foi verificado comparando a taxa de reprodução, num período de sete dias, dos organismos expostos às amostras

coletadas no Rio Guandu, com os organismos do controle negativo. Os organismos foram cultivados em água mineral (marca Bioleve) acrescida de água da mina natural, para ajuste da dureza, quando foi necessário. O ajuste do pH foi realizado, quando necessário, utilizando-se uma solução de HCl 50% (pH 6,0 – 7,0).

Os bioensaios foram realizados com dez réplicas de cada ponto amostral (amostra teste), sem diluição, e dez réplicas para o controle negativo, apenas com a água de cultivo. Os bioensaios foram realizados em béqueres de 30 mL, cada um com uma fêmea com 6 a 24 h de vida em 15 mL da amostra. Os ensaios foram realizados em incubadora (Nova Ética, BOD 411D) com fotoperíodo de 16/8 h (claro/escuro) a 25°C. Diariamente foi realizada a limpeza dos frascos, verificação dos organismos adultos vivos, retirada e contagem dos filhotes gerados por partenogênese (neonatos) e alimentados com uma cultura de alga (*Raphidocelis subcaptata*). Durante o período de exposição o ensaio foi renovado 2 vezes. Os detalhes do ensaio são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Resumo do ensaio de toxicidade crônica com microcrustáceo *C. dubia*

Requisitos	Condições
Sistema de ensaio	Semi-estático
Idade inicial do organismo	6 h à 24 h
Água de diluição	Água natural
Volume soluções-teste/recipientes	15 mL
Número de réplicas/soluções-teste	10
Número de organismos por recipiente	1 fêmea
Alimentação	Sim: cultura de algas
Temperatura	23 a 27 °C
Fotoperíodo	16 h de luz
Renovação da solução-teste	2 renovações
Efeito observado	Sobrevivência e reprodução
Expressão dos resultados	Tóxico e Não-tóxico

Fonte: Adaptada de ABNT, (2017)

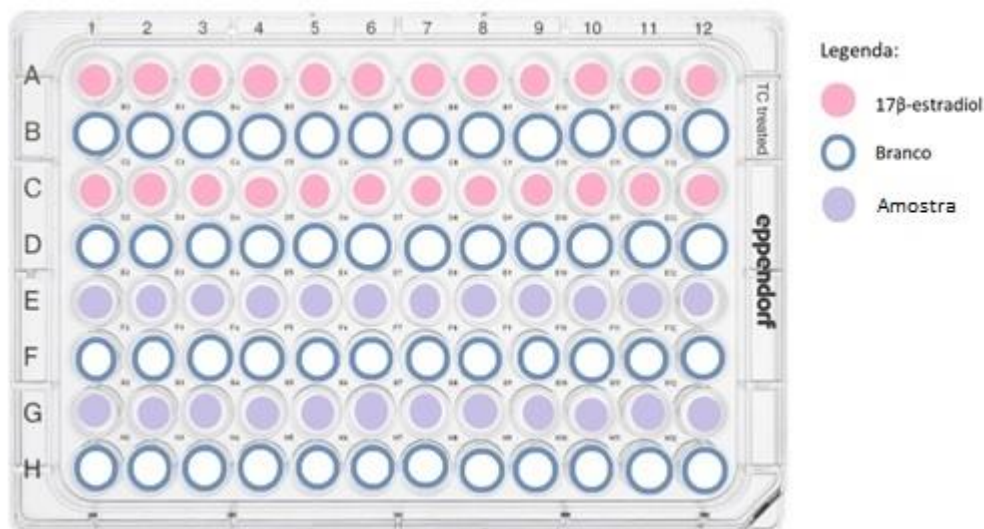
3.5.2 Ensaio ecotoxicológico com bactéria *S. cerevisiae*

Os ensaios de detecção de estrogenicidade, via ensaio do YES, foram realizados com cepas recombinantes (modificadas geneticamente) da levedura *S. cerevisiae*, seguindo protocolo baseado em Routledge e Sumpter (1996).

Foram utilizadas 2 placas para o preparo do ensaio. Na placa 1 foram realizadas diluições do padrão de E2 e da amostra, conforme a seguir: 200 µL de E2 foram adicionados ao poço 1 e 100 µL de MeOH grau HPLC adicionados aos poços 2 a 12. Após, 100 µL da solução do poço 1 foi retirado e adicionado ao poço 2 e assim sucessivamente até o poço 12. Dessa forma, foi produzido poços com os seguintes percentuais de E2: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78, 0,39, 0,195, 0,098 e 0,048%. O mesmo procedimento foi realizado para a diluição da amostra, sendo que neste caso, os 200 µL de E2 do poço 1 foram substituídos por 200 µL de amostra. Dessa forma, foi produzido poços com os seguintes percentuais da amostra: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78, 0,39, 0,195, 0,098 e 0,048%.

A Figura 10 ilustra como a placa 2 foi preparada. As linhas A e C representam o controle positivo. Nessas linhas, foi adicionado 10,0 µL de E2 diluído nos poços de 1 a 12 com auxílio de uma pipeta multicanal. Já nas linhas B, D, F e H representa o branco. Nessas linhas, foi adicionado 10,0 µL de MeOH grau HPLC nos poços de 1 a 12. As linhas E e G representam a amostra diluída. Em todos os poços (1 ao 12), foi adicionado 10,0 µL de amostra. O conteúdo de cada poço foi evaporado naturalmente em capela de fluxo laminar e em seguida, foram adicionados 200 µL da solução de análise (25,0 µL de uma solução contendo a levedura + 25,0 mL de meio de cultivo + 250 µL de solução de CPRG 10 mg mL⁻¹) seguido de agitação por 2 min. Dessa forma, houve uma diluição de um fator de 20 vezes na concentração de cada poço. As placas foram levadas à incubadora a 30°C por 72 h e após esse período, foi realizada a leitura da absorbância (ABS) em espectrofotômetro Spectra Max® M3, sob os comprimentos de onda de 575 nm para a amostra e 620 nm para o controle positivo (E2). Em seguida, foi calculado o EQ-E2 de cada amostra.

Figura 10 - Imagem esquemática de uma placa de ensaio YES



Fonte: Autor

3.5.2.1 Controle positivo E2

Em todos os ensaios, foi construída uma curva dose-resposta do controle positivo E2, apenas para fins de comprovação de que a resposta do padrão de E2 se apresenta de maneira esperada. A curva dose-resposta produzida, após a diluição de 20 vezes, se apresenta para a faixa de $1,33$ a $2,72 \times 10^3$ ng L⁻¹. Ao todo, foram realizados três ensaios com o controle positivo.

Devido a toxicidade das amostras, alguns estudos observaram a ocorrência de inibição do crescimento da levedura durante o período de incubação do ensaio, sendo que tal fato geralmente está associado à toxicidade da amostra analisada sobre a bactéria (BECK et al, 2006; BERESFORD et al., 2000; BISTAN; LOGAR; TISLER, 2011). Quando as amostras são tóxicas para a bactéria (ex: presença de compostos que inibem o crescimento da levedura), isso é observado pela ausência de turbidez no fundo do poço. A Equação 3, apresentada por Frische e colaboradores (2009), permite quantificar esse efeito, utilizando o controle da ABS a 620 nm.

$$\% \text{ Citotoxicidade} = \left(1 - \frac{ABS \text{ amostra}}{ABS \text{ branco}} \right) \times 100$$

Equação 4

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Avaliação das melhores condições de detecção no espectrômetro de massas.

A Tabela 14 apresenta os produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (PPCPs) e os desreguladores endócrinos (EDs) monitorados neste trabalho, via UPLC-MS/MS, com tipo de ionização (ESI+ e ESI-), bem como os íons precursores e seus fragmentos, utilizando o modo de aquisição por MRM. A Tabela 14 também mostra as voltagens do cone e da célula de colisão além das referências utilizadas para a otimização das condições do espectrômetro de massas para este trabalho. Para cada analito, foram selecionados a(s) transição(ões) característica(s), onde o fragmento mais intenso e estável foi utilizado para quantificação e o segundo mais intenso para a confirmação.

Tabela 14 - PPCPs e EDs quantificados por UPLC-MS/MS deste trabalho

Analito	Modo ESI	Transição (m/z)	Cone (V)	Célula de Colisão (V)	Referência
PPCPs					
Benzofenona (BEN)	+	183 > 105	32	15	(Rodríguez-Gómez <i>et al.</i> , 2015)
		183 > 77		30	
Bromazepam (BZP)	+	316 > 209	50	26	
		316 > 261		25	
Clonazepam (CZP)	+	316 > 214	55	35	(Almeida <i>et al.</i> , 2013)
		316 > 241		32	
Diazepam (DZP)	+	285 > 193	55	32	
		285 > 154		26	
Ibuprofeno (IBP)	-	205,1 > 161	20	6	(Paíga <i>et al.</i> , 2015)
Trimetoprim (TMP)	+	291,3 > 230,2	50	25	(Rossmann <i>et al.</i> , 2014)
		291,3 > 261,1		25	

Tabela 15 (cont) - PPCPs e EDs quantificados por UPLC-MS/MS deste trabalho

Analito	Modo ESI	Transição (m/z)	Cone (V)	Célula de Colisão (V)	Referência
EDs					
4-Nonilfenol (4NP)	-	219 > 106 219 > 119	50	21 34	(Vega-Morales; Sosa-Ferrera; Santana-Rodríguez, 2010)
Bisfenol A (BPA)	-	227 > 212 227 > 132	45	18 25	(Vega-Morales; Sosa-Ferrera; Santana-Rodríguez, 2010)
Dietilftalato (DEP)	+	223,1 > 149 223,1 > 177	20	20 10	(Céspedes et al., 2004)

Fonte: Autor

4.2 Condições do sistema cromatográfico UPLC-MS/MS

Visando uma otimização das condições cromatográficas, foram realizados testes para a maximização dos parâmetros cromatográficos, utilizando H₂O ultrapura, metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) como solventes de fase móvel. Foram testados diferentes inclinações da rampa do gradiente e fluxo da fase móvel. Além desses fatores, foram testados aditivos de fase móvel, com o intuito de aumentar a ionização dos compostos. Neste trabalho foram testados ácido fórmico (HFor) e hidróxido de amônio (NH₄OH) como aditivos de fase móvel. Os gradientes de fase móvel testados neste trabalho são apresentados na Tabela 15. As Figura 11 e 12 apresentam os cromatogramas de íons no modo total (TIC - do inglês, *total ion chromatogram*) com as condições do gradiente descritas nos itens 3 e 5 da Tabela 15, utilizando-se a solução trabalho mix (100 µg L⁻¹).

Tabela 16 - Propostas de gradientes para desenvolvimento do método cromatográfico.

Teste	Solv A	Solv B	Tempo (min)	% A	% B	Inclinação	Fluxo (µL min ⁻¹)
1	H ₂ O + 0,01% HFor	MeOH	0	97	3	6	300
			4	1	99		
			5	1	99		
			5.5	95	5		
			6	97	3		

Tabela 15 (cont) - Propostas de gradientes para desenvolvimento do método cromatográfico.

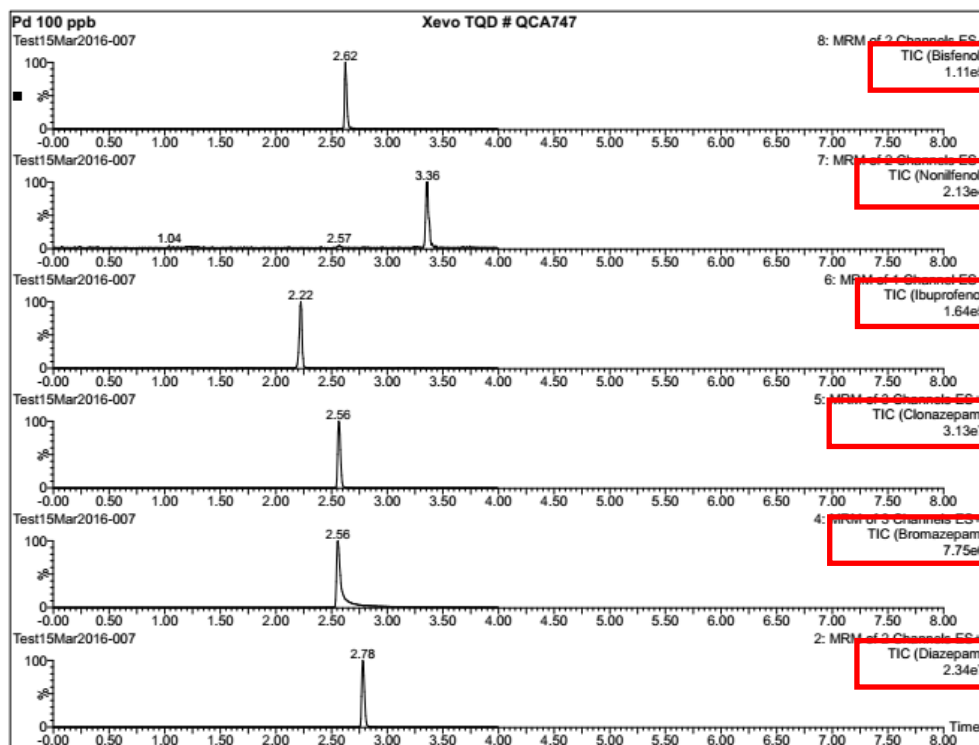
Teste	Solv A	Solv B	Tempo (min)	%A	%B	Inclinação	Fluxo ($\mu\text{L min}^{-1}$)
2	$\text{H}_2\text{O} + 0,01\% \text{ HFor}$	$\text{MeOH} + 0,01\% \text{ HFor}$	0	97	3	6	400
			2	97	3		
			4	1	99		
			5	1	99		
			5.5	95	5		
			6	97	3		
3	$\text{H}_2\text{O} + 0,01\% \text{ NH}_4\text{OH}$	ACN	0	95	5	6	300
			2	50	50		
			4	1	99		
			5	1	99		
			5.1	95	5		
			6	95	5		
4	$\text{H}_2\text{O} + 0,01\% \text{ NH}_4\text{OH}$	$\text{MeOH} + 0,01\% \text{ NH}_4\text{OH}$	0	95	5	6	300
			2	50	50		
			4	1	99		
			5	1	99		
			5.1	95	5		
			6	95	5		
5	$\text{H}_2\text{O} + 0,01\% \text{ NH}_4\text{OH}$	$\text{MeOH} + 0,01\% \text{ NH}_4\text{OH}$	0	98	2	6	400
			0,5	98	2		
			4	1	99		
			5	1	99		
			5,01	98	2		
			8	98	2		

Legenda: *solvente

Fonte: Autor

Como pode ser observado pelas Figuras 11 e 12 (quadros destacados em vermelho), o gradiente nº 5 foi o que produziu sinais mais intensos e finos para os analitos, proporcionando um ganho nas áreas relativas de cada sinal. Os aumentos da intensidade dos sinais proporcionam uma melhor relação sinal/ruído (S/R) e conseqüentemente, aumentando a sensibilidade.

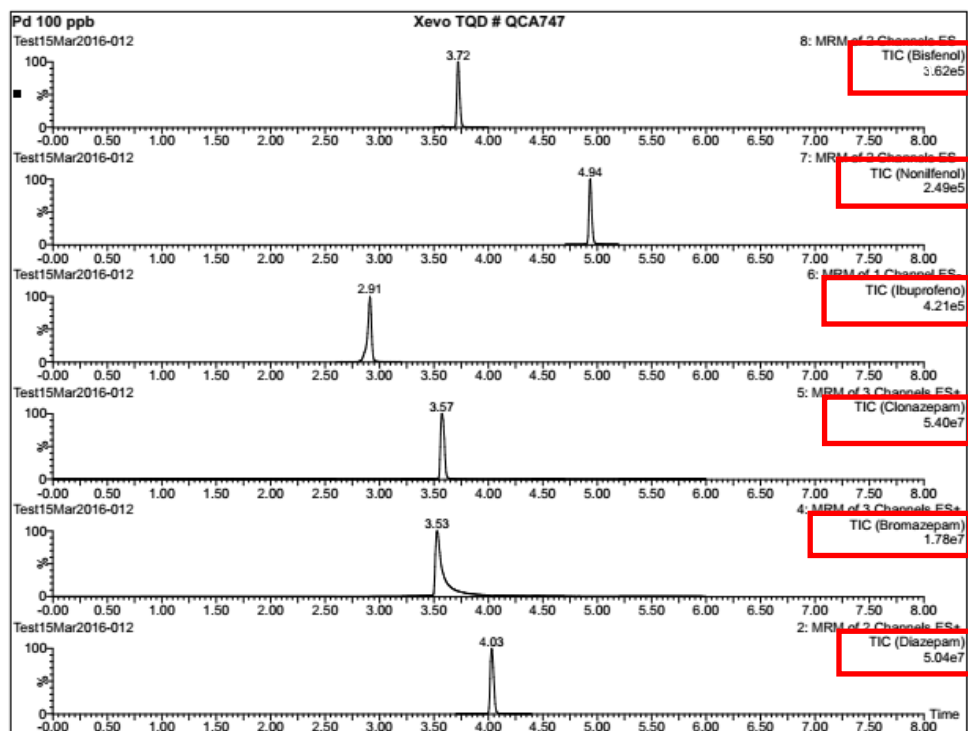
Figura 11 - Cromatograma, no modo TIC, de alguns analitos para o gradiente n° 3



Legenda: Tempo (time) em minutos.

Fonte: Autor

Figura 12 - Cromatograma, no modo TIC, de alguns analitos para o gradiente n° 5



Legenda: Tempo (time) em minutos.

Fonte: Autor

Na Tabela 16 são apresentadas as condições cromatográficas otimizadas resumidas empregadas para a determinação dos PPCPs e EDs avaliados nesse trabalho.

Tabela 17 - Condições empregadas no sistema UPLC-MS/MS

Parâmetro	UPLC-MS/MS
Coluna Analítica	BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 μ m)
Fase Móvel	(A) H ₂ O + 0,01% NH ₄ OH (B) MeOH + 0,01% NH ₄ OH
Volume de Injeção	5,00 μ L
Temperatura Coluna	50,0 °C

Fonte: Autor

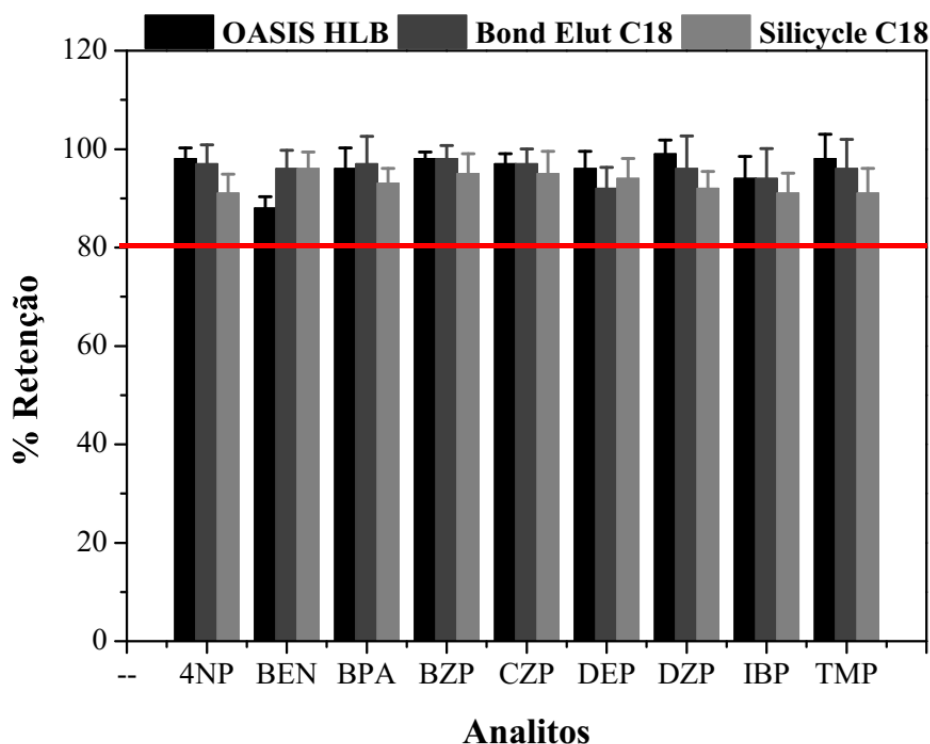
4.3 Extração em fase sólida (SPE)

4.3.1 Escolha da melhor fase sólida

Neste trabalho foram testados três tipos de cartuchos diferentes, dois com fase sólida de C18, ambos contendo 500 mg de fase sólida, porém um tinha volume de 3,00 mL (Bond Elut) e o outro tinha volume de 6,00 mL (Silicycle). O outro cartucho testado, o OASIS HLB, também continha 500 mg de fase sólida e volume de 6,00 mL e este possui uma fase sólida de caráter polimérica, interagindo com analitos polares e apolares. O primeiro teste, foi verificar qual dos cartuchos possui o poder de reter melhor os analitos.

O teste foi realizado, preparando soluções aquosas sintéticas, com nível de concentração de 50,0 μ g L⁻¹ para os analitos e 25,0 μ g L⁻¹ para o padrão interno (PI), com volume final de 250,0 mL e estas soluções aquosas sintéticas foram percoladas das pelos cartuchos. Foram avaliados os extratos de cada um dos cartuchos de maneira separada. A Figura 13 apresenta o resultado para o poder de retenção dos três cartuchos testados.

Figura 13 - Percentual de retenção (% Retenção) dos analitos em cada cartucho testado



Fonte: Autor

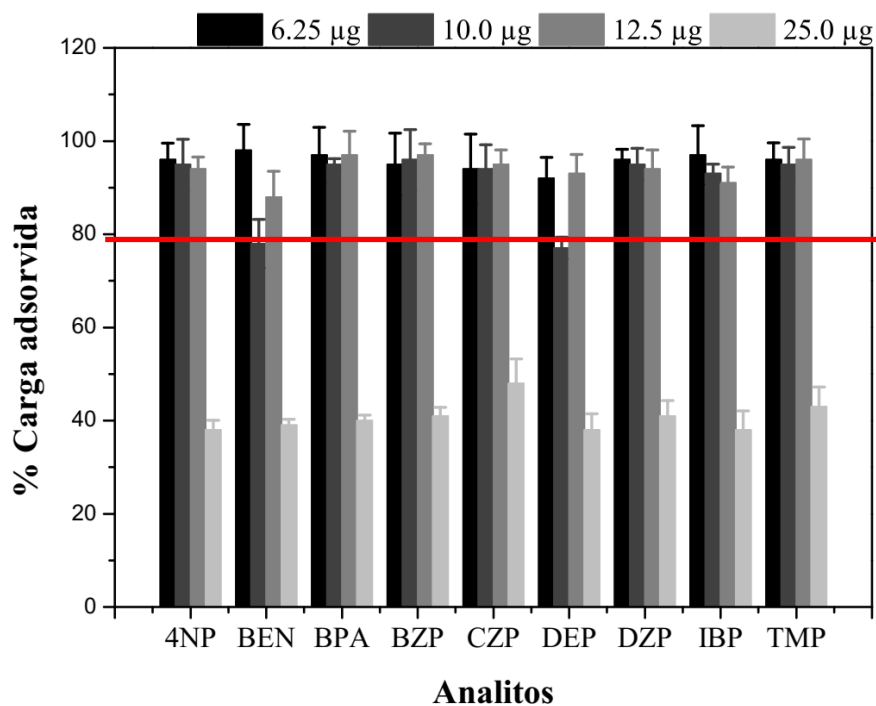
Como pode ser visto na Figura 13 não houve grande diferença entre os cartuchos testados, onde todos tiveram um poder de retenção superior a 80%, demonstrando que qualquer um dos cartuchos testados poderia ser utilizado na metodologia analítica para a extração dos analitos da matriz.

4.3.2. Carga máxima de retenção dos cartuchos

A segunda parte da metodologia para a extração dos analitos da matriz, envolveu descobrir qual a carga máxima de adsorção de cada cartucho. Para tal teste, foram preparadas quatro amostras aquosas sintéticas, todas com o mesmo nível de concentração ($25,0 \mu\text{g L}^{-1}$), com diferentes volumes finais. Assim foram testados quatro volumes finais, 250, 400, 500 e $1,00 \times 10^3$ mL resultando em diferentes massas percoladas pelos cartuchos testados. Em todas as amostras aquosas sintéticas, a concentração do PI foi de $25,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

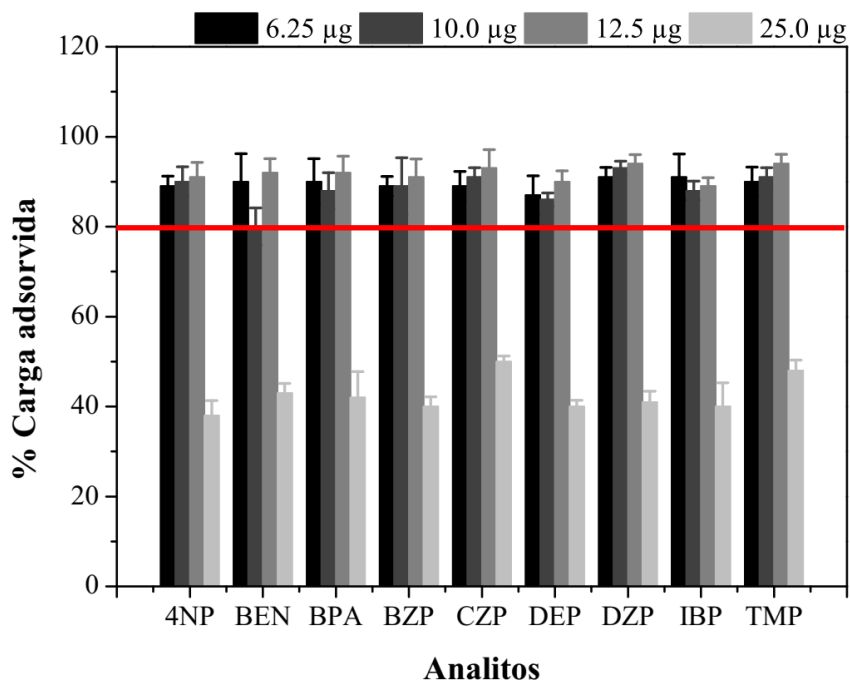
As Figuras 14, 15 e 16 apresentam os resultados obtidos para os testes com os cartuchos OASIS HLB, Bond Elut C18, Silicycle C18, respectivamente.

Figura 14 - Carga máxima de adsorção do cartucho OASIS HLB



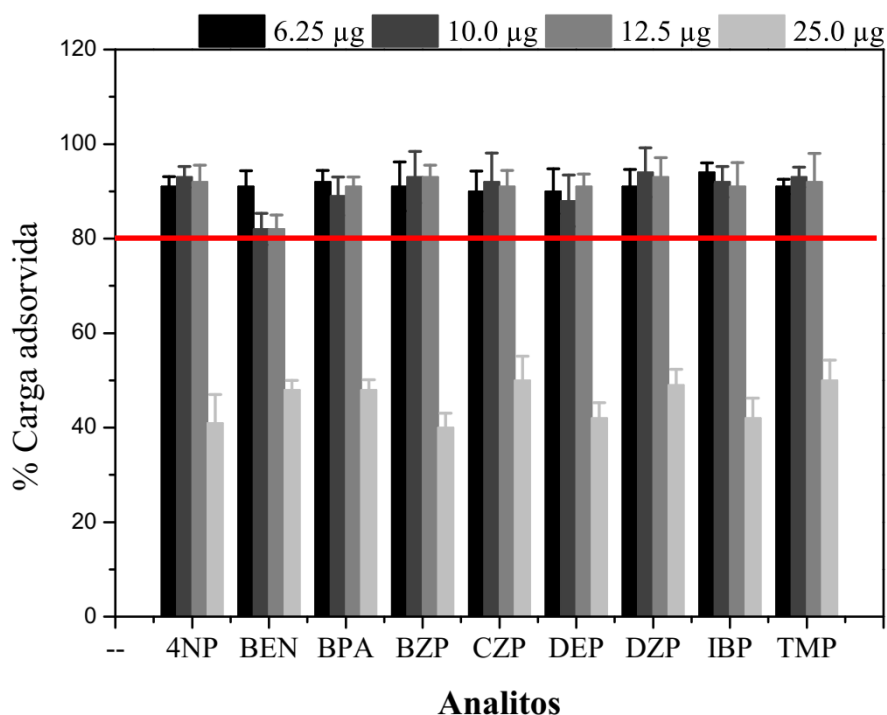
Fonte: Autor

Figura 15 - Carga máxima de adsorção do cartucho Bond Elut C18



Fonte: Autor

Figura 16 - Carga máxima de adsorção do cartucho Silicycle C18



Fonte: Autor

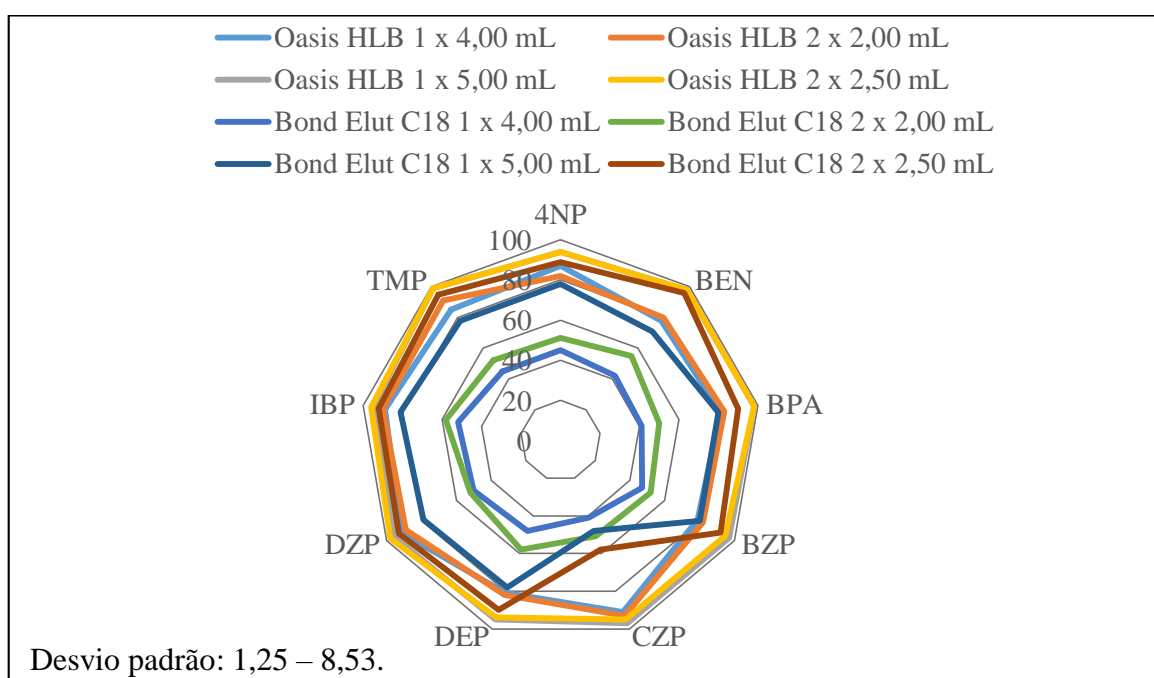
Como pode ser visto pelas Figuras 14, 15 e 16, os três cartuchos não apresentam diferenças significativas com relação ao poder de retenção dos analitos em função da fase sólida utilizada em sua composição. A maior diferença percentual foi de 10%, observada entre os cartuchos Silicycle C18 e Bond Elut C18, para BEN. Os três cartuchos conseguiram reter, com eficiência superior a 80%, uma massa máxima de 12,5 µg. Massas superiores a essa, como pode ser visto nas figuras, os cartuchos não possuem mais capacidade de retenção, pela saturação de todos os sítios ativos disponíveis para a retenção dos analitos em função da massa de fase sólida que cada cartucho continha.

Dessa forma, foi definido o volume de amostra a ser passada pelo cartucho o volume de 500 mL, pois os níveis de concentração das amostras reais são mais baixos (ordem de ng L^{-1}) do que os níveis de concentração das amostras aquosas sintéticas utilizadas nos testes (ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$). Como o cartucho teve capacidade de retenção para altas concentrações, estes não terão problemas em reter os analitos em amostras reais com volumes de 500 mL.

4.3.3. Volume do solvente de eluição

A terceira parte da metodologia para a extração dos analitos da matriz, envolveu a escolha do melhor volume do solvente de eluição. O MeOH foi escolhido como solvente de eluição, baseado no trabalho publicado por Cunha, Araujo e Marques (2017), em que se constatou a utilização deste solvente numa vasta gama de trabalhos para analitos semelhantes aos utilizados neste trabalho. Para a escolha do melhor volume de solvente de eluição, foram preparadas doze amostras aquosas sintéticas, seis para o cartucho Bond Elut C18 e as outras seis para o cartucho OASIS HLB, com volume final de 500 mL conforme descrito na Tabela 10. Nesta etapa, não houve teste com o cartucho Silicycle C18 pois os resultados até o presente momento não demonstraram nenhuma diferença entre os cartuchos e tendo em vista a maior disponibilidade do cartucho Bond Elut C18, seguiu-se os testes apenas com dois cartuchos (OASIS HLB e Bond Elut C18). Nesta etapa foram testadas eluições em uma etapa e em etapas sequenciais bem como diferentes volumes de solvente de eluição. A Figura 17 apresenta os resultados obtidos para os diferentes volumes de extração com MeOH.

Figura 17 - Percentual de recuperação dos analitos



Legenda: Testes realizados para dois volumes de eluição para os dois cartuchos testados.

Fonte: Autor

Como pode ser visto na Figura 17, a utilização de 4,00 mL de MeOH em uma única etapa para o cartucho OASIS HLB conseguiu recuperar todos os analitos numa taxa de recuperação superior a 70%. Conforme preconizado pelo guia USEPA 8000D, a faixa de recuperação deve estar entre 70 e 130%. Já para o cartucho de Bond Elut C18, a utilização de 4,00 mL de MeOH em uma única etapa apresentou valores de recuperação inferiores a 50%, valor fora da faixa de aceitação preconizado pelo guia USEPA 8000D, exceto para o DZP (51%) e IBP (53%) (USEPA, 2018). Diante do exposto, o cartucho OASIS HLB apresenta taxas de recuperação em acordo aos valores descritos no guia, sendo assim indicado para a extração, limpeza e concentração dos analitos. Entretanto devido à tecnologia empregada para retenção de analitos polares e apolares sem a necessidade de um tratamento prévio na amostra, este cartucho possui um alto valor comercial, o que tornaria o método de extração com estes cartuchos bastante custoso. Dessa forma, foram realizados outros testes com o cartucho Bond Elut C18, que possui um custo mais acessível, tornando o método de extração economicamente mais viável.

Visando um aumento da taxa de recuperação, principalmente para o cartucho Bond Elut C18 foi realizado outro teste, com o mesmo volume final de MeOH, porém em duas etapas (2 x 2,00 mL). Para melhores valores de recuperação dos analitos, extrações repetidas podem ser necessárias (MITRA, 2003). Como pode ser observado na Figura 17 este teste em duas etapas apresentou um aumento da taxa de recuperação dos analitos para os dois cartuchos testados. Por exemplo, para o cartucho OASIS HLB houve o aumento da taxa de recuperação do BZP de 79% para 83% e para o TMP, a taxa de recuperação aumentou de 84% para 92%. Já para o cartucho Bond Elut C18, a eluição em duas etapas promoveu valores de recuperação na faixa de 50% para todos os analitos, ainda em desacordo com a recomendação do guia 8000D (USEPA, 2018).

Com o intuito de melhorar os valores de recuperação dos analitos para o cartucho Bond Elut C18, foi realizado testes com utilização de 5,00 mL de MeOH em uma etapa única e também em duas etapas (2 x 2,50 mL). Como pode ser visto na Figura 17, a utilização de 5,00 mL de MeOH em uma única etapa, para o cartucho OASIS HLB, todos os analitos apresentam taxa de recuperação superior a 80%, como preconiza o guia de validação USEPA 8000D. Para o cartucho Bond Elut C18, a utilização de 5,00 mL de MeOH em uma única etapa levou a taxa de recuperação de todos os analitos para valores dentro da faixa preconizada pelo guia de validação USEPA 8000D com exceção do CZP, que apresentou taxa de recuperação inferior a 50% (USEPA, 2018).

O quarto teste realizado teve como finalidade aumentar a taxa de recuperação do CZP. Neste teste foi utilizado o mesmo volume final de MeOH, porém em duas etapas (2 x 2,50 mL). Para o cartucho OASIS HLB foi observado um aumento na taxa de recuperação de cada analito. O cartucho Bond Elut C18, também permitiu o aumento da taxa de recuperação dos analitos, dentro da faixa que preconiza o guia de validação USEPA 8000D, exceto para o CZP que teve sua recuperação aproximadamente 60%, como pode ser visto na Figura 17 (USEPA, 2018).

A faixa de aceitação da recuperação preconizada pelo guia de validação USEPA 8000D é de 70% a 130%, com precisão (%DPR) inferior a 20%. Porém, dependendo da complexidade analítica e também complexidade da amostra, este valor pode ser de 50% a 130% (USEPA, 2018; RIBANI *et al.*, 2004).

Os valores de recuperação obtidos estiveram na faixa de 57% a 99% para todos os analitos, indicando uma adequada taxa de recuperação. Tais valores de recuperação mostrados na Figura 17, ilustram que os resultados são comparados com a mesma técnica extrativa. (ACUÑA *et al.*, 2015; CUNHA *et al.*, 2015; ARAUJO; BAUERFELDT; CID, 2018; MADIKIZELA; CHIMUKA, 2016; VALCÁRCEL *et al.*, 2013; VANDERFORD, B.; SNYDER, 2006). Segundo Gros e colaboradores, quando outros parâmetros de desempenho da validação, tais como limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD), precisão e exatidão, por exemplo, estiverem dentro do intervalo preconizado pelo método de validação, os analitos com taxa de recuperação fora da faixa preconizado pelos métodos de validação podem ser quantificados (GROS; PETROVIC; BARCELÓ, 2007). Dessa forma, todos os analitos foram quantificados, utilizando 5,00 mL de MeOH em duas etapas sequenciais.

4.4 Procedimento experimental desenvolvido para o preparo de amostras por SPE

O procedimento experimental desenvolvido baseou-se no condicionamento dos cartuchos com 5,00 mL de MeOH seguidos por 5,00 mL de H₂O ultrapura. Após o condicionamento foram percolados pelos cartuchos um volume de 500 mL de amostras reais, previamente filtradas. Para a etapa de eluição, foram utilizados 5,00 mL de MeOH, divididos em duas parcelas de 2,50 mL cada. O extrato, é transferido para um balão

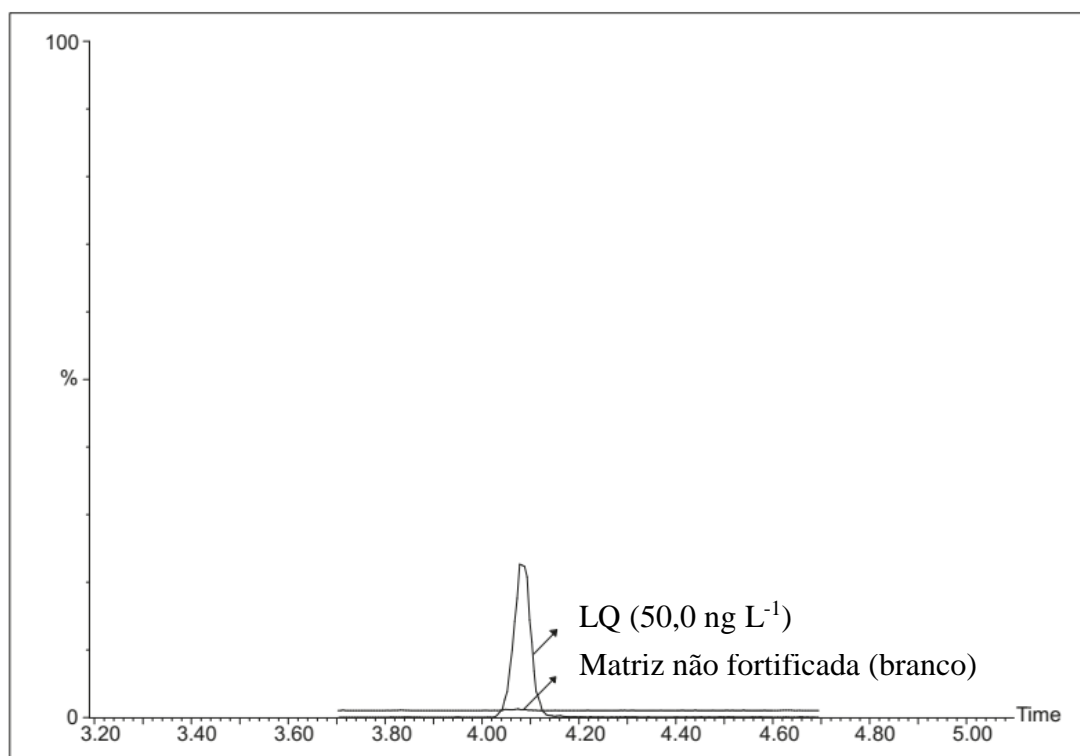
volumétrico (capacidade de 5,00 mL) e é ajustado para o volume final de 5,00 mL com MeOH quando necessário. Logo após uma alíquota do extrato é transferido para o vial e este foi injetado no UPLC-MS/MS para a sua determinação.

4.4.1 Validação do método empregando SPE e UPLC-MS/MS

4.4.1.1 Seletividade

Conforme descrito no item 3.3.4.1, foi preparado duas amostras aquosas sintéticas, onde uma das amostras aquosas sintéticas foi fortificada (no nível de concentração do LQ para cada analito e $25,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para o DZP-d5) e a outra amostra aquosa sintética não foi fortificada.

Figura 18 - Cromatograma, no modo TIC, para o DZP comprovando a seletividade



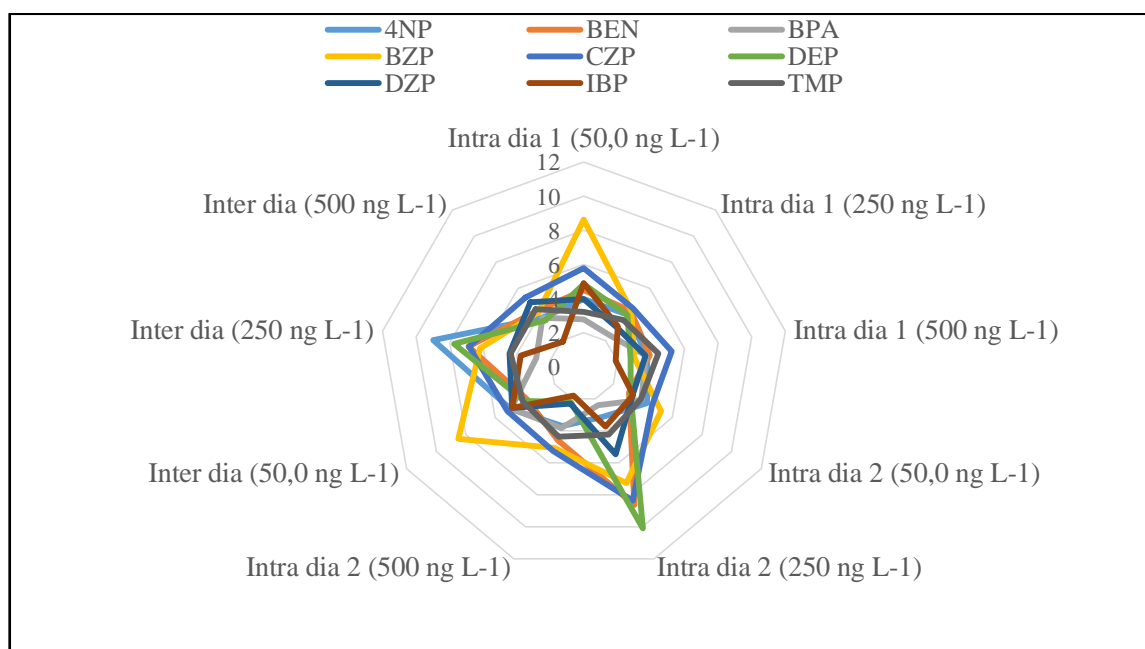
Fonte: Autor

Como pode ser visto na Figura 18 (apenas para o caso do DZP), quando foi comparado as duas amostras aquosas sintéticas, não foi observado a presença de sinais na amostra aquosa sintética não fortificada que apresentasse o mesmo tempo de retenção dos analitos na amostra aquosa sintética fortificada. Assim, foi observada que a metodologia analítica desenvolvida apresentou seletividade para todos os analitos. Para os demais analitos, ver Apêndice A.

4.4.1.2 Precisão (repetitividade), precisão intermediária e exatidão

Conforme descrito nos itens 3.3.4.2 e 3.3.4.3, foram preparadas 30 amostras aquosas sintéticas, nos seguintes níveis de concentração (em ng L^{-1}): 50,0, 250 e 500 para todos os analitos. As Figuras 19 e 20 apresentam os valores obtidos para a precisão (repetitividade), precisão intermediária e exatidão (recuperação) do método proposta para três níveis de concentração diferentes para cada analito (baixo, médio e alto). Todos os níveis de concentração (baixo, médio e alto) foram preparados em cinco replicatas verdadeiras e três replicatas falsas.

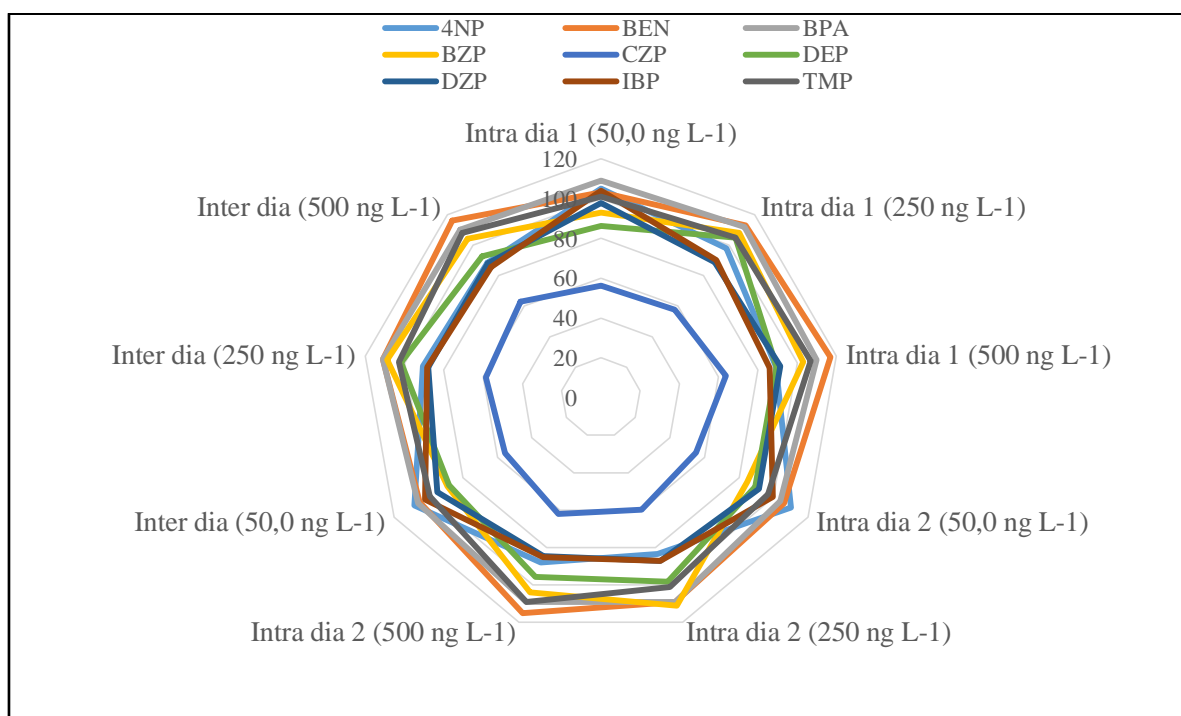
Figura 19 - Precisão (repetitividade) e precisão intermediária da metodologia



Fonte: Autor

Como pode ser visto na Figura 19, a precisão (repetitividade) e a precisão intermediária da metodologia analítica desenvolvida foi inferior a 10,5%. Os valores relacionados com a precisão da metodologia variaram entre 1,81% e 10,1% para IBP e DEP respectivamente. O guia utilizado para a validação da metodologia (USEPA 8000D) preconiza valores de precisão inferiores a 20% (USEPA, 2018).

Figura 20 - Exatidão (recuperação) da metodologia



Fonte: Autor

Com relação a Figura 20, a metodologia analítica desenvolvida apresentou valores de exatidão superiores a 80% para todos os analitos, exceto o CZP que apresentou valor de exatidão superior a 55,1%. Os valores relacionados com a exatidão da metodologia analítica variaram entre 55% e 117% para CZP e BEN respectivamente. O guia utilizado para a validação da metodologia (USEPA 8000D) preconiza valores de exatidão entre 70% e 130% (USEPA, 2018). No entanto, dependendo da complexidade analítica e também complexidade da amostra, a faixa de aceitação para a exatidão da metodologia analítica pode ser de 50% a 130% (USEPA, 2018; RIBANI *et al.*, 2004). Segundo Gros e colaboradores, quando outros parâmetros de desempenho da validação, tais como LQ, LD e precisão, por exemplo, estiverem dentro do intervalo preconizado pelo método de

validação, os analitos com valores de exatidão/recuperação fora da faixa preconizado pelos métodos de validação podem ser quantificados (GROS; PETROVIC; BARCELÓ, 2007).

Os valores encontrado para os ensaios de precisão (repetitividade) e exatidão (recuperação) demonstram semelhança quando se compara com valores disponíveis na literatura (CHANG *et al.*, 2018; CUNHA *et al.*, 2015; HUERTA-FONTELA; GALCERAN; VENTURA, 2010; LI *et al.*, 2014; MARTÍNEZ BUENO *et al.*, 2007; MARTÍNEZ BUENO *et al.*, 2010)

4.4.1.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Os valores de LD e LQ para os analitos selecionados neste trabalho são apresentados na Tabela 17.

Tabela 18 - LD e LQ do método desenvolvido

Analitos	LD (ng L⁻¹)	± DP*	LQ (ng L⁻¹)	± DP*
PPCPs				
BEN	8,13	0,0218	10,0	4,80
BZP	1,93	0,0054	10,0	5,81
CZP	1,24	0,0234	10,0	5,67
DZP	0,844	0,0053	10,0	3,99
IBP	10,3	0,0285	50,0	3,26
TMP	0,918	0,00023	10,0	4,06
EDs				
4NP	1,54	0,0041	10,0	4,50
BPA	3,00	0,0087	50,0	3,38
DEP	7,14	0,0190	50,0	4,70

Legenda: * Desvio padrão (DP)

Fonte: Autor

Como apresentado na Tabela 17, os valores de LD para todos os analitos variaram entre 0,844 e 10,3 ng L⁻¹. Já os valores de LQ para todos os analitos ficaram entre 10,0 e 50,0 ng L⁻¹. Os valores obtidos na Tabela 17 mostram que os resultados são ora

semelhantes ora inferiores comparados com a mesma técnica instrumental (ARBELÁEZ *et al.*, 2015; AYMERICH *et al.*, 2016; BATT *et al.*, 2016; BRIEUDES *et al.*, 2016; CATALÁ *et al.*, 2015; KOSTICH; BATT; LAZORCHAK, 2014; NUNES *et al.*, 2015; VERGEYNST *et al.*, 2015).

Conforme descrito no item 2.4, a legislação brasileira não apresenta valor máximo permitido (VMP) para nenhum dos micropoluentes abordados nesse trabalho. Assumindo o VMP da Portaria nº 2914/2011 do di(2-etilhexil)-ftalato (DEHP) também para o DEP, admitindo os dois como plastificantes, pertencentes a classe dos ftalatos e também são EDs, o LQ para o DEP é abaixo do VMP de acordo com a Portaria nº 2914/2011. Já com relação a regulamentação internacional, descrito no mesmo item (2.4), a USEPA possui um documento (USEPA 816-F-09-004), que também dispõe sobre o DEHP. De acordo com o documento, o nível máximo permitido em água potável é de 600 ng L^{-1} . Fazendo a mesma linha de raciocínio feito com a Portaria 2914/2011, assumindo o VMP do DEHP para o DEP, o LQ para o DEP é abaixo do VMP junto ao documento USEPA 816-F-09-004.

Com relação ao outro documento da mesma agência (USEPA-822-R-05-005), que dispõe sobre os critérios de qualidade da água para a vida aquática, com relação ao contaminante 4NP. Segundo este documento, a recomendação de concentração máxima de 4NP para água doce, é $2,80 \times 10^4 \text{ ng L}^{-1}$. Observando a Tabela 17, observa-se que o LQ do 4NP é inferior ao valor recomendado para água doce. Assim, dentro dos valores regulamentares ou recomendados encontrados nas legislações, os LQs para o método desenvolvido são inferiores aos VMP ou valores recomendados, fazendo com que a metodologia possa ser empregada para controle de possíveis contaminações pelos micropoluentes estudados.

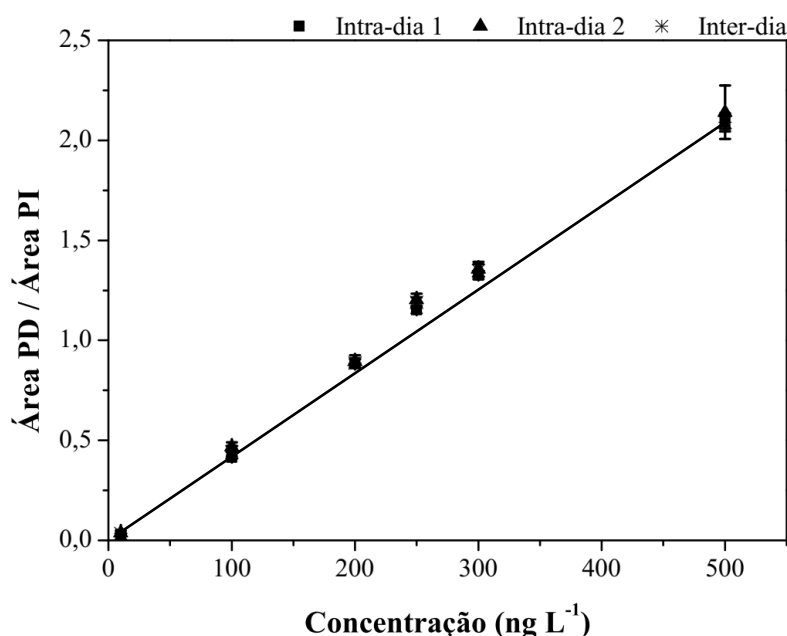
4.4.1.4 Linearidade

Para a avaliação da linearidade do método desenvolvido, foram preparadas seis amostras aquosas sintéticas com diferentes níveis de concentração como mostrada na Tabela 12, no item 3.3.4.4. Todas as curvas analíticas foram construídas a partir do LQ de cada analito e como último nível de concentração 500 ng L^{-1} , sempre garantindo que todas as curvas apresentassem seis níveis de concentração. Vale ressaltar, que todos os níveis de

concentração, continham o DZP-d5 no nível de concentração de 250 ng L⁻¹. Os parâmetros avaliados na linearidade das curvas analíticas de cada analito são mostrado na Tabela 19.

Na Tabela 18, o parâmetro **a** refere-se ao coeficiente angular e o erro padrão no coeficiente angular é dado por δa . O parâmetro **b** refere-se ao coeficiente linear e o erro padrão no coeficiente linear é dado por δb . Os coeficientes lineares, não nulos, introduzem tendência na linearidade. A curva analítica que contém coeficiente linear positivo, este acarreta um erro positivo na quantificação, enquanto curvas analíticas com coeficiente linear negativo acarreta um erro negativo na quantificação. As curvas analíticas (intra-dia 1, intra-dia 2 e inter dia) para o TMP são apresentadas na Figura 21. As curvas analíticas para os demais analitos, podem ser vistas no Apêndice B.

Figura 21 - Curvas analíticas (Intra-dia 1, Intra-dia 2 e Inter-dia) para o TMP



Fonte: Autor

Os coeficientes de regressão (r e R^2) estão em acordo dos valores descritos pelo guia USEPA 8000D ($r > 0,995$ e $R^2 > 0,990$). Com relação ao r , o valor variou entre 0,995 e 0,999 enquanto que o R^2 variou entre 0,990 e 0,997, ambos na mesma faixa de concentração, variando entre LQ e 500 ng L⁻¹. Dessa forma, sugere-se excelente correlação e linearidade, com baixos valores de erro padrão, indicando que o modelo de regressão linear é adequado para as determinações analíticas em estudo. Os valores dos coeficientes de regressão (r e R^2), bem como a faixa de concentração da curva analítica foram

comparadas com dados da literatura e os resultados são semelhantes aos valores encontrados na literatura (FARAJZADEH; MOGADDAM, 2012; GAFFNEY *et al.*, 2014; PETRIE *et al.*, 2015; ROSSMANN *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2017).

Tabela 19 - Parâmetros avaliados na linearidade para os micropoluentes aqui abordados

Parâmetro	4NP			BEN			BPA			BZP			CZP		
	Intra-dia		Inter-dia	Intra-dia		Inter-dia	Intra-dia		Inter-dia	Intra-dia		Inter-dia	Intra-dia		Inter-dia
	1	2		1	2		1	2		1	2		1	2	
a	0,0796	0,0905	0,0870	1,15	1,23	1,19	0,0432	0,0374	0,0415	0,695	0,789	0,812	3,42	3,24	3,33
δa	1,98x10 ⁻³	1,84x10 ⁻³	8,55x10 ⁻⁴	0,0298	0,0362	0,0247	1,03x10 ⁻³	8,88x10 ⁻⁴	6,96x10 ⁻⁴	0,0125	0,0156	7,19x10 ⁻³	0,082	0,046	0,0473
b	7,60x10 ⁻³	-1,90x10 ⁻⁴	2,38x10 ⁻⁴	0,0491	0,0410	0,0455	-5,00x10 ⁻⁴	1,59x10 ⁻³	3,52x10 ⁻⁴	8,69x10 ⁻³	0,0108	8,88x10 ⁻³	0,0239	0,0174	0,0218
δb	5,04x10 ⁻⁴	4,53x10 ⁻⁴	2,14x10 ⁻⁴	8,32x10 ⁻³	0,0101	6,69x10 ⁻³	2,93x10 ⁻⁴	2,50x10 ⁻⁴	1,94x10 ⁻⁴	3,16x10 ⁻³	3,97x10 ⁻³	1,80x10 ⁻³	0,0191	0,012	0,0114
R ²	0,991	0,993	0,997	0,992	0,990	0,990	0,991	0,992	0,990	0,995	0,994	0,997	0,992	0,997	0,993
r	0,995	0,997	0,999	0,996	0,995	0,995	0,996	0,996	0,995	0,998	0,997	0,999	0,996	0,998	0,997
er. padrão*	1,32x10 ⁻³	1,27x10 ⁻³	8,23x10 ⁻⁴	0,0173	0,0210	0,0205	6,11x10 ⁻³	5,22x10 ⁻⁴	5,97x10 ⁻⁴	8,34x10 ⁻³	0,0104	6,93x10 ⁻³	0,048	0,031	0,0456

Tabela 18 (Cont) - Parâmetros avaliados na linearidade para os micropoluentes aqui abordados

Parâmetro	DEP			DZP			IBP			TMP		
	Intra-dia		Inter-dia	Intra-dia		Inter-dia	Intra-dia		Inter-dia	Intra-dia		Inter-dia
	1	2		1	2		1	2		1	2	
a	2,27	2,64	2,56	4,16	4,11	4,14	0,0273	0,0337	0,0346	4,22	4,32	4,26
δa	0,0604	0,0591	0,0295	0,111	0,068	0,0584	6,64x10 ⁻⁴	6,43x10 ⁻⁴	3,79x10 ⁻⁴	0,0963	0,110	0,0619
b	0,336	0,303	0,329	0,0135	0,0335	0,0216	1,20x10 ⁻⁴	2,64x10 ⁻⁵	-1,40x10 ⁻⁴	-0,0405	0,0263	0,0183
δb	0,0159	0,0167	8,23x10 ⁻³	0,0291	0,017	0,0146	1,86x10 ⁻⁴	1,80x10 ⁻⁴	1,04x10 ⁻⁴	0,0252	0,0280	0,0155
R ²	0,990	0,993	0,995	0,990	0,996	0,993	0,993	0,996	0,997	0,993	0,990	0,993
r	0,995	0,996	0,998	0,995	0,998	0,997	0,996	0,998	0,999	0,996	0,995	0,997
er. padrão*	0,0319	0,0349	0,0253	0,0713	0,045	0,0563	3,86x10 ⁻⁴	3,74x10 ⁻⁴	3,19x10 ⁻⁴	0,0617	0,0738	0,0596

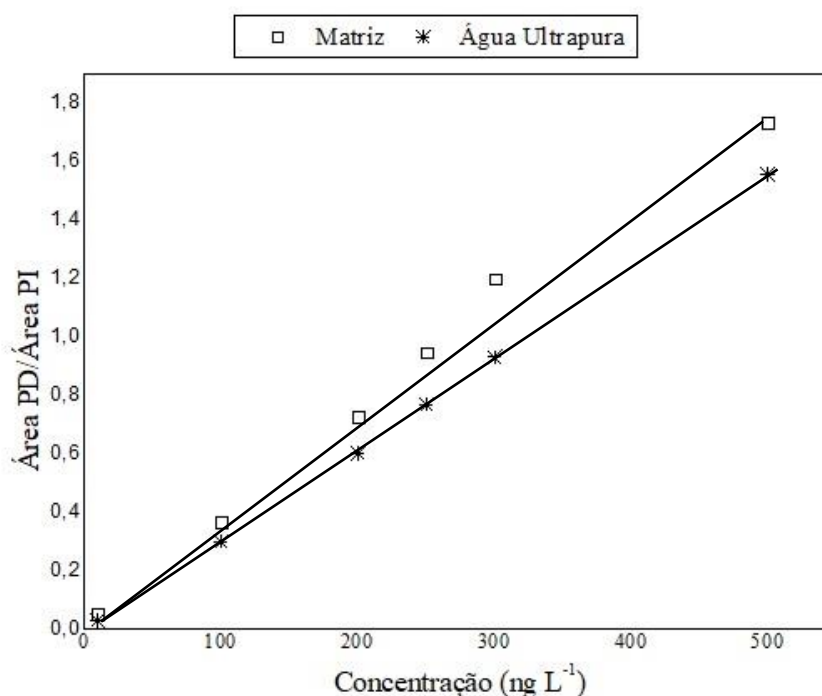
Legenda: a - coeficiente angular; δa - erro padrão no coeficiente angular; b - coeficiente linear; δb - erro padrão no coeficiente linear; er padrão - erro padrão

Fonte: Autor

4.4.1.5 Efeito de matriz

Assim como descrito no item 3.3.3.7, houve a avaliação do efeito da matriz (água superficial) na resposta instrumental para cada analito analisado neste trabalho. Para tal, houve o preparo de duas curvas analítica para cada analito, a fim de se verificar se as curvas apresentaram diferença significativas entre elas, permitindo assim atribuir a presença ou não de efeito de matriz. Além das amostras aquosas sintéticas preparadas para o ensaio de linearidade, foi preparado outra curva analítica, com os mesmos níveis de concentração, porém utilizando H₂O ultrapura como solvente. As curvas analíticas das amostras aquosas sintéticas (água superficial e água ultrapura) para o CZP são mostrados na Figura 22. As curvas analíticas para os demais analitos estão no Apêndice C. Vale ressaltar, que todos os níveis de concentração das duas curvas analíticas continham o PI no nível de concentração de 250 ng L⁻¹.

Figura 22 - Curvas analíticas das amostras aquosas sintéticas para o CZP



Fonte: Autor

Os parâmetros das duas curvas analíticas de cada analito são mostrados na Tabela 19.

Tabela 20 - Parâmetros das curvas analíticas das amostras aquosas sintéticas

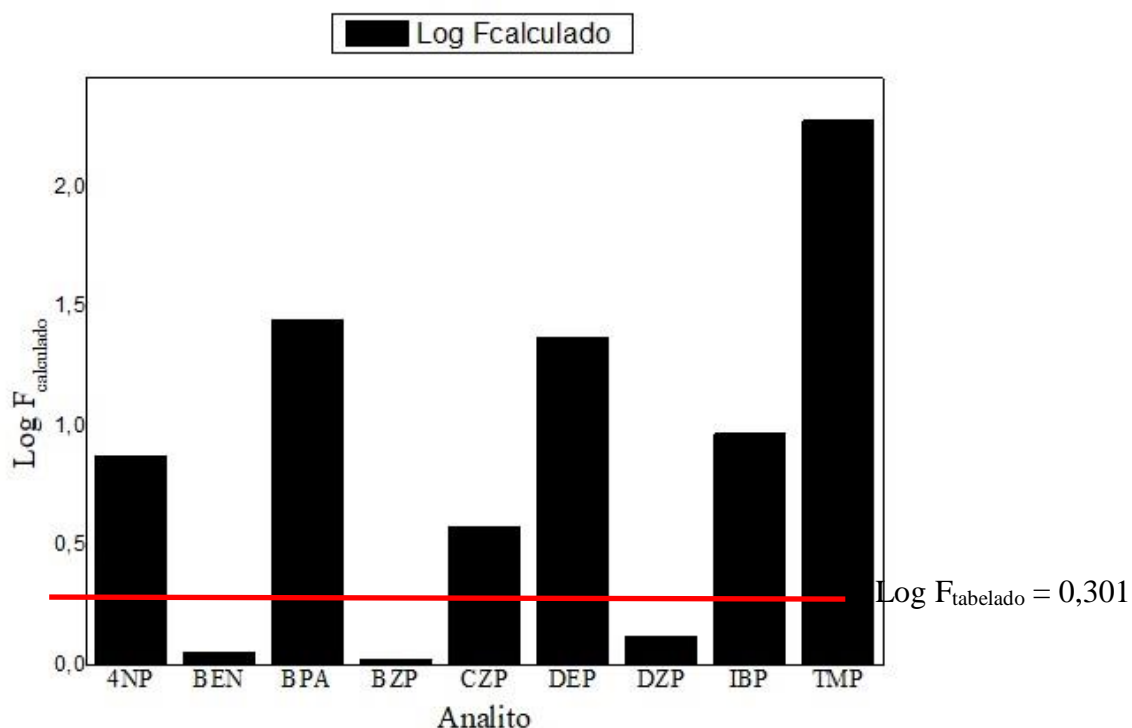
Analito	Matriz			H ₂ O ultrapura		
	a	b	R ²	a	b	R ²
4NP	0,0910	1,63x10 ⁻⁴	0,996	0,0247	8,70x10 ⁻⁵	0,993
BEN	1,04	0,0291	0,997	0,559	0,0175	0,997
BPA	0,0447	-9,00x10 ⁻⁴	0,995	0,0161	9,46x10 ⁻⁴	0,990
BZP	0,706	2,50x10 ⁻³	0,992	1,71	-8,49x10 ⁻³	0,997
CZP	3,46	0,0413	0,997	3,12	-7,73x10 ⁻³	0,996
DEP	2,43	0,304	0,992	0,836	0,0711	0,990
DZP	4,27	1,73x10 ⁻³	0,998	4,11	-1,86x10 ⁻³	0,997
IBP	0,0276	1,55x10 ⁻⁴	0,993	0,0394	-3,40x10 ⁻⁴	0,993
TMP	4,17	-0,0284	0,992	0,416	-3,00x10 ⁻⁴	0,998

Fonte: Autor

As interpretações dos parâmetros descritos na Tabela 19 são os mesmos descritos no item 4.4.1.4. Segundo o guia de validação USEPA 8000D, um desvio igual ou superior a 30% entre os coeficientes angulares, sugere a existência de efeito de matriz (USEPA, 2018). Assim, avaliando os resultados obtidos, os únicos analitos que não apresentaram efeito de matriz, baseando-se no coeficiente angular, foi o CZP, DZP e IBP. Os demais analitos apresentaram desvio entre os coeficientes angulares superior a 30%, evidenciando o efeito de matriz. Ainda na Tabela 20, pode ser observado que para alguns analitos, coeficientes angulares e lineares se apresentam diferentes quando é feita a comparação das duas curvas analíticas. Mesmo com a ausência do efeito de matriz para alguns analitos, como por exemplo, o CZP, no ato da quantificação das amostras, as concentrações quantificadas apresentavam diferenças superiores a 30% em função da curva analítica utilizada (matriz ou H₂O ultrapura).

Dessa forma, foi avaliado outra maneira de avaliação do efeito de matriz que não ficasse baseado apenas nos coeficientes angulares das curvas analíticas. Conforme descrito no item 3.3.4.7, para a avaliação do efeito de matriz foi utilizado o teste F, a fim de se verificar se as curvas apresentavam ou não alguma diferença significativa para um determinado nível de confiança. O valor de $\log F_{\text{calculado}}$ é comparado com o valor de $\log F_{\text{tabelado}}$, levando-se em conta o grau de liberdade. Valores de $\log F_{\text{calculados}}$ acima do valor do $\log F_{\text{tabelado}}$, indicam que as curvas analíticas apresentam diferença significativa dentre de um nível de confiança de 95%. Os resultados dos valores de $\log F_{\text{calculado}}$ para cada analito são apresentados na Figura 23.

Figura 23 - Teste F para avaliação do efeito de matriz



Fonte: Autor

Como pode ser visto pela Figura 23, os analitos 4NP, BPA, CZP, DEP, IBP e TMP apresentam $\log F_{\text{calculado}}$ superior ao $\log F_{\text{tabelado}}$ (0,301), evidenciando o efeito de matriz, como também foi observado na literatura (ANDREU *et al.*, 2016; BOIX *et al.*, 2015; CAMILLERI *et al.*, 2015; COMTOIS-MAROTTE *et al.*, 2017; ARAUJO *et al.*, 2019; GROS; PETROVIC, 2009). Quando se observa apenas os coeficientes angulares, descrito na Tabela 19, foi observado algumas diferenças no comportamento referente ao efeito de matriz. Conforme ilustra a Figura 22, o CZP, apresenta uma diferença entre os coeficientes angulares das duas curvas analíticas (matriz e água ultrapura) inferior a 30%, não apresentando assim efeito de matriz, conforme preconiza o guia USEPA 8000D (USEPA, 2018). No entanto, quando se observa a Figura 23, referente a avaliação do efeito de matriz via teste F, pode-se observar que $\log F_{\text{calculado}}$ para o CZP foi superior ao $\log F_{\text{tabelado}}$, indicando que os grupos de dados dos fatores de calibração das curvas analíticas do CZP apresentam diferença entre si, evidenciando assim o efeito de matriz para o CZP, com 95% de nível de confiança. Um comportamento antagônico pode ser visto pelo BZP, onde via coeficiente angular das duas curvas analíticas, há efeito de matriz (diferença entre os coeficientes superior a 30%) e via teste F dos F_c foi observado que não há diferença entre os grupos de dados dos fatores de calibração entre as duas curvas analíticas, não apresentando assim o efeito de matriz.

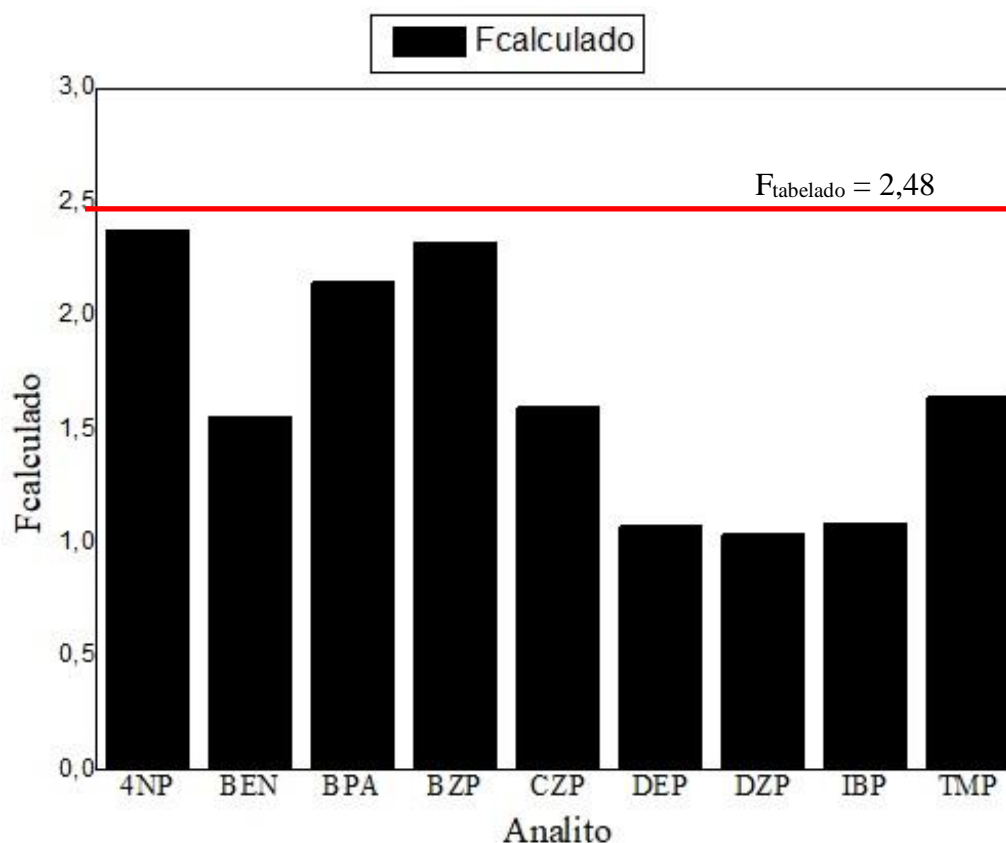
Como descrito anteriormente, foi adotado o teste F como método avaliativo para o efeito de matriz. Assim, como houve a influência da matriz na determinação de alguns analitos, adotou-se a utilização da curva analítica preparada com as amostras aquosas sintéticas como solvente para a determinação de todos os analitos, visando a minimização de erros para a quantificação, uma vez que a utilização da curva analítica com as amostras aquosas sintéticas com H₂O ultrapura como solvente pode ocasionar quantificações errôneas, para mais ou para menos, dependendo do analito.

4.4.1.6 Robustez

A robustez do método analítico desenvolvido foi avaliada por meio de um ensaio conforme descrito no item 3.3.3.8. Para avaliação da robustez do método desenvolvido, foi aproveitado os resultados de linearidade inter-dia (conforme descrito no item 4.4.1.4.) e aproveitando-se das amostras aquosas sintéticas utilizadas no ensaio de linearidade, foi preparada outra curva analítica para cada analito, no entanto com alguma alteração no método desenvolvido. O método analítico desenvolvido originalmente, apresentava um fluxo de fase móvel na taxa de 400 $\mu\text{L min}^{-1}$. Para a avaliação da robustez, alterou-se o fluxo da fase móvel para uma taxa de 300. $\mu\text{L min}^{-1}$. A Figura 24 ilustra os resultados referentes a robustez do método desenvolvido.

Como pode ser visto pela Figura 24, para todos os analitos, os valores de $F_{\text{calculado}}$ dos F_c das duas curvas analíticas (condição de fluxo da fase móvel original e condição de fluxo da fase móvel alterado) apresentaram-se inferiores ao valor de F_{tabelado} (2,48), indicando que as curvas analíticas não apresentaram diferença significativa, admitindo-se 95% de nível de confiança. Assim, a alteração no fluxo da fase móvel do método analítico desenvolvido não causou nenhum efeito significativo, levando a confirmação de que o método desenvolvido foi robusto.

Figura 24 - Análise da robustez do método analítico desenvolvido



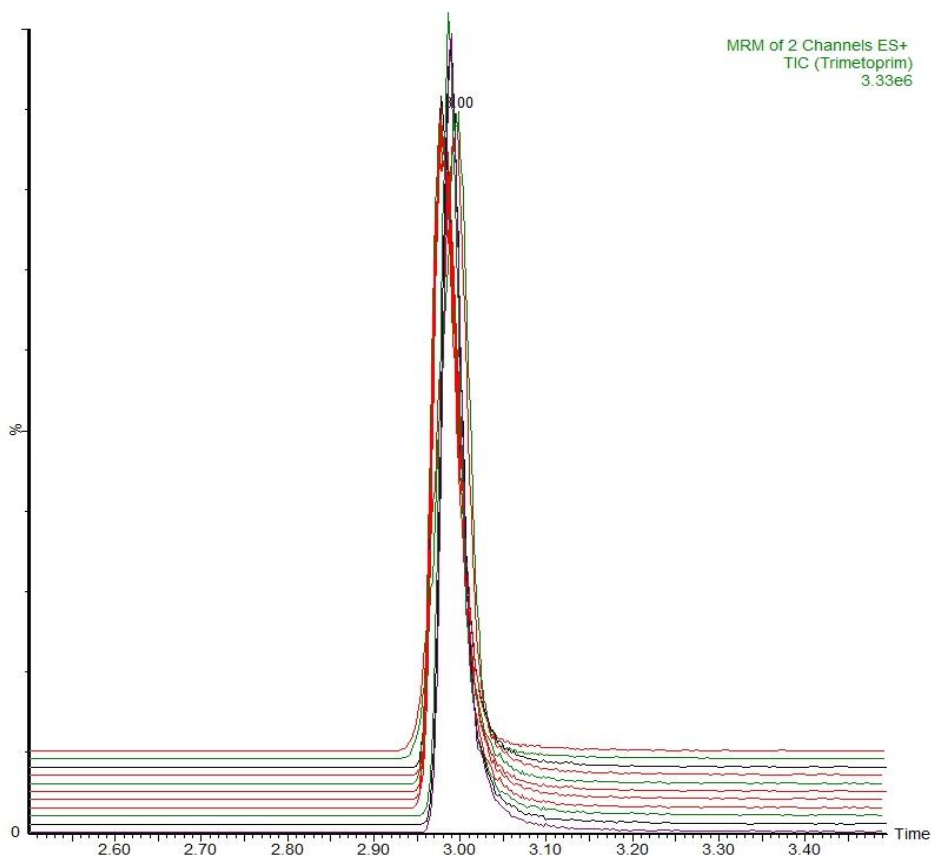
Fonte: Autor

4.4.2 Garantia da qualidade do ensaio

Visando uma garantia da qualidade dos resultados de quantificação das amostras de água superficial coletadas nos pontos amostrais, foram realizados dois ensaios de garantia da validade de cada curva analítica para cada analito durante os meses de coleta das amostras. As amostras aquosas sintéticas utilizadas no item 4.4.1.4. foram armazenados em geladeira para a utilização nos dois ensaios realizados. Um dos ensaios de garantia da validade das curvas analíticas, foi realizado com a injeção mensal de uma amostra aquosa sintética que havia sido armazenada em geladeira, com o nível de concentração de 250 ng L^{-1} . Dessa forma, foi possível verificar se os sinais de cada analito apresentaram alguma diferença durante os 30 dias armazenados em geladeira, indicando assim, alguma degradação das amostras aquosas sintéticas ou algum problema instrumental (sujidades do detector por exemplo). Vale destacar que foram avaliados o tempo de retenção, intensidade dos sinais e área do sinal. Para qualquer

um dos três itens avaliados, o limite de aceitação da variação foi 20%. A Figura 25 ilustra a amostra aquosa sintética injetada em todos os meses de coleta para o TMP. Para os demais analitos, os resultados das injeções das amostras aquosas sintéticas podem ser vistos no Apêndice D.

Figura 25 - Cromatograma, no modo TIC, para TMP, avaliando a validade das amostras



Legenda: Tempo (time) em minutos; injeção das amostras aquosas sintéticas durante 12 meses

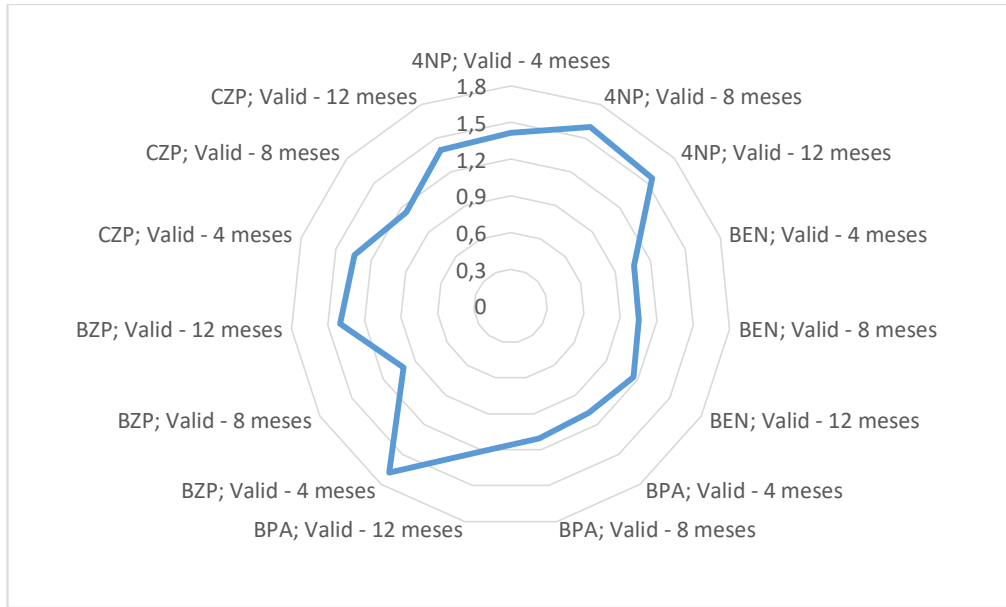
Fonte: Autor

Como pode ser visto pela Figura 25, não houve grande variação das áreas dos picos de cada analito durante os 12 meses de armazenamento das soluções aquosas sintéticas, evidenciando a estabilidade da solução durante esse período.

O outro ensaio realizado para a garantia da validade, foi realizado em períodos de 4 em 4 meses. Foi feita a injeção de todas as amostras aquosas sintéticas armazenadas, produzindo assim, novas curvas analíticas para cada analito, 4, 8 e 12 meses após serem armazenadas em geladeira. Dessa forma, foi possível verificar, via teste F, para comprovação

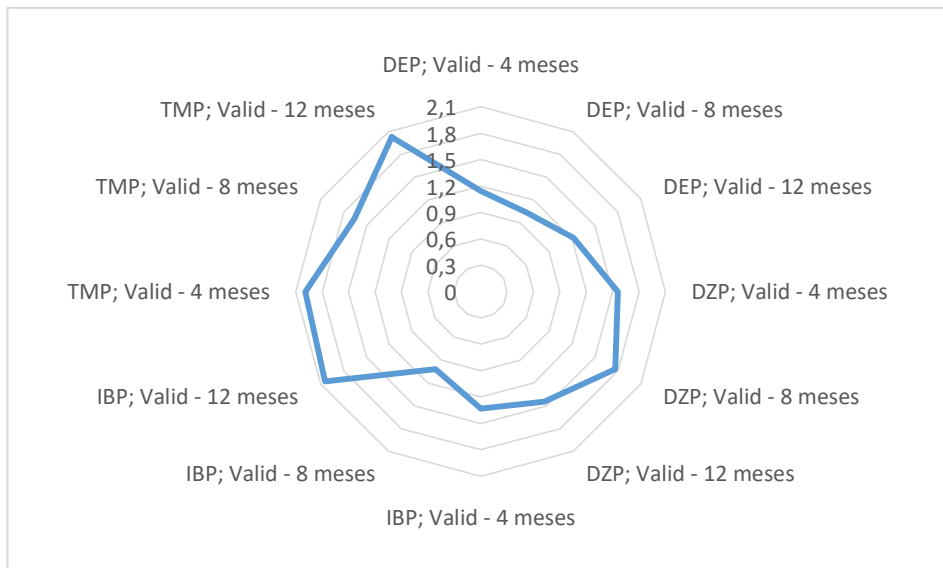
se as curvas analíticas apresentaram diferença significativa. As Figuras 26 e 27 ilustram as comparações entre as curvas analíticas em função do tempo de armazenamento em geladeira.

Figura 26 - Validade da curva analítica para 4NP, BEN, BPA, BZP e CZP



Fonte: Autor

Figura 27 - Validade da curva analítica para DEP, DZP, IBP e TMP



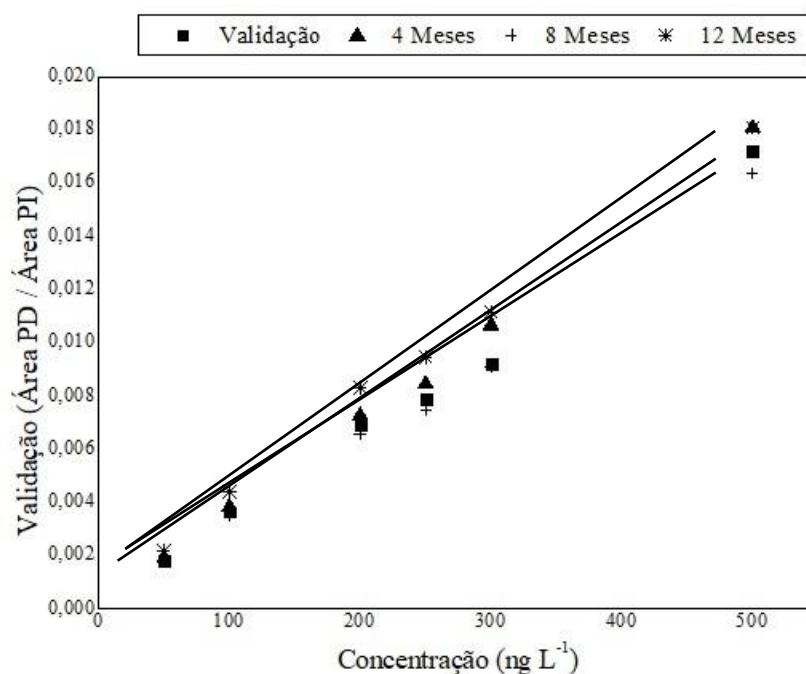
Fonte: Autor

Como pode ser visto pelas Figuras 26 e 27, a curva analítica de cada analito se apresentou estável durante os 12 meses de armazenamento, uma vez que todas as

combinações possíveis de comparação apresentaram valores de $F_{\text{calculado}}$ inferiores ao valor de F_{tabelado} (2,19).

As curvas analíticas da validação, após 4 meses, após 8 meses e após 12 meses a validação para o IBP são apresentadas na Figura 28. As demais curvas analíticas estão no Apêndice E.

Figura 28 - Comparação entre as três curvas analíticas para o IBP



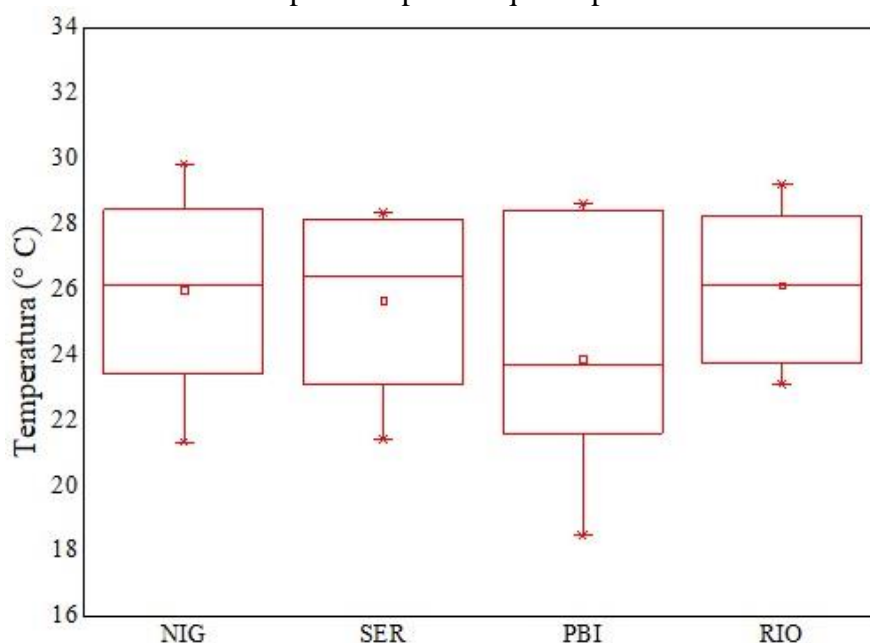
Fonte: Autor

Como pode ser visto pela Figura 28 e também pelo Apêndice E, não houve grande variações entre as curvas analíticas independente do tempo de armazenamento, indicando que as amostras aquosas sintéticas apresentam validade de pelo menos 12 meses. Dessa forma, as curvas analíticas preparadas no ensaio de validação foram ser utilizadas para fins de quantificação dos analitos em amostras reais, uma vez que as curvas de todos os analitos apresentam estabilidade durante o período de coleta e quantificação das amostras.

4.5 Aplicação da metodologia analítica desenvolvida nas águas superficiais

O método analítico desenvolvido e validado foi aplicado na análise de amostras de águas superficiais provenientes da bacia do rio Guandu. O método foi capaz de determinar os nove micropoluentes nas amostras coletadas nas cidades de Nova Iguaçu (NIG), Paracambi (PBI), Rio de Janeiro (RIO) e Seropédica (SER). Além da determinação dos micropoluentes, também foram analisados alguns parâmetros físico-químicos das amostras coletadas, tais como temperatura, pH, potencial redox (ORP), condutividade, turbidez, oxigênio dissolvido (OD) e sólidos totais dissolvidos. As propriedades físico-químicas das amostras coletadas podem ser vistas nas Figuras 29 a 35.

Figura 29 - Monitoramento da temperatura para os quatro pontos amostrais



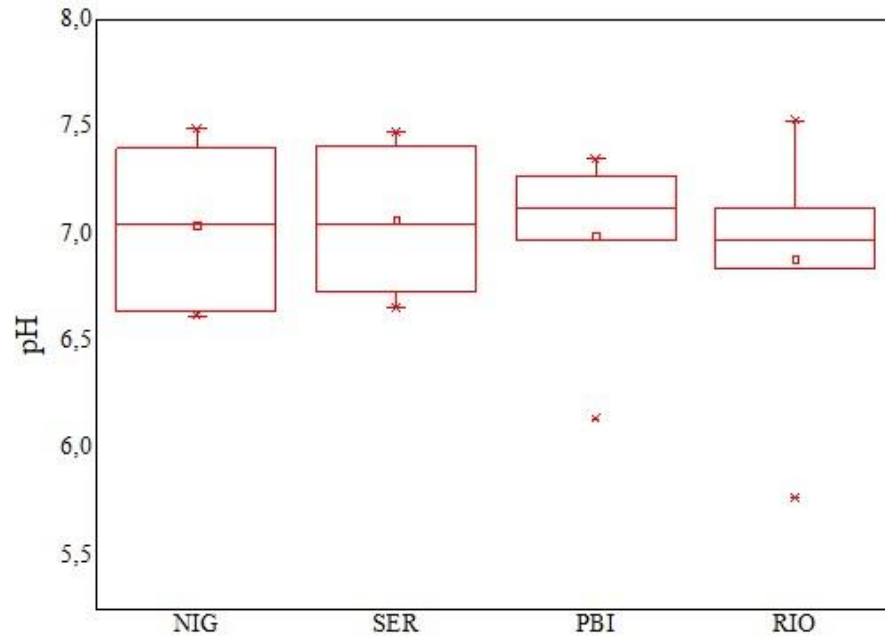
Legenda: Monitoramento entre abril/2018 e março/2019

Fonte: Autor

Como pode ser visto na Figura 29, a temperatura média foi de $26,0 \pm 3,08$ °C, $25,7 \pm 2,75$ °C, $23,9 \pm 3,63$ °C e $26,1 \pm 2,47$ °C respectivamente para NIG, SER, PBI e RIO. Já na Figura 30, o pH médio foi de $7,04 \pm 0,36$, $7,07 \pm 0,32$, $6,99 \pm 0,40$ e $6,89 \pm 0,54$ respectivamente para NIG, SER, PBI e RIO. Para todos os valores de temperatura e pH encontrados nas amostras de água superficiais coletadas nos quatro pontos amostrais, após a aplicação de análise estatística por meio do teste F, foi verificado que não há diferença

significativa ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}} - 4,28$) entre os grupos de dados relacionados com a temperatura e pH dos quatro pontos amostrais, admitindo um grau de confiança de 95%.

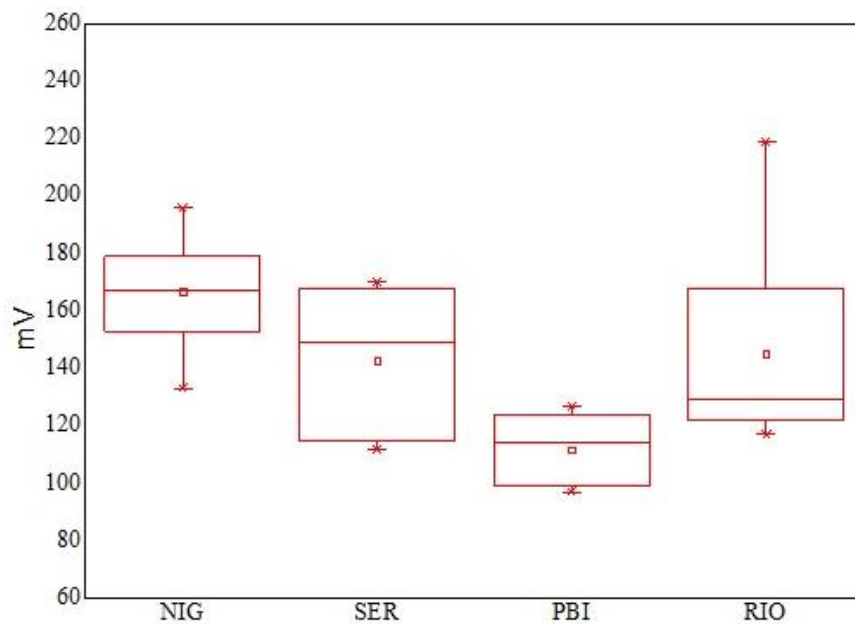
Figura 30 - Monitoramento do pH para os quatro pontos amostrais



Legenda: Monitoramento entre abril/2018 e março/2019

Fonte: Autor

Figura 31 - Monitoramento do ORP nos quatro pontos amostrais

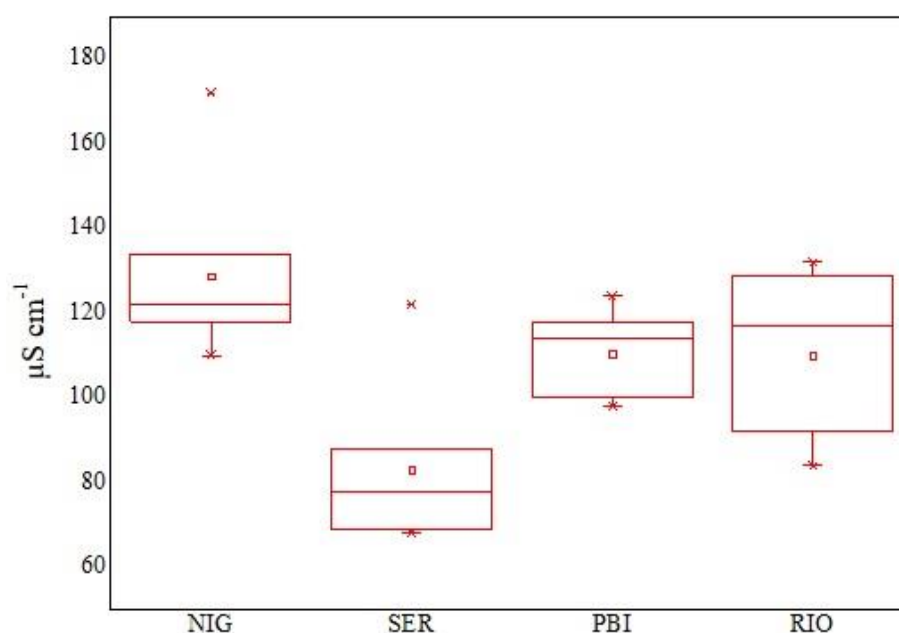


Legenda: Monitoramento entre abril/2018 e março/2019

Fonte: Autor

Como pode ser observado na Figura 31, o valor médio de ORP foi $1,66 \times 10^2 \pm 20,2$ mV, $1,42 \times 10^2 \pm 27,1$ mV, $1,11 \times 10^2 \pm 12,0$ mV e $1,45 \times 10^2 \pm 36,6$ mV respectivamente para NIG, SER, PBI e RIO. Com relação aos dados de ORP obtidos nos quatro pontos amostrais, após a utilização do teste F, foi possível observar que o grupo de dados de SER-PBI, bem como PBI-RIO apresentam diferença significativa ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}} - 4,28$), admitindo um grau de confiança de 95%. Vale destacar que, as demais combinações possíveis entre os pontos amostrais, mostrou que os grupos de dados de ORP não apresentam diferença significativa ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}} - 4,28$), admitindo um grau de confiança de 95%.

Figura 32 - Monitoramento da condutividade nos quatro pontos amostrais



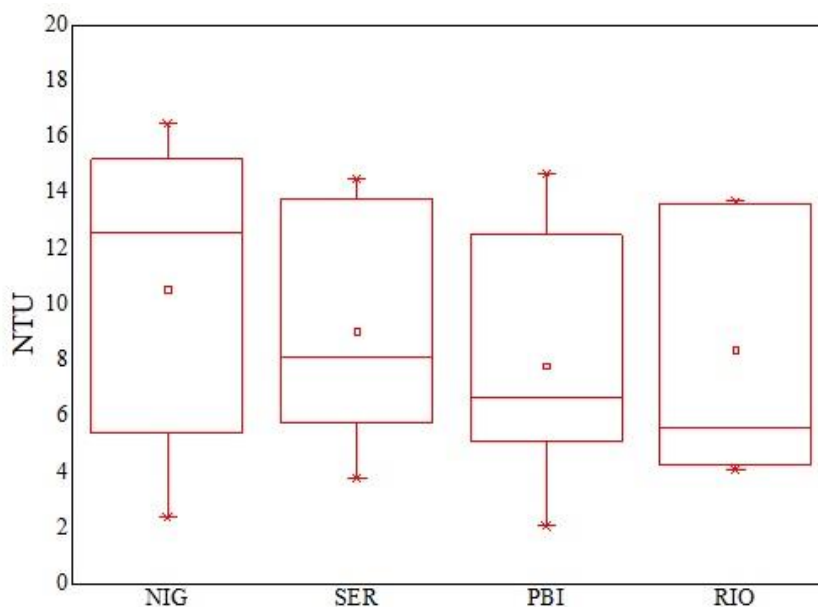
Legenda: Monitoramento entre abril/2018 e março/2019

Fonte: Autor

Como ilustrado na Figura 32, a condutividade média foi de $129 \pm 20,4$ $\mu\text{S cm}^{-1}$, $83,1 \pm 18,9$ $\mu\text{S cm}^{-1}$, $111 \pm 9,73$ $\mu\text{S cm}^{-1}$ e $110 \pm 19,0$ $\mu\text{S cm}^{-1}$ respectivamente para NIG, SER, PBI e RIO. Com relação aos dados de condutividade obtidos nos quatro pontos amostrais, após a utilização do teste F, foi possível observar que o grupo de dados de NIG-PBI apresentam diferença significativa ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}} - 4,28$), admitindo um grau de confiança de 95%. Ainda em tempo, as demais combinações possíveis entre os pontos amostrais, mostrou que os

grupos de dados de condutividade não apresentam diferença significativa ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}} - 4,28$), admitindo um grau de confiança de 95%.

Figura 33 - Monitoramento da turbidez dos quatro pontos amostrais



Legenda: Monitoramento entre abril/2018 e março/2019

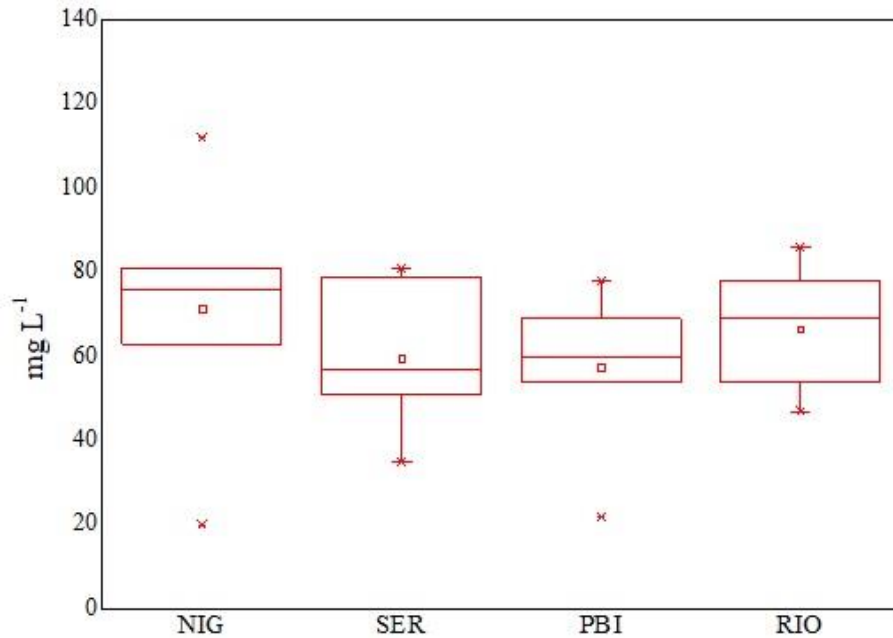
Fonte: Autor

Foi observado na Figura 33, a turbidez média foi de $10,6 \pm 5,25$ NTU, $9,07 \pm 3,99$ NTU, $7,83 \pm 4,43$ NTU e $8,39 \pm 4,58$ NTU respectivamente para NIG, SER, PBI e RIO. Com relação à Figura 34, a concentração média de sólidos totais dissolvidos foi $71,6 \pm 27,4$ mg L⁻¹, $59,6 \pm 16,1$ mg L⁻¹, $57,6 \pm 17,8$ mg L⁻¹ e $66,6 \pm 13,7$ mg L⁻¹ respectivamente para NIG, SER, PBI e RIO. Para todos os valores de condutividade e a quantidade de sólidos totais dissolvidos encontrados nas amostras de água superficiais coletadas nos quatro pontos amostrais, após a utilização do via teste F estatístico, consegue mostrar que não há diferença significativa ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}} - 4,28$) entre os grupos de dados dos quatro pontos amostrais, admitindo um grau de confiança de 95%.

Como foi observado na Figura 35, a concentração média de OD foi $6,50 \pm 2,13$ mg L⁻¹, $8,13 \pm 3,71$ mg L⁻¹, $6,54 \pm 0,799$ mg L⁻¹ e $5,57 \pm 2,22$ mg L⁻¹ respectivamente para NIG, SER, PBI e RIO. Com relação aos dados de concentração de OD nos quatro pontos amostrais, após a utilização do via teste F estatístico, foi possível observar que o grupo de dados de NIG-PBI, SER-PBI e PBI-RIO apresentam diferença significativa ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}} - 4,28$),

admitindo um grau de confiança de 95%. As demais combinações possíveis entre os pontos amostrais, não demonstrou diferença significativa, admitindo um grau de confiança de 95%.

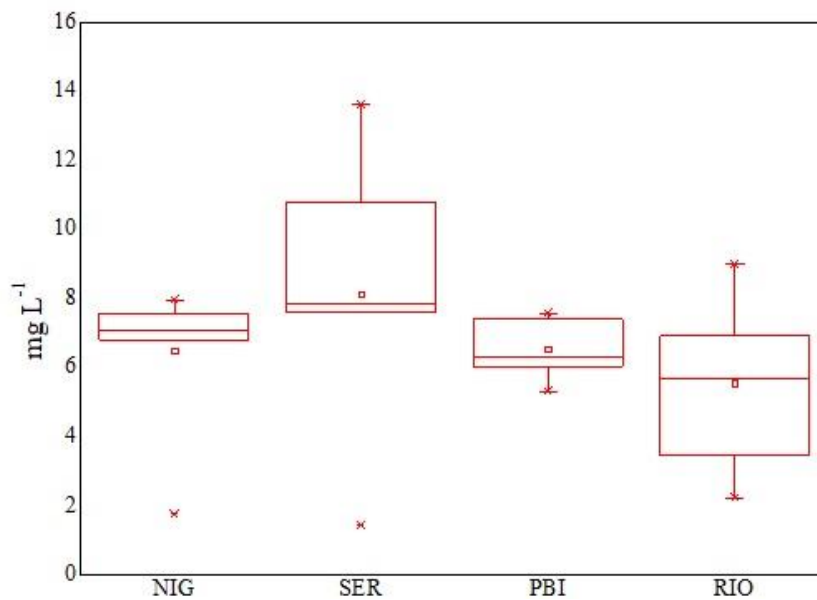
Figura 34 - Monitoramento do teor de sólidos totais dissolvidos nos quatro pontos amostrais



Legenda: Monitoramento entre abril/2018 e março/2019

Fonte: Autor

Figura 35 - Monitoramento da concentração de OD nos quatro pontos amostrais

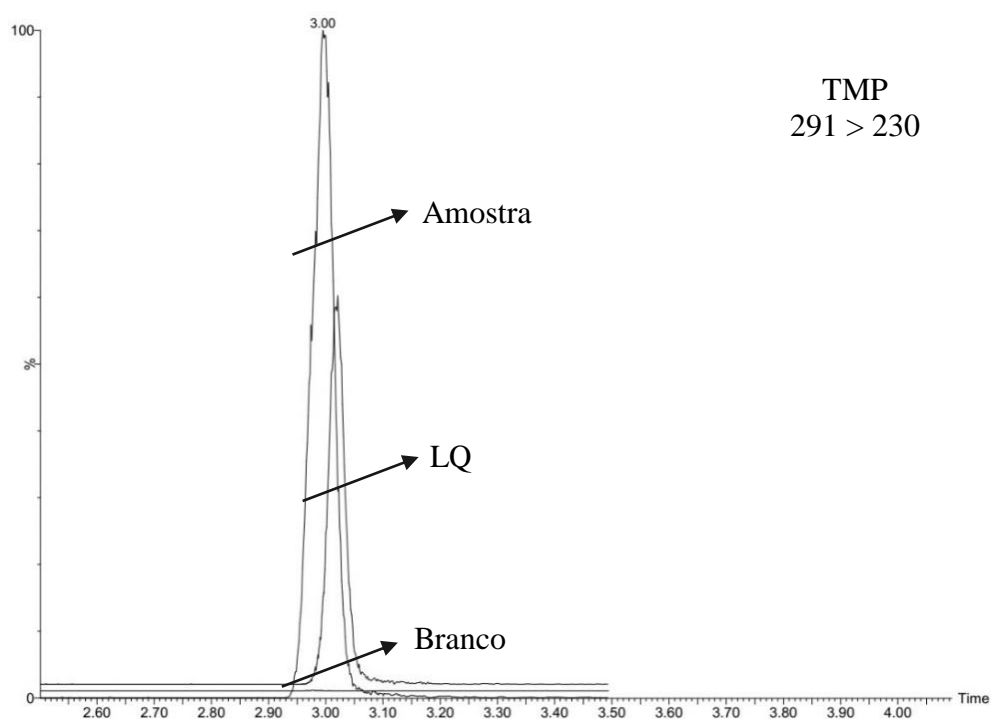


Legenda: Monitoramento entre abril/2018 e março/2019

Fonte: Autor

Para uma amostra de água superficial, coletada no em Nova Iguaçu que foi possível quantificar o TMP é apresentado na Figura 36. Como pode ser observado, o sinal referente a amostra apresenta intensidade superior a intensidade do nível de concentração do LQ do TMP. Outros exemplos onde foi possível quantificar outros analitos, pode ser observado no Apêndice F.

Figura 36 - Cromatogramas, no modo TIC, com quantificação do TMP



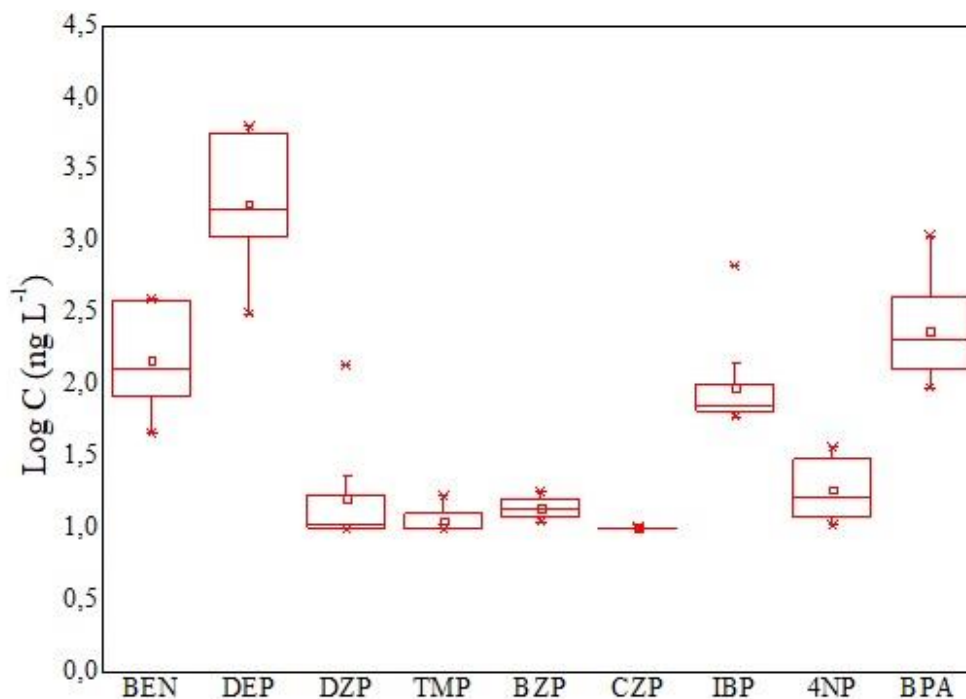
Legenda: Cromatograma obtido com as condições descritas na Tabela 16.

Fonte: Autor

Os dados referentes ao monitoramento dos quatro pontos amostrais durante os meses de abril/2018 e março/2019 são mostrados nas Figuras 37 a 40.

Para todas as amostras coletadas nos quatro pontos amostrais, em 100% das amostras foi possível identificar todos os analitos em todas as campanhas de coleta de amostras.

Figura 37 - Log C dos analitos das amostras coletadas em NIG

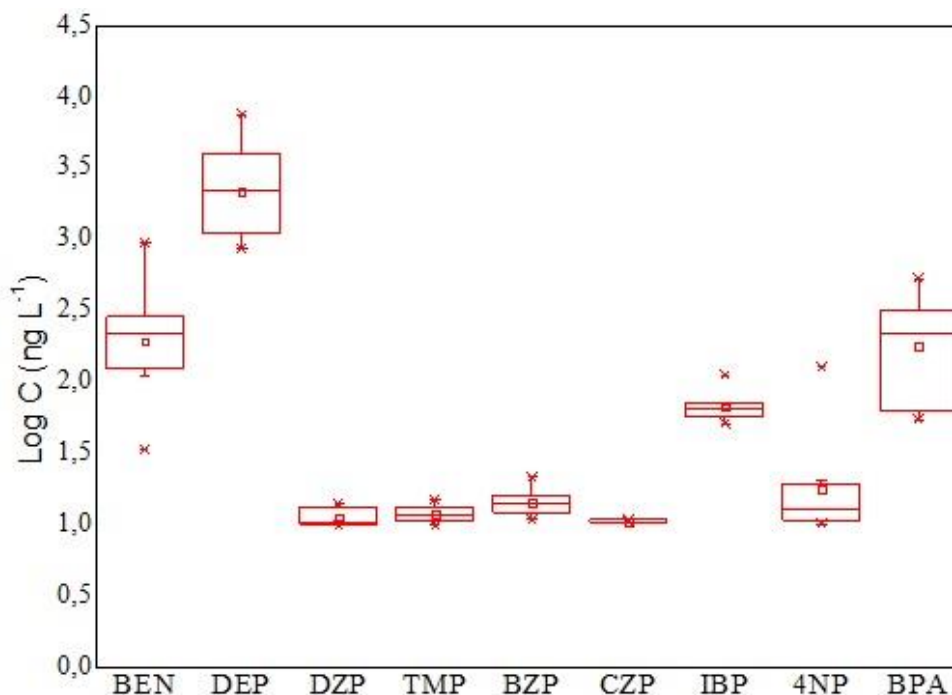


Legenda: Monitoramento entre abril/2018 e março/2019

Fonte: Autor

Para as amostras coletadas em NIG, como pode ser visto pela Figura 37, o DEP e o BPA foram quantificados em 100% das amostras coletadas neste ponto. A concentração do DEP variou entre $3,17 \times 10^2$ ($\log C = 2,50$) e $6,26 \times 10^3$ ng L^{-1} e ($\log C = 3,80$), enquanto que a concentração do BPA variou entre $95,7 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 2,38$) e $3,15 \times 10^2 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 2,64$). O IBP e a BEN foram quantificados respectivamente em 91% e 82% das amostras coletadas. A concentração média do BEN e da IBP nas amostras foi respectivamente $2,06 \times 10^2 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 2,18$) e $1,39 \times 10^2 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 1,98$). Por outro lado, o CZP foi o analito que foi quantificado em menor número de amostras de Nova Iguaçu. O CZP foi quantificado em apenas 27% das amostras coletadas (três amostras), com uma concentração média de $10,2 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 1,01$). Os valores médios para os outros analitos foi $28,4 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 1,21$) para DZP, $11,7 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 1,06$) para TMP, $14,2 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 1,15$) para BZP e $20,8 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 1,27$) para 4NP como pode ser visto na Figura 37.

Figura 38 - Log C dos analitos das amostras coletadas em SER



Legenda: Monitoramento entre abril/2018 e março/2019

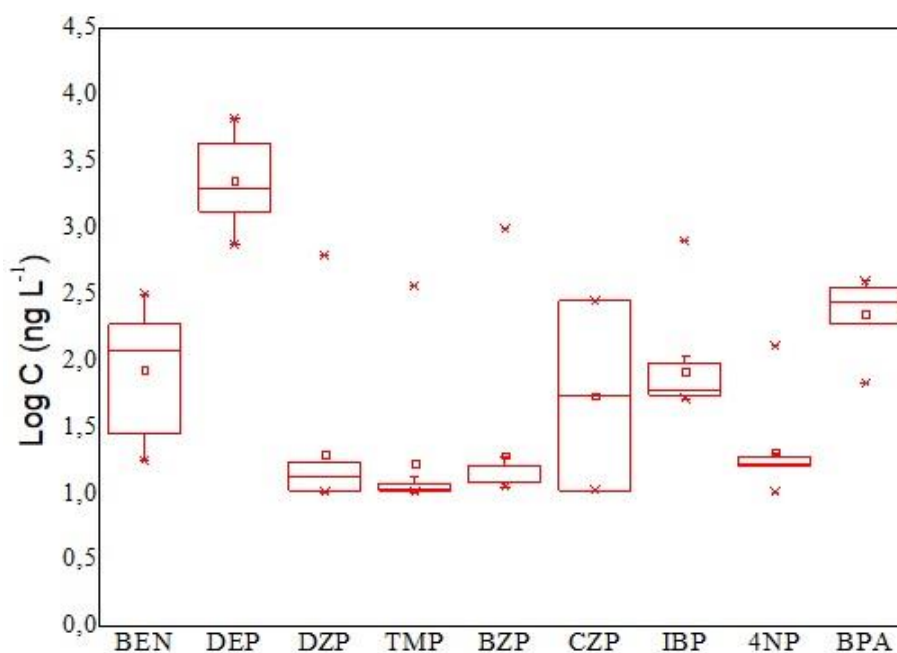
Fonte: Autor

Com relação às amostras coletadas em SER, o DEP, assim como o BPA foram quantificados em 100% das amostras coletadas em Seropédica. Conforme demonstrado na Figura 38, a concentração do DEP variou entre $8,80 \times 10^2 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 2,94$) e $4,91 \times 10^3 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 3,69$), enquanto que a concentração do BPA variou entre $55,4 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 1,74$) e $4,59 \times 10^2 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 2,66$). O BZP foi quantificado em 82% das amostras coletadas. A concentração média do BZP nas amostras foi de $14,8 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 1,16$). O analito que foi quantificado em menor percentual de amostras coletadas foi o CZP: 27% das amostras coletadas (três amostras), apresentando uma concentração média de $10,6 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 1,03$). Os valores médios para os outros analitos foi $2,82 \times 10^2 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 2,29$) para BEN, $11,6 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 1,06$) para DZP, $12,1 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 1,08$) para TMP, $68,9 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 1,83$) para IBP e $28,3 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 1,25$) para 4NP, como pode ser visto na Figura 38.

Para as amostras coletadas em PBI, o DEP e o BZP foram quantificados em 100% das amostras coletadas neste ponto. Como mostrado na Figura 39, a concentração do DEP variou entre $7,29 \times 10^2 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 2,86$) e $4,87 \times 10^3 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 3,69$), enquanto que a concentração do BZP variou entre $11,2 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 1,05$) e $9,73 \times 10^2 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 2,99$).

A BEN, o BPA e o IBP foram quantificados em 91% das amostras coletadas. A concentração média do BEN, BPA e do IBP nas amostras foi respectivamente $1,26 \times 10^2$ ng L⁻¹ (log C = 1,93), $2,57 \times 10^2$ ng L⁻¹ (log C = 2,35) e $1,39 \times 10^2$ ng L⁻¹ (log C = 1,92). Já o DZP foi quantificado em 82% das amostras, com uma concentração média de 80,4 ng L⁻¹ (log C = 1,30). O CZP foi o analito que foi quantificado em apenas 18,2% das amostras coletadas em PBI, apresentando assim uma concentração média de $1,47 \times 10^2$ ng L⁻¹ (log C = 1,74). Os valores médios para os outros analitos foi 54,6 ng L⁻¹ (log C = 1,23) para TMP e 30,5 ng L⁻¹ (log C = 1,32) para 4NP como pode ser visto na Figura 39.

Figura 39 - Log C dos analitos das amostras coletadas em PBI



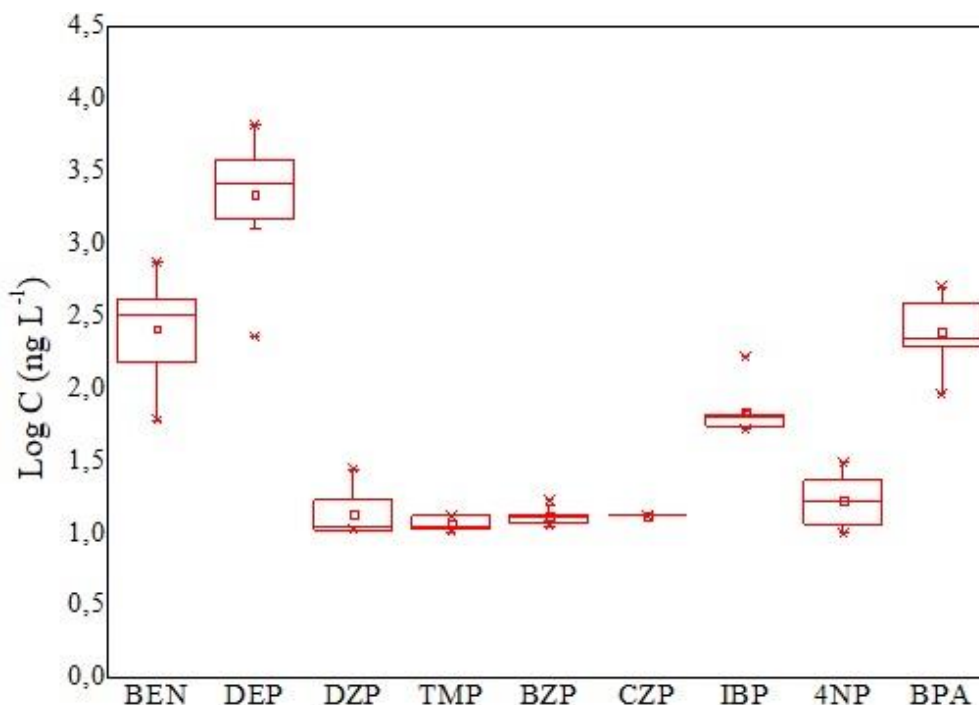
Legenda: Monitoramento entre abril/2018 e março/2019

Fonte: Autor

Para as amostras coletadas no RIO, conforme mostra a Figura 40, o DEP e o BZP foram quantificados em 100% das amostras coletadas neste ponto. A concentração do DEP variou entre $2,27 \times 10^2$ ng L⁻¹ (log C = 2,36) e $4,82 \times 10^3$ ng L⁻¹ (log C = 3,68), enquanto que a concentração do BZP variou entre 11,2 ng L⁻¹ (log C = 1,05) e 16,9 ng L⁻¹ (log C = 1,23). O BPA foi quantificado em 91% das amostras coletadas, enquanto o DZP e o IBP foram quantificados em 82% das amostras. A concentração média do BEN, DZP e do IBP nas amostras foi respectivamente $2,76 \times 10^2$ ng L⁻¹ (log C = 2,39), 14,4 ng L⁻¹ (log C = 1,13) e 72,5 ng L⁻¹ (log C = 1,83). O analito com menor frequência de quantificação foi o CZP,

quantificado em apenas em 9% das amostras coletadas (uma amostra). A concentração de CZP na amostra quantificável foi $13,1 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 1,12$). Os valores médios para os outros analitos foi $3,32 \times 10^2 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 2,41$) para BEN, $11,6 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 1,06$) para TMP e $18,1 \text{ ng L}^{-1}$ ($\log C = 1,22$) para 4NP como pode ser visto na Figura 40.

Figura 40 - Log C dos analitos das amostras coletadas no RIO



Legenda: Monitoramento entre abril/2018 e março/2019

Fonte: Autor

Quando os quatro pontos amostrais são considerados, algumas diferenças entre eles foi verificada, como por exemplo, o ponto situado no RIO, que está inserido dentro do distrito industrial de Santa Cruz, com um parque fabril diversificado e dessa forma, com pouco adensamento populacional nessa região. Em contrapartida, o ponto amostral de PBI, situa-se em uma região rural, com baixa (ou quase nenhuma) atividade industrial e pouco adensamento populacional. No entanto, o perfil de concentração dos micropoluentes nos quatro pontos amostrais foram semelhantes.

Dois fatores diretamente relacionados a ocorrência dos micropoluentes em água superficial podem ser destacados: (i) em países em desenvolvimento (países de renda média-alta, média-baixa e baixa) geralmente apresentam sistema deficitário de coleta e tratamento de esgoto, aumentando assim o descarte direto de esgoto/efluentes (doméstico e/ou industrial

e/ou hospitalar) em corpos hídricos sem o devido tratamento e conseqüentemente, aumentando a carga de micropoluentes nos corpos hídricos receptores (CUNHA; ARAUJO; MARQUES, 2017); (ii) as ETEs convencionais não removem ou removem apenas parcialmente boa parte dos micropoluentes encontrados nesta matriz aquosa (CUNHA; ARAUJO; MARQUES, 2017; CUNHA; MENDES; MARQUES, 2019; CHEN; HUANG, 2020). Logo, políticas públicas para melhoria do sistema de saneamento básico devem ser preconizadas, sobretudo na questão do Brasil, e a utilização ou desenvolvimento de novas tecnologias sustentáveis capazes de remover tais micropoluentes, como por exemplo a utilização de novas tecnologias de tratamento biológico mais eficientes, tais como: reator biológico de leito móvel (MBBR - do inglês *Moving Bed Biofilm Reactor*), sistema de biorreatores com membranas (MBR - do inglês *Membrane Bio Reactor*), lodo granular (KANAUIYA et al., 2019), e o uso de processos oxidativos avançados que utilizam espécies químicas com alto potencial de oxirredução capazes de degradar diferentes poluentes de forma não seletiva (CUNHA et al., 2019). Comparando os valores de concentração da cada analito do monitoramento com trabalhos semelhantes disponíveis na literatura, é possível perceber que os valores encontrados no monitoramento são ora maiores ora menores quando comparados com outros trabalhos. Em um estudo publicado por Wu e colaboradores (2018), para determinação de benzofenonas em amostras de água superficiais de rios da China. Neste estudo, os autores monitoraram dois rios (rio Huangpu e rio Suzhou) e a concentração da BEN variou entre 200 e 559 ng L⁻¹ para o rio rio Huangpu e 255 e 713 ng L⁻¹ para o rio Suzhou (WU et al., 2018).

No trabalho de Asati, Satyanarayana e Patel (2017), foram monitoraram entre outros analitos, a BEN, BPA, DEP e TMP em amostras de água superficial provenientes do rio Gomti na Índia. Neste estudo, o BPA foi detectado (com concentração inferior ao LQ), enquanto que o TMP não foi detectado nas amostras. Entretanto, o DEP foi quantificado, com concentração variando entre 13,2 e 16,5 ng L⁻¹ enquanto que a concentração de BEN variou entre 17,2 e 17,6 ng L⁻¹ (ASATI; SATYANARAYANA; PATEL, 2017). Um outro trabalho, realizado no Canadá, houve o monitoramento de BPA e DZP e de outros analitos, em amostras de água superficiais do rio St. Lawrence em Quebec no Canadá. Se por um lado, não houve detecção de DZP nas amostras analisadas, o BPA foi quantificado com uma concentração média de 60,0 ng L⁻¹ (COMTOIS-MAROTTE et al., 2017). Já no estudo de Aydin e Talinli (2013), em seis rios da Turquia (rio Lake, rio Karasu, rio Tahtakopru, rio Hamza, rio Ahlat e rio Beylikcayi) para o monitoramento de produtos farmacêuticos e hormônios, dentre outros analitos nesse estudo é possível destacar o monitoramento do IBP.

As concentrações de IBP nas amostras analisadas variaram entre valores inferiores ao LD e 263 ng L⁻¹ (AYDIN; TALINLI, 2013).

No trabalho de Padhye e colaboradores (2014), foram estudadas a ocorrência de 4NP, BPA, IBP e TMP dentre outros analitos, em amostras de água superficial de um rio, que é utilizado por uma ETA como fonte de captação e posterior distribuição para o sudeste dos Estados Unidos. Neste estudo, a concentração do 4NP, BPA, IBP e TMP foi 53,4 e 186 ng L⁻¹, 0 e 21,9 ng L⁻¹, 0 e 133 ng L⁻¹ e 2,2 e 10,9 ng L⁻¹ respectivamente (PADHYE *et al.*, 2014). Em um estudo trabalho de Tran, Hu e Ong (2018), para determinação de PPCPs, EDs e adoçantes artificiais em amostras de água coletadas em uma bacia hidrográfica em Singapura. Neste trabalho, entre outros analitos, houve a determinação de BPA, IBP e TMP. Nas amostras coletadas, houve apenas a detecção de TMP enquanto que o BPA e o IBP foram quantificados. Nas amostras, o BPA foi quantificado entre LQ (5,00) e 324 ng L⁻¹, enquanto que o IBP foi quantificado entre LQ (5,00) e 111 ng L⁻¹ (TRAN; HU; ONG, 2013).

Camilleri e colaboradores (2015), quantificaram EDs e PPCPs em níveis traço em amostras de água superficial coletadas em dois rios (rio Bourbre e rio Bion) ao redor da cidade de Lyon, na França. Dentre os analitos monitorados nesse estudo, é possível destacar o 4NP, BPA e TMP. Nos resultados do monitoramento das amostras, os autores não reportaram o BPA. Com relação ao 4NP, este foi detectado nos dois rios (rio Bourbre e rio Bion), enquanto o TMP foi quantificado nos dois rios. Para o rio Bourbre, a concentração do TMP variou entre 1,90 e 21,4 ng L⁻¹, enquanto que para o rio Bion, a concentração variou entre 1,00 e 32,1 ng L⁻¹ (CAMILLERI *et al.*, 2015). Mendoza e colaboradores (2014), publicaram um trabalho com a ocorrência de drogas de abuso, incluindo o DZP em amostras de águas superficiais, coletadas de dois rios (rio Jarama e rio Manzanares), na região de Madri, Espanha, durante o verão e o inverno. Para o período do verão, a concentração do DZP variou entre 3,30 e 15,1 ng L⁻¹. Já para o inverno, a variação da concentração do DZP ficou entre 3,40 e 55,7 ng L⁻¹. Independente do período (verão ou inverno), o DZP foi quantificado nas 14 amostras coletadas (7 amostras coletadas no verão e outras 7 amostras coletadas no inverno) (MENDOZA *et al.*, 2014).

Em outro trabalho também realizado em quatro bacias hidrográficas da Espanha (bacia hidrográfica do rio Llobregat, bacia hidrográfica do rio Ebro, bacia hidrográfica do rio Jucar e bacia hidrográfica do rio Guadalquivir), durante os anos de 2010 e 2011, Mastroianni e colaboradores (2016) verificaram a ocorrência de drogas de abuso em amostras de água superficiais de rios espanhóis. Dentre as drogas de abuso analisadas é possível destacar o DZP. Nas amostras coletadas na bacia hidrográfica do rio Llobregat em 2010 e 2011, o DZP

foi quantificado em 50 e 57% das amostras coletadas respectivamente (n = 14 amostras). As concentrações máximas de DZP para os anos de 2010 e 2011 foram respectivamente 25,8 e 13,4 ng L⁻¹. Já para a bacia hidrográfica do rio Ebro, o DZP foi quantificado em 8 e 21% das amostras coletadas nos anos de 2010 e 2011 respectivamente (n= 14). As concentrações máximas do DZP para os anos de 2010 e 2011 foram respectivamente 3,10 e 2,90 ng L⁻¹. Para a bacia hidrográfica do rio Jucar o DZP foi quantificado em 13 e 21% das amostras coletadas nos anos de 2010 e 2011 respectivamente (n = 14 amostras), com concentrações máximas variando entre 1,90 e 2,30 ng L⁻¹ para 2010 e 2011 respectivamente. Com relação a bacia hidrográfica do rio Guadalquivir o DZP foi quantificado em 13 e 50% das amostras coletadas para os anos de 2010 e 2011 respectivamente (n = 14 amostras). As concentrações máximas para os anos de 2010 e 2011 foram respectivamente 3,90 e 4,00 ng L⁻¹ (MASTROIANNI *et al.*, 2016).

4.6 Risco ecológico (RQ)

A Tabela 20 apresenta os valores de concentrações previstas sem efeitos (PNEC) para cada analito, obtidos por meio da revisão de sete artigos científicos. Os valores de PNEC variaram entre 60,0 ng L⁻¹ para BPA e 5,77x10⁵ ng L⁻¹ para CZP.

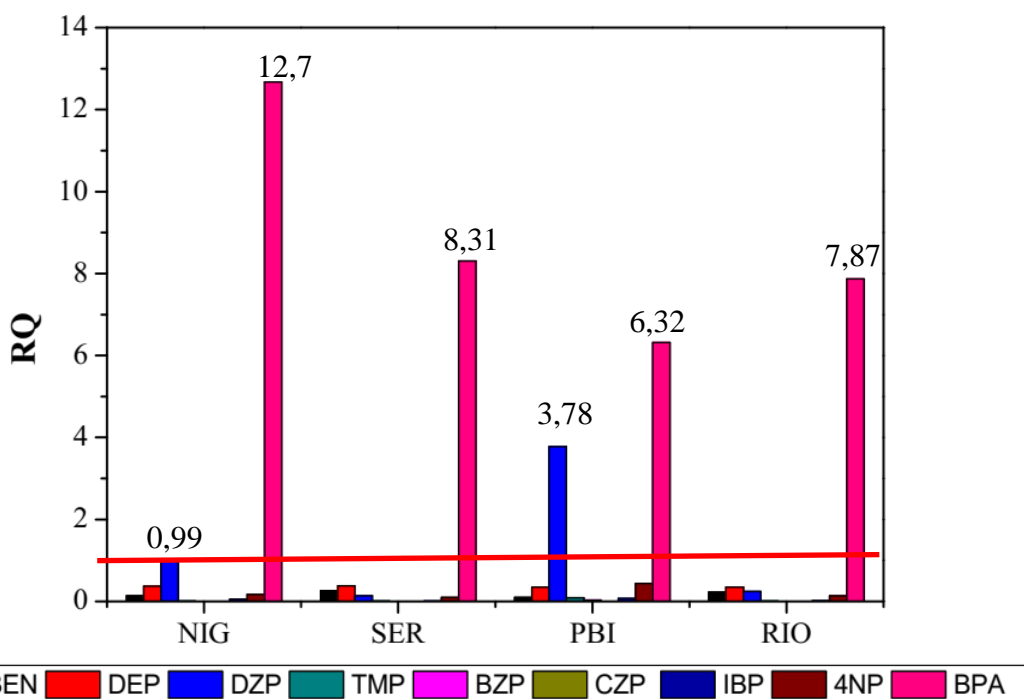
Tabela 21 - Valores de PNEC para cada analito

Substância	PNEC (ng L⁻¹)	Referência
BPA	60,0	WRIGHT-WALTERS et al. 2011
DZP	100	CUNHA; MENDES; MARQUES, 2019
4-NP	210	CHAU et al. 2018
TMP	260	CHAU et al. 2018
BEN	280	GOSSET et al. 2017
IBP	710	AYDIN; AYDIN; ULVI, 2019
DEP	1,65x10 ³	LI et al. 2015
BZP	1,74x10 ³	CUNHA; MENDES; MARQUES, 2019
CZP	5,77x10 ⁵	CUNHA; MENDES; MARQUES, 2019

Fonte: Autor

A Figura 41 apresenta os valores de RQ calculados para cada local coletado durante todo o período de monitoramento e considerando os valores de Concentração Ambiental Medida (MEC_{P95})

Figura 41 - Risco ecológico (RQ) para cada analito



Legenda: Valores de risco ecológico para cada analito em cada ponto amostral, levando-se em conta MEC_{P95} .

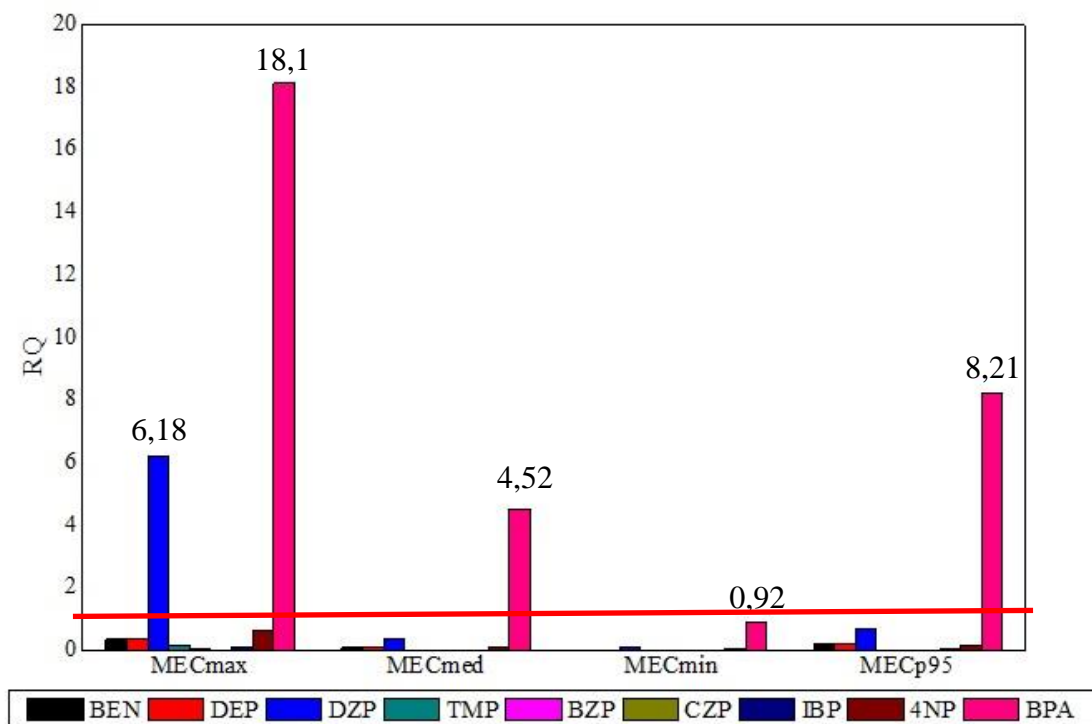
Fonte: Autor

Como pode ser visto pela Figura 41, o DZP e o BPA apresentaram valor de $RQ > 1$, utilizando o percentil de 95%. O BPA apresentou risco extremo para todos os pontos amostrais da bacia hidrográfica do rio Guandu. Já o DZP apresentou risco extremo para os pontos amostrais de NIG e de PBI.

A Figura 42 apresenta os valores de RQ para todas as substâncias calculados a partir dos valores de MEC máximo, médio, mínimo e do percentil 95.

Como mostrado na Figura 42, o BPA e o DZP apresentaram valores de potencial risco alto ($RQ > 1$). Para o BPA, risco extremo foi observado para valores de MEC máximo, médio e do percentil 95. Para MEC mínimo o valor de RQ encontrado foi próximo de 1 ($RQ = 0,92$). Em contraste, para o DZP, valor de $RQ > 1$ ($RQ = 6,18$) foi encontrado apenas quando utilizado o valor de MEC máximo. Para os outros analitos, valores de RQ menores que 1 foram encontrados, não indicando risco para tais compostos.

Figura 42 - Risco ecológico (RQ) para cada analito em função das MECs



Legenda: Valores de risco ambiental calculados com os valores de MEC máximo, médio, mínimo e do percentil 95 de cada substância ao longo do período de amostragem.

Fonte: Autor

Em estudos anteriores podem ser observados valores de RQ superiores a 1 para BPA e DZP. Estudos encontraram valores de RQ para BPA entre 3,8 e 9,6 considerando diferentes rios da China (GUO et al., 2015). Da mesma forma, valores de RQ para BPA de até 62,0 em diferentes rios na Índia, foram relatados (SELVARAJ et al., 2014). No Brasil, em um estudo recente que monitorou Cafeína e BPA em diferentes pontos e sazonalidades na bacia do rio Sinos, no Rio Grande do Sul (PETEFFI et al., 2019) foram encontrados valores altos de RQ para amostras de água superficial coletadas, com valor máximo de RQ de até 51,7. Em um estudo sobre avaliação de risco ambiental de drogas psicoativas em diferentes ambientes aquáticos (CUNHA; MENDES; MARQUES, 2019), foi encontrado valor alto de RQ (6,25) para DZP em água superficial.

Até o momento não foi encontrado nenhum estudo que realizou o monitoramento e avaliação de risco ambiental de BPA e DZP em diferentes pontos amostrais da bacia hidrográfica do rio Guandu. Neste contexto, o presente estudo contribui com informações a respeito da ocorrência de diferentes micropoluentes na bacia do rio Guando e evidencia potencial risco extremo para BPA e DZP, de acordo com a metodologia do cálculo do

coeficiente de risco estabelecida pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) (CUNHA; ARAUJO; MARQUES, 2017; CUNHA; MENDES; MARQUES, 2019). Levando-se em conta de que as drogas psicoativas, como os benzodiazepínicos abordados nesse estudo, provocam alterações comportamentais em diversos organismos, mesmo em pequenas concentrações no ambiente aquático, elevando a preocupação com a presença destes medicamentos em águas superficiais devido ao potencial desequilíbrio do ecossistema aquático (CUNHA; MENDES; MARQUES, 2019).

4.7 **Ensaio ecotoxicológicos**

4.7.1 Ensaio ecotoxicológico com microcrustáceo *C. dubia*

A Tabela 21 apresenta os resultados agregados dos ensaios com *C. dubia* entre os meses de outubro de 2018 a março de 2019.

Tabela 22 - Ecotoxicidade crônica para *C. dubia* expostas a amostras de água superficial

Ponto Amostrual	Out 2018		Dez 2018		Jan 2019		Fev 2019		Mar2019	
	Total filhotes	Total fêmeas mortas	Total filhotes	Total fêmeas mortas	Total filhotes	Total fêmeas mortas	Total filhotes	Total fêmeas mortas	Total filhotes	Total fêmeas mortas
CTR*	111	0	100	0	171	0	171	0	171	0
PBI	126	0	2	10	2	10	0	10	19	2
NIG	44	2	1	10	0	10	0	10	8	3
RIO	21	5	0	10	0	10	0	10	41	2
SER	29	1	8	9	1	10	0	10	21	5

Legenda: tempo de exposição: 168 h; 10 replicatas/ amostra; * Controle: meio de cultivo sem amostra ambiental.

Fonte: Autor

Nos ensaios com amostras de outubro e de dezembro de 2018, as fêmeas não produziram a média mínima de 15 neonatos no controle, sugerindo problemas com o cultivo do organismo. Portanto, os resultados nesses meses devem ser considerados com cautela.

Aplicando o teste estatístico de Dunnett, para avaliar a reprodução das *C. dubia*, foi possível observar que todas as amostras, em todas as coletas foram consideradas tóxicas, com exceção do ponto PBI, na amostra coletada em outubro de 2018, como pode ser visto pela Tabela 22. As demais amostras, causaram mortalidade das fêmeas de *C. dubia* na maior parte dos ensaios, embora esse efeito não seja avaliado em um ensaio crônico.

Tabela 23 - Resultado com base no Teste de Dunnett,

Amostra	Out/2018	Dez/2018	Jan/2019	Fev/2019	Mar/2019
PBI	Não tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico
NIG	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico
RIO	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico
SER	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico

Legenda: Avaliação da reprodução das fêmeas de *C. dubia* nos ensaios.

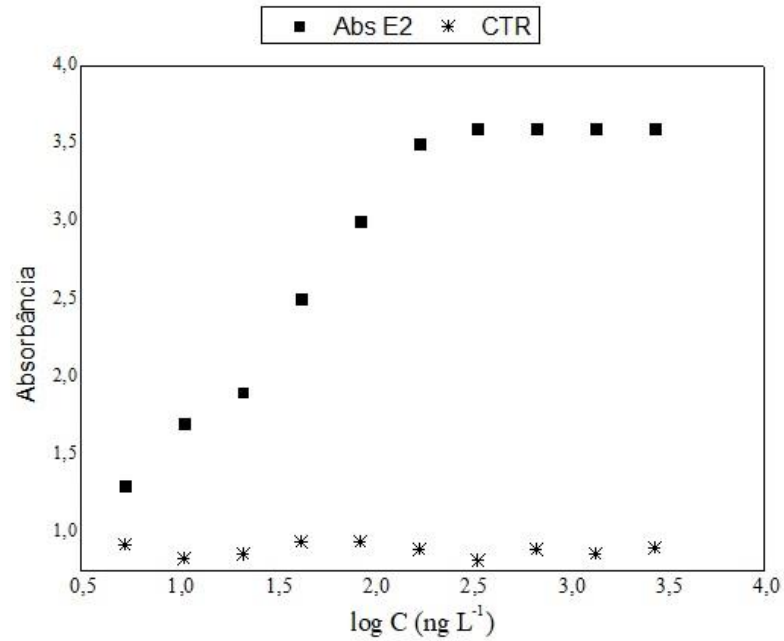
Fonte: Autor

4.7.2 Ensaio ecotoxicológico com bactéria *S. cerevisiae*.

Com o intuito de verificação da resposta do controle positivo, foram realizados dois testes para tal. A curva dose-resposta produzida na faixa de 1,33 a $2,72 \times 10^3$ ng L⁻¹ é apresentada na Figura 43. Os valores médios de CE₅₀ de de E2 pode ser visto na Figura 44.

As Figuras 43 e 44 demonstram que o 17β-Estradiol (E2), utilizado como controle positivo no ensaio, apresentou uma resposta de acordo com a resposta esperada, conforme descrito na literatura (BECK et al., 2006; FIC et al., 2014; RUTISHAUSER et al., 2004; BALSIGER et al., 2010). Os resultados de equivalente de 17β-Estradiol (EQ-E2) para todo o período de realização dos ensaios YES podem ser vistos na Figura 45.

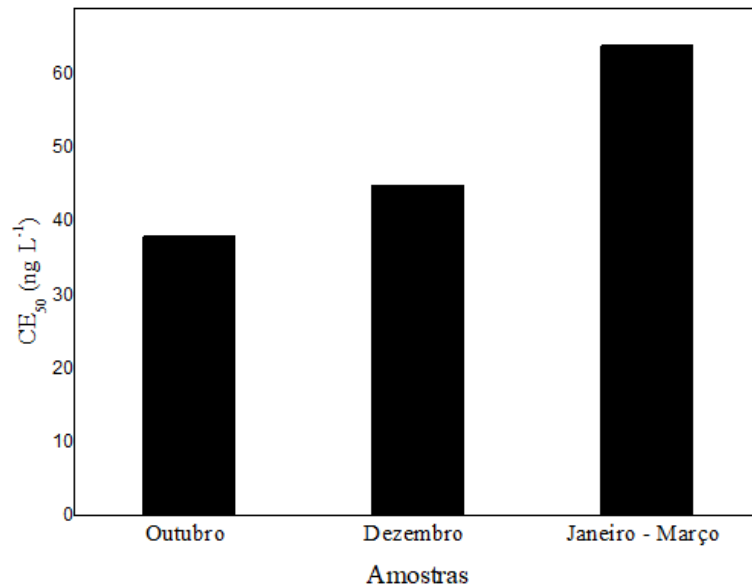
Figura 43 - Curva dose-resposta dos padrões para ensaio YES.



Legenda: CTR – controle; E2 – controle positivo

Fonte: Autor

Figura 44 - CE₅₀ obtidos com três controles positivos com E2

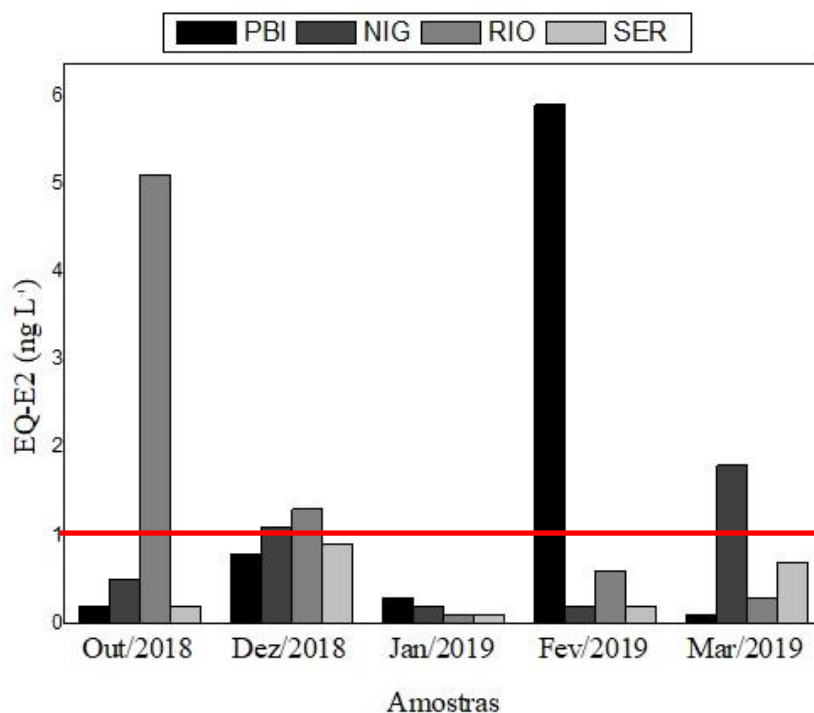


OBS: As amostras de janeiro, fevereiro e março foram reunidas em um único ensaio.

Fonte: Autor

A Figura 45 ilustra os valores estimados de EQ-E2 para os pontos amostrais entre outubro de 2018 e março de 2019.

Figura 45 - Valores EQ-E2 dos pontos amostras da bacia do rio Guandu – RJ



Fonte: Autor

Neste estudo foi tomado como valor norteador a concentração de $1,00 \text{ ng L}^{-1}$ para os estrogênios, tendo em vista que nessa dosagem é sabido que ocorre efeito tóxico para a biota aquática (MATTHIESSEN et al., 2006; ROUTLEDGE; SUMPTER, 1996). Todas as amostras coletadas apresentaram atividade estrogênica, variando de $5,70 \times 10^{-2} \text{ ng L}^{-1}$, referente a amostra coletada em março de 2019 no ponto amostral de PBI a $5,96 \text{ ng L}^{-1}$ referente a amostra coletada em fevereiro de 2019 no mesmo ponto amostral. Nenhuma das amostras coletadas em SER apresentou EQ-E2 acima da concentração de referência. O valor máximo de EQ-E2 encontrado neste ponto amostral foi de $0,900 \text{ ng L}^{-1}$.

4.7.2.1 Toxicidade de amostras para *S. cerevisiae*

A inibição do crescimento da levedura, conforme mostrado na Equação 3 (página 73), está relacionada com a absorbância das amostras. Valores de absorbância da amostra iguais ou superiores ao valor de absorbância do branco, indicam ausência de toxicidade, ou seja, indicam que o crescimento da levedura na amostra foi igual ou superior ao do controle negativo (branco), enquanto valores de absorbância da amostra inferiores ao valor de

absorbância do branco indicam citotoxicidade, ou seja toxicidade, está havendo letalidade para a *S. cerevisiae*.

A inibição do crescimento da levedura foi observada no poço com 100% de amostra nas coletas de janeiro e março de 2019 para todos os pontos amostrais e também para o mês de fevereiro de 2019 para o ponto amostral de Seropédica (SER). Quando tal fato ocorreu, também houve a inibição do crescimento da levedura nos poços com diluições crescentes, até 1,56% da amostra original, coletada no mês de março de 2019 para o ponto amostral do Rio de Janeiro. A Tabela 23 ilustra os resultados relacionados com a inibição do crescimento da levedura.

Tabela 24 - Análise da toxicidade das amostras do Rio Guandu durante ensaio YES.

Mês	Amostra	Concentração da amostra ambiental											
		100%	50%	25%	12,5%	6,25%	3,12%	1,56%	0,78%	0,39%	0,195%	0,098%	0,048%
Outubro 2018	PBI	-											
	NIG	-											
	RIO	-											
	SER	-											
Dezembro 2018	PBI	-											
	NIG	-											
	RIO	-											
	SER	-											
Janeiro 2019	PBI		██████████										
	NIG		██████████										
	RIO		██████████										
	SER		██████████										
Fevereiro 2019	PBI	-											
	NIG	-											
	RIO	-											
	SER		██████████										
Março 2019	PBI		██████████										
	NIG		██████████										
	RIO		██████████										
	SER		██████████										

Legenda: (-) Toxicidade não observada na concentração máxima do extrato da amostra (100%); Análises realizados com bactéria geneticamente modificada de *S. cerevisiae*

Fonte: Autor

4.8 Avaliação ambiental da bacia do rio Guandu-RJ

Como descrito no item 2.7, inserido na região da bacia do rio Guandu, encontram-se regiões com grande densidade populacional, áreas com atividade agrícola e também atividade industrial (distritos industriais de Queimados, Santa Cruz - Rio de Janeiro e Paracambi).

Com relação aos dados do monitoramento dos nove micropoluentes, nenhuma das regiões de estudo apresentam indústrias farmacêuticas instaladas. Dessa forma, a ocorrência de todos os produtos farmacêuticos estudados nesse trabalho possuem sua origem no esgoto doméstico e/ou hospitalar sem o devido tratamento antes da eliminação.

Assim, o IBP foi quantificado em 84% das amostras, sendo o analito que foi quantificado no maior número de amostras e sua origem pode estar associada ao alto consumo. Outros produtos farmacêuticos que obtiveram percentuais de quantificação significantes foram o DZP, o TMP e o BZP que foram quantificados em 77%, 68% e 84% das amostras coletadas respectivamente.

O produto farmacêutico que foi quantificado no menor número de amostras foi o CZP, tendo sido quantificado em apenas nove amostras do total de 44 amostras coletadas com um total de 20% das amostras quantificadas. Sabendo que o CZP, o BZP e o DZP são produtos farmacêuticos da mesma classe, são vendidos apenas com prescrição médica e retenção da receita e conforme descrito acima, a ocorrência de produtos farmacêuticos está relacionado com o esgoto doméstico e/ou hospital. Assim, a presença de CZP, BZP e DZP, mesmo em pequenas concentrações, são capazes de provocar alterações comportamentais em nos organismos expostos.

Dos EDs abordados nesse trabalho, todos estão presentes em produtos comuns do cotidiano das pessoas, como embalagens plásticas e produtos de limpeza por exemplo. Assim o descarte irregular desses produtos bem como o esgoto doméstico sem o devido tratamento faz com que essa seja uma fonte de ocorrência dos EDs. Além do esgoto doméstico, o efluente industrial sem tratamento eficiente também se apresenta como uma possível fonte potencial desses analitos. Nos distritos industriais de Queimados, Santa Cruz e Paracambi, foram encontradas indústrias que podem apresentar potencial utilização de plastificantes (BPA e DEP) para a produção de produtos descartáveis bem como o uso de surfactantes (4NP) para a produção de produtos de limpeza.

Com relação ao RQ, conforme visto na Figura 41, o BPA apresenta risco extremo para os quatro pontos amostrais ($RQ > 1$) enquanto que o DZP apresenta risco extremo para PBI e

NIG. Com relação ao BPA, a concentração mínima quantificada foi 55,42 ng L⁻¹ para uma amostra de SER e a concentração máxima quantificada foi 1087,72 ng L⁻¹ para uma amostra de NIG. Vale destacar ainda, que para os quatro pontos amostrais, o BPA foi o segundo analito com maior concentração média quantificada, ficando atrás apenas do DEP. Dessa forma, o risco extremo para o BPA (RQ >1) nos quatro pontos amostrais demonstra que os altos níveis de concentrações desse analito podem ocasionar efeitos ao ambiente nesses pontos.

Com relação ao DZP, este apresentou concentrações mínimas e máximas variando entre 10,12 e 618,31 ng L⁻¹ respectivamente para amostras coletadas em NIG e PBI. Para as amostras coletadas em NIG, a concentração máxima quantificada de DZP foi 139,21 ng L⁻¹ enquanto que para PBI a concentração máxima quantificada foi 618,31 ng L⁻¹. Além do DZP, outros benzodiazepínicos também foram quantificados nesses pontos amostrais, porém com valores de RQ < 1. O risco extremo para o DZP em NIG e PBI chama a atenção pois, DZP é uma droga psicoativa, que provoca alterações comportamentais em nos organismos expostos, mesmo em pequenas concentrações.

Com relação aos ensaios ecotoxicológicos realizados com a *D. dubia*, em função de possíveis problemas no cultivo dos organismos, os resultados considerados foram os obtidos através do teste de Dunnett. Como apresentado na Tabela 22 todas as amostras coletadas foram consideradas tóxicas para o bioindicador com exceção de uma amostra coletada em PBI para o mês de outubro/2018. Foi observado para este cenário (PBI – outubro/2018), a menor concentração quantificada de PPCPs e EDs entre as amostras analisadas. A concentração total quantificada de PPCPs e dos EDs, para o mês de outubro/2018 no ponto amostral de PBI foi 1573,78 ng L⁻¹. A concentração total quantificada dos PPCPs e EDs das demais amostras, no o mesmo ponto amostral, variou entre 1764,25 e 4906,93 ng L⁻¹ para os meses de dezembro/2018 e janeiro/2019 respectivamente. Tendo em vista que foram encontradas altas concentrações dos analitos (até 7572,04 ng L⁻¹), estes podem ser responsáveis pela toxidez ao bioindicador. Tal fato se justifica, pois a toxidez ao bioindicador pode ter sido ocasionado em função de outro(s) micropoluentes presente(s) na amostra, tendo em vista a complexidade da amostra. Assim, inferência de que a toxidez das amostras foram causada pelos nove micropoluentes não pôde ser feita.

Para os ensaios de estrogenicidade com a *S. cerevisiae*, todas as amostras coletadas apresentaram efeito de estrogenicidade, com valores de EQ-E2 aproximadamente seis vezes o valor norteador de EQ-E2 (1,00 ng L⁻¹). Como foi apresentado na Figura 45, a amostra coletada no ponto amostral do RIO em outubro de 2018 apresentaram 5,12 ng L⁻¹ de EQ-E2.

Para essa campanha amostral, a concentração média total dos EDs foi 1730,70 ng L⁻¹. Nessa campanha, o DEP e o BPA contribuíram para 99% da concentração média total. Outra amostra coletada que apresentou valores de EQ-E2 acima do valor norteador foi a amostra de PBI coletada em fevereiro de 2019. Nessa campanha amostral, o valor de EQ-E2 foi de 5,97 ng L⁻¹. A concentração média total dos EDs foi 7049,72 ng L⁻¹. Vale destacar que nessa campanha amostral, a concentração média quantificada para o DEP e o BPA foi 6672,60 e 360,81 ng L⁻¹.

O valor de 5,91 ng L⁻¹ EQ-E2 da amostra coletada em PBI em fevereiro de 2019 pode estar relacionado com a alta concentração de EDs. Entretanto, quando se comparou as amostras do RIO de outubro de 2018 e PBI de fevereiro de 2019, foi observado uma pequena diferença entre os valores de EQ-E2 (0,85 ng L⁻¹) porém uma grande diferença na concentração média total dos EDs (5319,02 ng L⁻¹). Devido a essas diferenças, pode-se sugerir que a amostra de outubro de 2018 para RIO apresentam uma carga de outros EDs que não o 4NP, BPA e DEP maior do que a amostra de fevereiro de 2019 para PBI justificando assim valores de EQ-E2 próximos. Outras inferências com potenciais causadores da estrogenicidade das amostras devem ser avaliados com cautela, uma vez que não foram avaliados outros EDs neste trabalho, que podem impactar nos resultados de estrogenicidade. Logo as inferências sobre os efeitos da estrogenicidade das amostras estar relacionado com os três EDs abordados nesse trabalho não pôde ser feito devido à complexidade da amostra.

CONCLUSÕES

O método de extração em fase sólida otimizado permitiu a extração dos nove micropoluentes (4-nonilfenol, benzofenona, bisfenol A, bromazepam, clonazepam, diazepam, dietilftalato, ibuprofeno e trimetoprim), sem necessidade de ajuste de pH, utilizando-se a eluição sequencial metanol como solvente de eluição.

O processo de validação da metodologia analítica forneceu confiabilidade estatística aos dados, confirmando a exatidão, precisão e boa linearidade nas faixas de trabalho consideradas ($R^2 > 0,99$). Além desses parâmetros, o método analítico apresentou-se ainda seletivo e robusto, com valores de limite de detecção e limites de quantificação em acordo com valores descritos pela literatura.

Com relação ao efeito de matriz, para os micropoluentes 4-nonilfenol, bisfenol A, clonazepam, dietilftalato, ibuprofeno e trimetoprim houve interferência da matriz na quantificação das amostras, evidenciado por meio do teste F.

O método analítico proposto demonstrou ser uma ferramenta útil para a verificação de ocorrência de produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (PPCPs) e desreguladores endócrinos (EDs) em amostras de águas superficiais. O método permitiu ainda, a determinação de nove micropoluentes nas águas da bacia hidrográfica do rio Guandu, manancial responsável pelo abastecimento de mais de 9 milhões de habitantes do Estado do Rio de Janeiro.

Com relação ao monitoramento da bacia hidrográfica do rio Guandu, em todas as campanhas e em todas as amostras coletadas nos quatro pontos amostrais foi possível detectar os micropoluentes. Com relação à quantificação, para as amostras coletadas em Nova Iguaçu, o dietilftalato e o bisfenol A foram quantificados em 100% das amostras, enquanto que o ibuprofeno, a benzofenona e o clonazepam foram quantificados respectivamente em 91%, 82% e 27% das amostras. Já nas amostras coletadas em Paracambi o dietilftalato e o bromazepam foram quantificados em 100% das amostras, enquanto que a benzofenona, o bisfenol A e o ibuprofeno foram quantificados em 91% das amostras.

Nas amostras coletadas no Rio de Janeiro, o dietilftalato e o bromazepam foram quantificados em 100% das amostras, o bisfenol A foi quantificado em 91% das amostras, enquanto que o diazepam e o ibuprofeno foram quantificados em 82% das amostras. Com relação as amostras coletadas em Seropédica, foram quantificados o dietilftalato e o bisfenol

A em 100% das amostras, enquanto que o bromazepam e o clonazepam foram quantificados em 82% e 27% respectivamente das amostras.

A avaliação de risco conduzida de acordo com base no cálculo do Risco Ecológico (RQ) proposto pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) na diretriz sobre avaliação de riscos ambientais evidenciou que os micropoluentes bisfenol A e o diazepam apresentaram valores de potencial risco alto ($RQ > 1$) na bacia hidrográfica do Rio Guandu.

Com relação aos ensaios ecotoxicológicos, via teste estatístico de Dunnett, para avaliar a reprodução das *C. dubia*, concluiu-se que todas as amostras, em todas as coletas foram tóxicas, com exceção da amostra coletada em outubro de 2018 proveniente de Paracambi. As demais amostras, causaram mortalidade das fêmeas de *C. dubia* na maior parte dos ensaios, demonstrando a toxicidade aguda das amostras, embora esse efeito não seja o objetivo de um ensaio crônico.

Já com relação ao ensaio do YES, todas as amostras coletadas apresentaram atividade estrogênica, variando de $5,70 \times 10^{-2}$ ng L⁻¹ (referente à amostra coletada em março de 2019 no ponto amostral de Paracambi) a 5,96 ng L⁻¹ (referente à amostra coletada em fevereiro de 2019 no ponto amostral Paracambi). Nenhuma das amostras coletadas em Seropédica apresentou EQ-E2 acima da concentração de referência. Já uma inibição do crescimento da levedura foi observado no poço com 100% de amostra nas coletas de janeiro e março de 2019 para todos os pontos amostrais e também para o mês de fevereiro de 2019 para o ponto amostral de Seropédica. Quando tal fato ocorreu, também houve a inibição do crescimento da levedura nos poços com diluições crescentes, até 1,56% da amostra original, coletada no mês de março de 2019 para o ponto amostral do Rio de Janeiro.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 13373: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com Ceriodaphnia spp (Cruatacea, Cladocera)*. Rio de Janeiro, 2010.
- ABREU, M. J. et al. The use of PCR-RFLP to genetically distinguish the morphologically close species: *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 and *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea Cladocera). *Brazilian Journal of Biological Sciences*, v. 70, n. 1, p.121-124, 2010.
- ACUÑA, V. et al. Occurrence and in-stream attenuation of wastewater-derived pharmaceuticals in Iberian rivers. *The Science of the Total Environment*, v. 503–504, p. 133–141, 2015.
- AHEL, M. et al. Photochemical degradation of nonylphenol and nonylphenol polyethoxylates in natural waters. *Chemosphere*, v. 28, n. 7, p. 1361–1368, 1994.
- AL-HAWASLI, H.; AL KHAYAT, M. A.; AL MARDINI, M. A development of a validated HPLC method for the separation and analysis of a Bromazepam, Medazepam and Midazolam mixture. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, v. 2, n. 6, p. 484–491, 2012.
- ALMEIDA, C. A. A. et al. Determination of anti-anxiety and anti-epileptic drugs in hospital effluent and a preliminary risk assessment. *Chemosphere*, v. 93, n. 10, p. 2349–2355, 2013.
- ALMEIDA, C.A.A. et al. Determination of the psychoactive drugs carbamazepine and diazepam in hospital effluent and identification of their metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 21, p. 17192–17201, 2015.
- ALSBAIEE, A. et al. Rapid removal of organic micropollutants from water by a porous β -cyclodextrin polymer. *Nature*, v. 529, n. 7585, p. 190–194, 2016.
- ALVES, C. et al. Exposição ambiental a interferentes endócrinos com atividade estrogênica e sua associação com distúrbios puberais em crianças. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 23, n. 5, p. 1005–1014, 2007.
- ALYGIZAKIS, N. A. et al. Occurrence and spatial distribution of 158 pharmaceuticals, drugs of abuse and related metabolites in offshore seawater. *Science of the Total Environment*, v. 541, p. 1097–1105, 2016.
- ANDREOZZI, R. et al. Evaluation of biodegradation kinetic constants for aromatic compounds by means of aerobic batch experiments. *Chemosphere*, v. 62, p. 1431–1436, 2006.
- ANDREU, V. et al. Presence of pharmaceuticals and heavy metals in the waters of a Mediterranean coastal wetland: Potential interactions and the influence of the environment. *The Science of the Total Environment*, v. 540, p. 278–286, 2016.
- ARAÚJO, F. G; BAUERFELDT, G. F; CID, Y. P. Determination of 4-nonylphenol in surface waters of the Guandu river basin by high performance liquid chromatography with ultraviolet

detection. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 29, n. 10, p. 2046-2053, 2018.

ARAUJO, F. G; BAUERFELDT, G. F; CID, Y. P. Nonylphenol : Properties , legislation , toxicity and determination. *Annals of Brazilian Academy of Sciences*, v. 89, p. 1903–1918, 2017.

ARAUJO, F. G. et al. Development and Validation of an Analytical Method for the Detection and Quantification of Bromazepam , Clonazepam and Diazepam by UPLC - MS / MS in Surface Water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, n. 103, p. 362-366, 2019.

ARBELÁEZ, P. et al. Determination of high-intensity sweeteners in river water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1393, n. July, p. 106–114, 2015.

ARCHER, E.; WOLFAARDT, G. M.; van WYK, J. H. Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) as endocrine disrupting contaminants (EDCs) in South African surface waters. *Water SA*, v. 43, n. 4, p. 684–706, 2017.

ASATI, A.; SATYANARAYANA, G. N. V.; PATEL, D. K. Comparison of two microextraction methods based on solidification of floating organic droplet for the determination of multiclass analytes in river water samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry using Central Composite Design. *Journal of Chromatography A*, v. 1513, p. 157–171, 2017.

AYDIN, E.; TALINLI, I. Analysis, occurrence and fate of commonly used pharmaceuticals and hormones in the Buyukcekmece Watershed, Turkey. *Chemosphere*, v. 90, n. 6, p. 2004–2012, 2013.

AYDIN, S.; AYDIN, M. E.; ULVI, A. Monitoring the release of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in the receiving environment. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 26, n. 36, p. 36887–36902, 2019.

AYMERICH, I. et al. Attenuation of pharmaceuticals and their transformation products in a wastewater treatment plant and its receiving river ecosystem. *Water Research*, v. 100, p. 126–136, 2016.

BALSIGER, H. A. et al. A four-hour yeast bioassay for the direct measure of estrogenic activity in wastewater without sample extraction, concentration, or sterilization. *Science of the Total Environment*, v. 408, p. 1422–29, 2010

BARBON, Julia.; PAMPLONA, Nicola. Entenda a crise de abastecimento de água no Rio de Janeiro. *Folha de São Paulo*, Rio de Janeiro, fev. 2020. Disponível em: < <https://www1.folha.uol.com.br/cotidiano/2020/02/entenda-a-crise-de-abastecimento-de-agua-no-rio-de-janeiro.shtml> >. Acesso em: 16 mar. 2020.

BATT, A. L. et al. Evaluating the extent of pharmaceuticals in surface waters of the United States using a National-scale Rivers and Streams Assessment survey. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 35, n. 4, p. 874–881, 2016.

BEBIANNI, M. J. et al. Proteomic changes in *Corbicula fluminea* exposed to wastewater from a psychiatric hospital. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, n. 6, p. 5046–5055, 2016.

BECK, I. C.; BRUHN, R.; GANDRASS, J. Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen. *Chemosphere*, v. 63, p. 1870-78, 2006.

BEDOR, D. C. G. et al. Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in biological fluids for high-throughput analysis: Comparison of HPLC with ultraviolet and tandem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography B*, v. 863, n. 1, p. 46–54, 2008.

BERESFORD, N. et al., Issues arising when interpreting results from an in vitro assay for estrogenic activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 162, p. 22-33, 2000.

BERGLUND, F; KILLANDER, J; POMPEIUS, R. Effect of trimethoprim-sulfamethoxazole on the renal excretion of creatinine in man. *The Journal of Urology*, v. 114, p. 802–808, 1975.

BHATNAGAR, A.; ANASTOPOULOS, I. Adsorptive removal of bisphenol A (BPA) from aqueous solution: A review. *Chemosphere*, v. 168, p. 885–902, 2017.

BILA, D. M. et al. Estrogenic activity removal of 17 β -estradiol by ozonation and identification of by-products. *Chemosphere*, v. 69, n. 5, p. 736–746, 2007.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e conseqüências. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.

BISTAN, M.; LOGAR, R. M.; TISLER, T. Detection of estrogenic activity in Slovenian wastewaters by bioassay. *Central European Journal of Biology*, v. 6, n. 5, p. 829-837, 2011.

BOIX, C. et al. Fast determination of 40 drugs in water using large volume direct injection liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, v. 131, p. 719–727, 2015.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, v. 26, n. 1, p. 205-213, 2011.

BOMFIM, M. V. J. et al. Determinação de bisfenol A em fórmulas infantis. *Vigilância Sanitária em Debate*, v. 3, n. 3, p. 85–90, 2015.

BOŠNIR, J. et al. Migration of phthalates from plastic containers into soft drinks and mineral water. *Food Technology and Biotechnology*, v. 45, n. 1, p. 91–95, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopéia Brasileira*. Brasília: ANVISA, 2010, v. 1.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 166, 24 jul. 2017*. Disponível em: <http://www.in.gov.br/materia/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/do1-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412l>. Acesso em: 23 mar.

2019.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. *Resolução CONAMA 396, de 03/04/2008*. Disponível em: < <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=562> >. Acesso em: 14 jun. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de controle da qualidade da água para técnicos que trabalham em ETAS. Brasília: FUNASA, 2014. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/site/wp-content/files_mf/manualcont_quali_agua_tecnicos_trab_emetas.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Portaria 2914, de 12 dez 211*. Disponível em < <http://www.mpf.mp.br/atuacao-tematica/ccr4/dados-da-atuacao/projetos/qualidade-da-agua/legislacao/portarias/portaria-no-2914-de-12-de-dezembro-de-2011/view>>. Acesso em: 14 jun. 2018.

BRESSOLA, R. C. Avaliação de toxicidade de mananciais em áreas degradadas pela mineração com a utilização do bioindicador *Scenedesmus subspicatus* e Implementação e metodologia de toxicidade com peixe *Danio rerio* popular Zebrafish. 2007. 84 f. Monografia (Bacharelado em Engenharia Ambiental) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2007.

BRIEUDES, V. et al. Development of a multi-residue method for scrutinizing psychotropic compounds in natural waters. *Journal of Chromatography B*, p. 1–13, 2016.

BRITO, N. M. et al. Validação De Métodos Analíticos : Estratégia E Discussão. *Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, p. 129–146, 2003.

CALDAS, S. S. et al. Multi-residue method for determination of 58 pesticides, pharmaceuticals and personal care products in water using solvent demulsification dispersive liquid–liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, v. 146, p. 676–688, 2016.

CALDAS, S. S. Otimização e validação de métodos empregando DLLME, SPE, HPLC-DAD E LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em água subterrânea. 2009. 145 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2009.

CAMILLERI, J. et al. Multiresidue fully automated online SPE-HPLC-MS/MS method for the quantification of endocrine-disrupting and pharmaceutical compounds at trace level in surface water. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v. 95, n. 1, p. 67–81, 2015.

CASTRO-CORREIA, C.; FONTOURA, M. A influência da exposição ambiental a disruptores endócrinos no crescimento e desenvolvimento de crianças e adolescentes. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*, v. 10, n. 2, p. 186–192, 2015.

CASTRO, C. M.; FERREIRINHA, M. M. A Problemática Ambiental na Bacia Hidrográfica do Rio Guandu: Desafios para a Gestão dos Recursos Hídricos. *Anuário do Instituto de Geociência - UFRJ*, 35, p. 71–77, 2013.

CATALÁ, M. et al. Elimination of drugs of abuse and their toxicity from natural waters by photo-Fenton treatment. *Science of the Total Environment*, v. 520, p. 198–205, 2015.

CELANO, R. et al. Ultra-preconcentration and determination of selected pharmaceutical and personal care products in different water matrices by solid-phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction prior to ultra high pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1355, p. 26–35, 2014.

CERDA, B.; OLIVE, J. H. Effects of diet on seven-day *Ceriodaphnia dubia* toxicity tests. *Ohio Journal of Science*, v. 93, n. 3, p.44-47, 1993

CÉSPEDES, R. et al. Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 378, n. 3, p. 697–708, 2004.

CHANG, H. et al. Sensitive analysis of steroid estrogens and bisphenol a in small volumes of water using isotope-dilution ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environmental Pollution*, v. 235, p. 881–888, 2018.

CHAU, H. T.C. et al. Occurrence of 1153 organic micropollutants in the aquatic environment of Vietnam. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 8, p. 7147–7156, 2018.

CHEN, K.; ZHOU, J. L. Occurrence and behavior of antibiotics in water and sediments from the Huangpu River, Shanghai, China. *Chemosphere*, v. 95, p. 604–612, 2014.

CHEN, W. et al. Simultaneous determination of 20 trace organic chemicals in waters by solid-phase extraction (SPE) with triple-quadrupole mass spectrometer (QqQ-MS) and hybrid quadrupole Orbitrap high resolution MS (Q-Orbitrap-HRMS). *Chemosphere*, v. 163, p. 99–107, 2016.

CHEN, W.; HUANG, J. Adsorption of organic including pharmaceutical and inorganic contaminants in water toward graphene-based materials. *Contaminants of Emerging Concern in Water and Wastewater*, p. 93–113, 2020.

CHEN, X. et al. Determination of bisphenol A in water via inhibition of silver nanoparticles-enhanced chemiluminescence. *Analytica Chimica Acta*, v. 689, n. 1, p. 92–96, 2011.

CHÈZE, M.; VILLAIN, M.; PÉPIN, G. Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC-MS/MS: Application to forensic cases of drug facilitated crimes. *Forensic Science International*, v. 145, n. 2–3, p. 123–130, 2004.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na

análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova*, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008.

CIRJA, M. et al. Factors affecting the removal of organic micropollutants from wastewater in conventional treatment plants (CTP) and membrane bioreactors (MBR). *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v. 7, n. 1, p. 61–78, 2008.

COLAÇO, R. Determinação de diclofenaco e ibuprofeno em matrizes aquosas por EFS-CLAE-UV. 2013. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 2011. p. 326p. Disponível em: <http://arquivos.ana.gov.br/institucional/sge/CEDOC/Catalogo/2012/GuiaNacionalDeColeta.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2018

COMTOIS-MAROTTE, S. et al. Analysis of emerging contaminants in water and solid samples using high resolution mass spectrometry with a Q Exactive orbital ion trap and estrogenic activity with YES-assay. *Chemosphere*, v. 166, p. 400–411, 2017.

CUNHA, D. L.; ARAUJO, F. G.; MARQUES, M. Psychoactive drugs: occurrence in aquatic environment, analytical methods, and ecotoxicity—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, n. 31, p. 24076–24091, 2017.

CUNHA, D. L.; MENDES, M P.; MARQUES, M. Environmental risk assessment of psychoactive drugs in the aquatic environment. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 26, n. 1, p. 78–90, 2019.

CUNHA, D. L. et al. Optimization of Benzodiazepine Drugs Removal from Water by Heterogeneous Photocatalysis Using TiO₂/Activated Carbon Composite. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 230, n. 7, p. 141, 2019.

CUNHA, R. R. et al. Simultaneous determination of caffeine, paracetamol, and ibuprofen in pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography with UV detection and by capillary electrophoresis with conductivity detection. *Journal of Separation Science*, v. 38, n. 10, p. 1657–1662, 2015.

DEBLONDE, T.; COSSU-LEGUILLE, C.; HARTEMANN, P. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 214, n. 6, p. 442–448, 2011.

DOERGE, D. R. et al. Distribution of bisphenol A into tissues of adult, neonatal, and fetal Sprague-Dawley rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 255, n. 3, p. 261–270, 2011.

EGGEN, R. I. L. et al. Reducing the Discharge of Micropollutants in the Aquatic Environment: The Benefits of Upgrading Wastewater Treatment Plants. *Environmental Science & Technology*, v. 48, p. 7683–7689, 2014.

EMA - European Medicines Agency, Committee For Medicinal Products For Human Use— guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use Doc. Ref.: EMA/CHMP/SWP/4447/00 corr 2, London, 01 June, 2006

EURACHEM: The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics. Second Edition, 2014.

FAKTOR, J. et al. Identification and characterisation of pro-metastatic targets, pathways and molecular complexes using a toolbox of proteomic technologies. *Klinicka Onkologie*, v. 25, p. 2S70-2S77, 2012.

FARAJZADEH, M. A.; MOGADDAM, M. R. A. Air-assisted liquid-liquid microextraction method as a novel microextraction technique; Application in extraction and preconcentration of phthalate esters in aqueous sample followed by gas chromatography-flame ionization detection. *Analytica Chimica Acta*, v. 728, p. 31–38, 2012.

FIC, A. et al. Estrogenic and androgenic activities of TBBA and TBMEPH, metabolites of novel brominated flame retardants, and selected bisphenols, using the XenoScreen XL YES/YAS assay. *Chemosphere*, v. 112, p. 362–369, 2014

FIGUEIREDO, L. et al. Applications of molecularly imprinted polymers to the analysis and removal of personal care products: A review. *Talanta*, v. 146, p. 754–765, 2016.

FRISCHE, T. et al. Toxic masking and synergistic modulation of the estrogenic activity of chemical mixtures in a yeast estrogen screen (YES). *Environmental Science and Pollution Research*, v. 16, p. 593-603, 2009.

FÜRHACKER, M.; SCHARF, S.; WEBER, H. Bisphenol A: Emissions from point sources. *Chemosphere*, v. 41, n. 5, p. 751–756, 2000.

GAFFNEY, V. J. et al. Análise de fármacos em águas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS. *Química Nova*, v. 37, n. 1, p. 138–149, 2014.

GARCÍA-GALÁN, M. J.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Determination of 19 sulfonamides in environmental water samples by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS). *Talanta*, v. 81, n. 1–2, p. 355–366, 2010.

GAVRILESCU, M. et al. Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. Gavrilescu, Maria. *New Biotechnology*, v. 32, n. 1, p. 147–156, 2015.

GIESY, J. P. et al. Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 45, p. 3–16, 2002.

GIL TEJEDOR, A. M.; FERNÁNDEZ HERNANDO, P.; DURAND ALEGRÍA, J. S. A rapid fluorimetric screening method for the 1,4-benzodiazepines: Determination of their metabolite oxazepam in urine. *Analytica Chimica Acta*, v. 591, n. 1, p. 112–115, 2007.

GÓMEZ-HENS, A.; AGUILAR-CABALLOS, M. P. Social and economic interest in the control of phthalic acid esters. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, n. 11, p. 847–857, 2003.

GOSSET, A. et al. Identification and assessment of ecotoxicological hazards attributable to pollutants in urban wet weather discharges. *Environmental Science: Processes and Impacts*, v. 19, n. 9, p. 1150–1168, 2017.

GROS, M.; PETROVIC, M.. Tracing Pharmaceutical Residues of Different Therapeutic Classes in Environmental Waters by Using Liquid Chromatography / Quadrupole-Linear Ion Trap Mass Spectrometry and Automated Library Searching. *Analytical Chemistry*, v. 81, n. 3, p. 898–912, 2009.

GROS, M.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the Ebro Riber Basin (Northeast Spain). *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 26, n. 8, p. 1553–1562, 2007.

GUO, L. et al. Ecological risk assessment of bisphenol A in surface waters of China based on both traditional and reproductive endpoints. *Chemosphere*, v. 139, p. 133–137, 2015.

HAN, W. W.; YAKATAN, G. J.; MANESS, D. D. Kinetics and Mechanisms of Hidrolysis of 1,4-Benzodiazepines II: Oxazepam and Diazepam. *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 66, n. 4, p. 573–577, 1977.

HILL A. J.; TERAOKA H.; HEIDEMAN W. P. R. E. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Science*, v. 86, p. 6–19, 2005.

HIRSCH, R et al. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total Environment*, v. 225, p. 109–118, 1999.

HUERTA-FONTELA, M.; GALCERAN, M. T.; VENTURA, F. Fast liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and hormones in water resources. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, n. 25, p. 4212–4222, 2010.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008-Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos. 2016. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf>

ISO - International Organization for Standardization, International Standard: Water quality - Determination of chronic toxicity to *Ceriodaphnia dubia*, Switzerland, 2008.

JANNUZZI, Flávia. Testes revelam que quantidade de geosmina na água da Cedae aumentou em fevereiro. *Portal G1*, Rio de Janeiro, fev. 2020. Disponível em: <<https://g1.globo.com/rj/rio-de-janeiro/noticia/2020/02/08/testes-revelam-que-quantidade-de-geosmina-na-agua-da-cedae-aumentou-em-fevereiro.ghtml>>. Acesso em: 16 mar. 2020.

JOHNSON, R. J. et al. Metabolic and Kidney Diseases in the Setting of Climate Change, Water Shortage, and Survival Factors. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 27, n. 8, p. 2247–2256, 2016.

KABIR, E. R.; RAHMAN, M. S.; RAHMAN, I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 40, p. 241–258, 2015.

KANAUIYA, D. K. et al. Biological Treatment Processes for the Removal of Organic Micropollutants from Wastewater: a Review. *Current Pollution Reports*, v. 5, p. 112–128, 2019.

KAPLAN, S. A. et al. Pharmacokinetic Profiles of Clonazepam in Dog and Humans and of Flunitrazepam in Dog. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 63, n. 4, p. 527–532, 1974.

KOSTICH, M. S.; BATT, A. L.; LAZORCHAK, J. M. Concentrations of prioritized pharmaceuticals in effluents from 50 large wastewater treatment plants in the US and implications for risk estimation. *Environmental Pollution*, v. 184, p. 354–359, 2014.

KÜMMERER, Klaus. Antibiotics in the aquatic environment: a review . *Chemosphere*, Part I, v. 75, n. 4, p. 417–434, 2009.

KUNISUE, T. et al. Urinary concentrations of benzophenone-type UV filters in U.S. women and their association with endometriosis. *Environmental Science and Technology*, v. 46, n. 8, p. 4624–4632, 2012.

KURKO, T. A. T. et al. Long-term use of benzodiazepines: Definitions, prevalence and usage patterns - A systematic review of register-based studies. *European Psychiatry*, v. 30, n. 8, p. 1037–1047, 2015.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? *Scientia Chromatographica*, v. 1, n. 2, p. 35–61, 2009.

LEITE, F. Validação em análise química. Campinas: Editora Átomo, 2008.

LEITE, G. S.; AFONSO, R. J. C. F.; AQUINO, S. F. Caracterização de contaminantes presentes em sistemas de tratamento de esgotos, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem em alta resolução. *Química Nova*, v. 33, n. 3, p. 734–738, 2010.

LI, T. et al. Spatial-temporal distribution of phthalate esters from riverine outlets of Pearl River Delta in China. *Water Science and Technology*, v. 71, n. 2, p. 183–190, 2015.

LI, W. et al. Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China. *Chemosphere*, v. 89, n. 11, p. 1307–1315, 2012.

LI, Z. et al. Analytical Methods Simultaneous determination of seven residual pharmaceuticals in wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry with a switching ionization mode. *Analytical Methods*, v. 6, p. 9045–9052, 2014.

LLORCA, M. et al. Sample preservation for the analysis of antibiotics in water. *Journal of Chromatography A*, v. 1369, p. 43–51, 2014.

LUO, Y. et al. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, v. 473–474, p. 619–641, 2014.

MADIKIZELA, L. M.; CHIMUKA, L. Determination of ibuprofen, naproxen and diclofenac in aqueous samples using a multi-template molecularly imprinted polymer as selective adsorbent for solid-phase extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 128, p. 210–215, 2016.

MAGALHÃES, E. J. Desenvolvimento de métodos para quantificação de drogas em matrizes de interesse forense. 2012. 126 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciência Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

MASTERS, J. A et al. Validation of a four-day *Ceriodaphnia* toxicity test and statistical considerations in data analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 10, n. 1, p.47-55, 1991.

MARTÍNEZ BUENO, M. J. et al. Application of Liquid Chromatography / Quadrupole-Linear Ion Trap Mass Spectrometry and Time-of-Flight Mass Spectrometry to the Determination of Pharmaceuticals and Related Contaminants in Wastewater. *Analytical Chemistry*, v. 79, p. 9372–9384, 2007.

MARTÍNEZ BUENO, M. J. et al. Pilot survey of chemical contaminants from industrial and human activities in river waters of Spain. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v. 90, n. 3–6, p. 321–343, 2010.

MARTINS, D. V. R. Avaliação ecotoxicológica de efluentes de celulose branqueada de eucalipto ao longo do tratamento biológico. 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

MASTROIANNI, N. et al. Occurrence of drugs of abuse in surface water from four Spanish river basins: Spatial and temporal variations and environmental risk assessment. *Journal of Hazardous Materials*, v. 316, p. 134–142, 2016.

MATTHIESSEN, P. et al. Contamination of headwater streams in the United Kingdom by oestrogenic hormones from livestock farms. *Science of the Total Environment*, v. 367, n. 2–3, p. 616–630, 2006.

MCCLEAN, S et al. Determination of 1,4-benzodiazepines and their metabolites by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography using ultraviolet and electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 838, p. 273–291, 1999.

MENDES, S. V. B. Efeitos do meio de cultivo sobre a sobrevivência, reprodução e sensibilidade de *Ceriodaphnia dubia*. 20002. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

MENDOZA, A. et al. Drugs of abuse and benzodiazepines in the Madrid Region (Central Spain): Seasonal variation in river waters, occurrence in tap water and potential

- environmental and human risk. *Environment International*, v. 70, p. 76–87, 2014.
- MÍNGUEZ-ALARCÓN, L.; HAUSER, R.; GASKINS, A. J. Effects of bisphenol A on male and couple reproductive health: a review. *Fertility and Sterility*, v. 106, n. 4, p. 864–870, 2016.
- MITRA, S. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. New Jersey: John-Wiley & Sons, 2003. 473 p
- MIYAGUCHI, H. et al. A method for screening for various sedative-hypnotics in serum by liquid chromatography/single quadrupole mass spectrometry. *Forensic Science International*, v. 157, n. 1, p. 57–70, 2006.
- NAM, S. et al. Adsorption characteristics of selected hydrophilic and hydrophobic micropollutants in water using activated carbon. *Journal of Hazardous Materials*, v. 270, p. 144–152, 2014.
- NUNES, B. S.; BASTOS, F. M. Efeitos colaterais atribuídos ao uso indevido e prolongado de benzodiazepínicos. *Revista Acadêmica do Instituto de Ciência da Saude*, v. 3, n. 1, p. 71–82, 2016.
- NUNES, C. N. et al. New approach to the determination of contaminants of emerging concern in natural water: study of alprazolam employing adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 407, n. 20, p. 6171–6179, 2015.
- PADHYE, L. P. et al. Year-long evaluation on the occurrence and fate of pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disrupting chemicals in an urban drinking water treatment plant. *Water Research*, v. 51, p. 266–276, 2014.
- PAÍGA, P. et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Development of a SPE – UHPLC – MS / MS methodology for the determination of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in seawater. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 106, p. 61–70, 2015.
- PALMA, C. et al. Ibuprofen-arginine generates nitric oxide and has enhanced anti-inflammatory effects. *Pharmacological Research*, v. 60, n. 4, p. 221–228, 2009.
- PARZYCH, A. et al. Evaluation of urban environment pollution based on the accumulation of macro- and trace elements in epiphytic lichens. *Journal of Environmental Science and Health - Part A*, v. 51, n. 4, p. 297–308, 2016.
- PETECCI, G. P. et al. Ecotoxicological risk assessment due to the presence of bisphenol A and caffeine in surface waters in the Sinos River Basin - Rio Grande do Sul - Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 79, n. 4, p. 712–721, 2019.
- PETRIE, B. et al. Multi-residue analysis of 90 emerging contaminants in liquid and solid environmental matrices by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1431, p. 64–78, 2015.
- PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; ESCARRONE, A. L. V. Multi-residue analytical methods

for the determination of pesticides and PPCPs in water by LC-MS/MS: A review. *Central European Journal of Chemistry*, v. 10, n. 3, p. 876–899, 2012.

QUINN, P.J. et al. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512 p.

REBELO, R. M.; CALDAS, E. D. Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de agrotóxicos. *Química Nova*, v. 37, n. 7, p. 1199 - 1208, 2014.

REEVE, E. et al. A systematic review of interventions to deprescribe benzodiazepines and other hypnotics among older people. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 73, n. 8, p. 927–935, 2017.

REGINATTO, V. Avaliação do ensaio de toxicidade com a alga *Scenedesmus subspicatus* para o estudo de efluentes industriais. 1998. 137 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

RENNER, R. European bans on surfactant trigger transatlantic debate. *Environmental Science & Technology*, v. 31, n. 7, p. 316A–20A, 1997.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIBO, J. M. Interlaboratory comparison studies of the luminescent bacteria toxicity bioassay. *Environmental Toxicology and Water Quality*, v. 12, p. 263. 1997.

RODRÍGUEZ-GÓMEZ, R. et al. Determination of benzophenone-UV filters in human milk samples using ultrasound-assisted extraction and clean-up with dispersive sorbents followed by UHPLC – MS / MS analysis. *Talanta*, v. 134, p. 657–664, 2015.

ROSAL, R. et al. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Research*, v. 44, n. 2, p. 578–588, 2010.

ROSSMANN, J. et al. Simultaneous determination of most prescribed antibiotics in multiple urban wastewater by SPE-LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, v. 969, p. 162–170, 2014.

ROUTLEDGE, E.J.; SUMPTER, J.P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 15, n. 3, p. 241–248, 1996.

RUTISHAUSER B.V. et al. Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three in vitro assays and chemical analysis of steroids. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 23, n. 4, p. 857– 864, 2004

SEACHRIST, D. D. et al. A review of the carcinogenic potential of bisphenol A. *Reproductive Toxicology*, v. 59, p. 167–182, 2016.

SABINO, J. A. Avaliação de risco ecológico decorrente da presença de micropoluentes na

sub-bacia hidrográfica urbanizada do rio João Mendes, Niterói - RJ. 2018. 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

SALOMÃO, et al. Effects of Single and Mixed Estrogens on Single and Combined Cultures of *D. subspicatus* and *P. subcapitata*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 93, p. 215–221. 2014

SELVARAJ, K. K. et al. GC-MS determination of bisphenol A and alkylphenol ethoxylates in river water from India and their ecotoxicological risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 99, p. 13–20, 2014.

SILVA, et al. Alquilfenóis e alquilfenóis etoxilados: uma visão ambiental. *Revista Brasileira de Toxicologia*, vol. 20, n. 1, p.1-12, 2007.

SILVA, G. G. M. Avaliação da qualidade de águas superficiais e de sedimentos quanto à toxicidade e atividade estrogênica. 2015. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

SILVA, J. A. *Dissolução de comprimidos*: estudo comparativo de apresentações genéricas contendo diazepam. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2013. 41 p.

SILVEIRA, M. A. K. et al. Quantification of pharmaceuticals and personal care product residues in surface and drinking water samples by SPE and LC-ESI-MS/MS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 24, n. 9, p. 1385–1395, 2013.

SOARES, A. et al. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*, v. 34, n. 7, p. 1033–1049, 2008.

SOLÉ, M. et al. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the catalonian area (NE Spain). *Environmental Science and Technology*, v. 34, n. 24, p. 5076–5083, 2000.

SOUZA, R. R. et al. Determinação de plastificantes em água potável utilizando cromatografia gasosa e espectrometria de massas. *Química Nova*, v. 35, n. 7, p. 1453–1458, 2012.

STAPLES, C. A. et al. A review of the environmental fate, effects and exposures of Bisphenol A. *Chemosphere*, v. 36, n. 10, p. 2149–2173, 1998.

STIPANIČEV, D. et al. Broad spectrum screening of 463 organic contaminants in rivers in Macedonia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 135, p. 48–59, 2017.

TAN, E. S. S. et al. Simultaneous extraction and determination of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in river water and sewage by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v. 95, n. 9, p. 816–832, 2015.

TRAN, N. H.; HU, J.; ONG, S. L. Simultaneous determination of PPCPs, EDCs, and arti fi

cial sweeteners in environmental water samples using a single-step SPE coupled with HPLC – MS / MS and isotope dilution. *Talanta*, v. 113, p. 82–92, 2013.

TSUME, Y. et al. In silico prediction of drug dissolution and absorption with variation in intestinal pH for BCS class II weak acid drugs : ibuprofen and ketoprofen. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, v. 33, n. 7, p. 366–377, 2012.

TUCCI, C. E. M. Águas Urbanas. *Estudos Avançados*, v. 22, n. 63, p. 97–112, 2008.

TUNDISI, J. G. Recursos hídricos no futuro: problemas e soluções. *Estudos avançados*, v. 22, n. 63, p. 7–16, 2008.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Aquatic life ambient water quality criteria - Nonylphenol. Washington, 96 p., 2005. Disponível em: <<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P1004WZW.PDF?Dockey=P1004WZW.PDF>>. Acessado em 13/05/2017.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. *Definition and Procedure for the Determination of the Method Detection Limit* - Revision 2. Washington, 8 p., 2016a. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-12/documents/mdl-procedure_rev2_12-13-2016.pdf>. Acesso em: 13 mai. 2017.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. *Method 542: Determination of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC/ESI-MS/MS)*. Washington, 39 p., 2016b. Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-09/documents/method-542-determination-pharmaceuticals-personal-care-products-drinking-water.pdf>>. Acesso em: 18 ago. 2018.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. *National primary drinking water regulations*. Washington. 2009. Disponível em: <<https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations>>. Acesso em: 25 abr. 2018.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. *SW 846 - Determinative Chromatographic Separations*. Washington. 2018. Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/8000d.pdf>>. Acesso em: 20 abr. 2018.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. *The Fourth Unregulated Contaminant Monitoring Rule (UCMR 4)*. Washington. 2017. Disponível em: <<https://www.epa.gov/dwucmr/fourth-unregulated-contaminant-monitoring-rule>>. Acesso em: 25 set. 2019.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. *The Third Unregulated Contaminant Monitoring Rule (UCMR 3)*. Washington. 2012. Disponível em: <<https://www.epa.gov/dwucmr/data-summary-third-unregulated-contaminant-monitoring-rule>>. Acesso em: 25 set. 2019.

VALCÁRCEL, Y. et al. Seasonal variation of pharmaceutically active compounds in surface (Tagus River) and tap water (Central Spain). *Environmental Science and Pollution Research*, v. 20, n. 3, p. 1396–1412, 2013.

VALLE-SISTAC, J. et al. Determination of parabens and benzophenone-type UV filters in human placenta: First description of the existence of benzyl paraben and benzophenone-4. *Environment International*, v. 88, p. 243–249, 2016.

VANDERFORD, B. J.; SNYDER, S. A. Analysis of pharmaceuticals in water by isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Environmental Science and Technology*, v. 40, n. 23, p. 7312–7320, 2006.

VEGA-MORALES, T.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. Determination of alkylphenol polyethoxylates, bisphenol-A, 17 α -ethynylestradiol and 17 β -estradiol and its metabolites in sewage samples by SPE and LC/MS/MS. *Journal of Hazardous Materials*, v. 183, n. 1–3, p. 701–711, 2010.

VELA-SORIA, F. et al. A new method for the determination of benzophenone-UV filters in human serum samples by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, v. 121, p. 97–104, 2014.

VERGEYNST, L. et al. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography-magnetic sector mass spectrometry: Method quality assessment and application in a Belgian case study. *Chemosphere*, v. 119, p. S2–S8, 2015.

VERSTEEG, D. J. et al. *Ceriodaphnia* and *Daphnia*: a comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. *Chemosphere*, v. 34, n. 4, p.869-892, 1997.

VIECELLI, N. C. et al. Quantitative analysis of plasticizers in a wastewater treatment plant: Influence of the suspended solids parameter. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, n. 6, p. 1150–1155, 2011.

VIEIRA, E. M. et al. Concentração de nitrato em águas superficiais e sua correlação com agricultura e o despejo de esgoto bruto: estudo de caso da represa de Nova Ponte - MG. *Revista Brasileira de Geografia Física*, v. 09, p. 2121–2132, 2016.

WANG, H. et al. Deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of ultraviolet filters in water samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1516, p. 1–8, 2017.

WINNER, R. W. Evaluation of the relative sensitivities of 7-D *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* toxicity tests for cadmium and sodium pentachlorophenate. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 7, n. 2, p.153-159, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Guidelines for Drinking-water Quality*. 3ed. Geneva: WHO Library, 2008.

WRIGHT-WALTERS, M. et al. An updated weight of evidence approach to the aquatic hazard assessment of Bisphenol A and the derivation a new predicted no effect concentration

(PNEC) using a non-parametric methodology. *Science of the Total Environment*, v. 409, n. 4, p. 676–685, 2011.

WU, M H. et al. Pollution patterns and underlying relationships of benzophenone-type UV-filters in wastewater treatment plants and their receiving surface water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 152, n. 2017, p. 98–103, 2018.

XUE, X. Y. et al. Nanomaterials for water pollution monitoring and remediation. *Environmental Chemistry Letters*, v. 15, n. 1, p. 23–27, 2017.

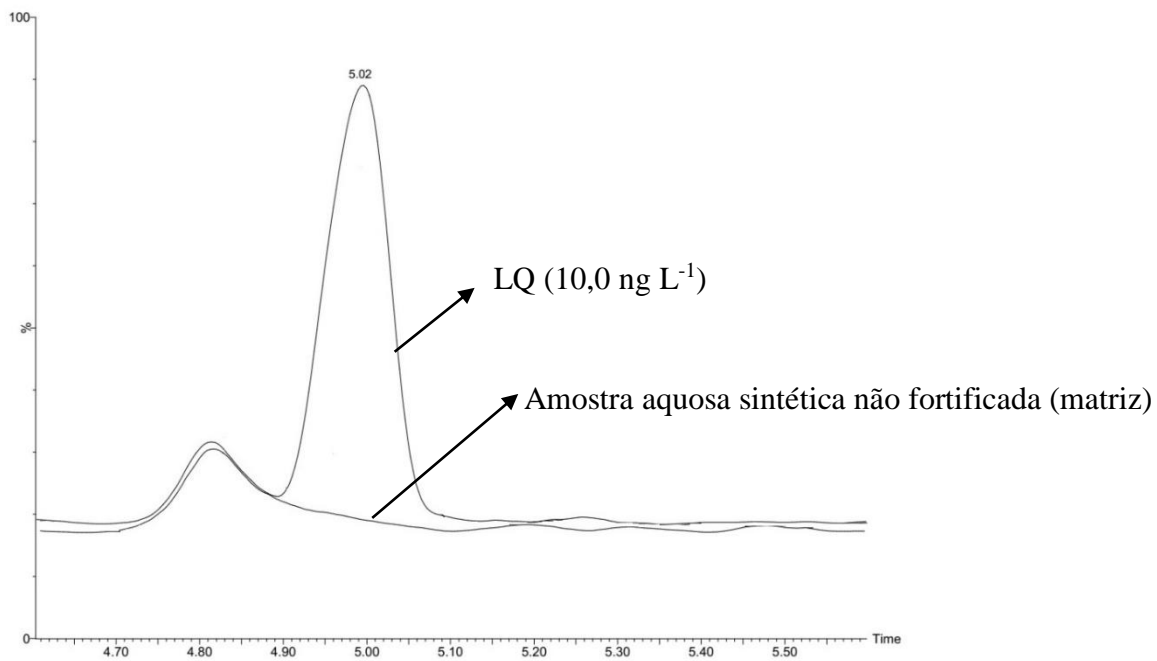
YAN, C. et al. Antibiotics in the surface water of the Yangtze Estuary: occurrence, distribution and risk assessment. *Environmental pollution*, v. 175, p. 22–9, 2013.

YANG, W.; ZHOU, H.; CICEK, N. Treatment of organic micropollutants in water and wastewater by UV-based processes: A literature review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 44, n. 13, p. 1443–1476, 2014.

ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A. et al. Determination of nonylphenol and short-chained nonylphenol ethoxylates in drain water from an agricultural area. *Chemosphere*, v. 75, n. 4, p. 513–518, 2009.

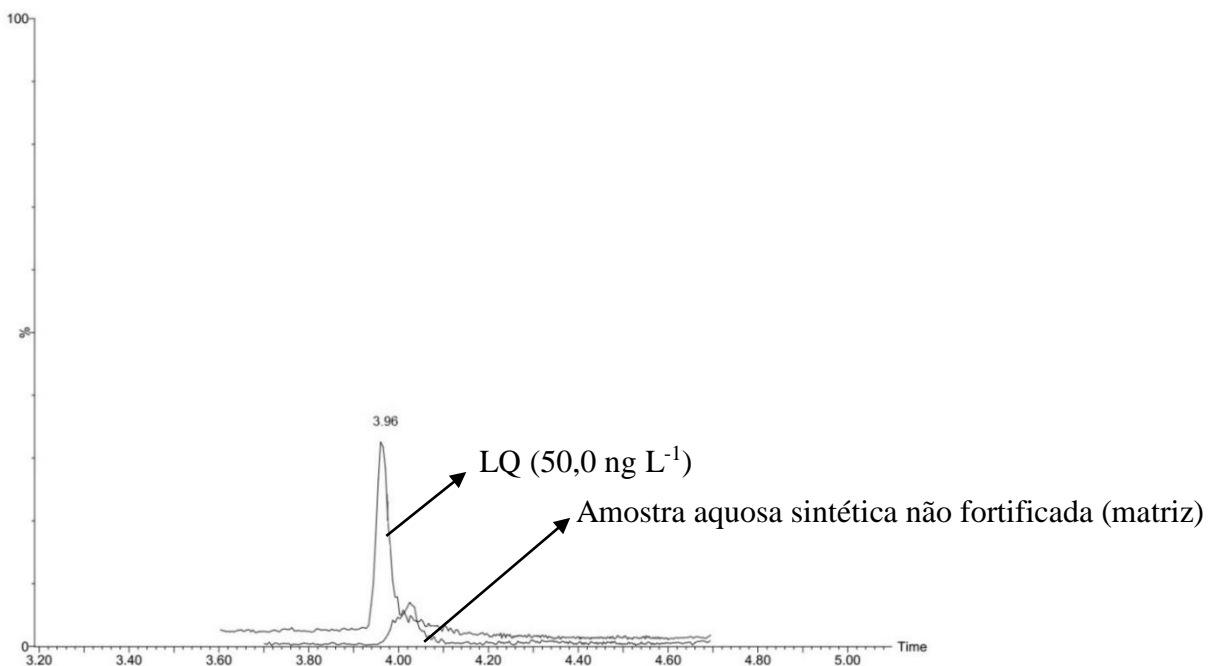
APÊNDICE A - Avaliação seletividade

Figura 46 - Cromatograma, no modo TIC, para o 4NP comprovando a seletividade



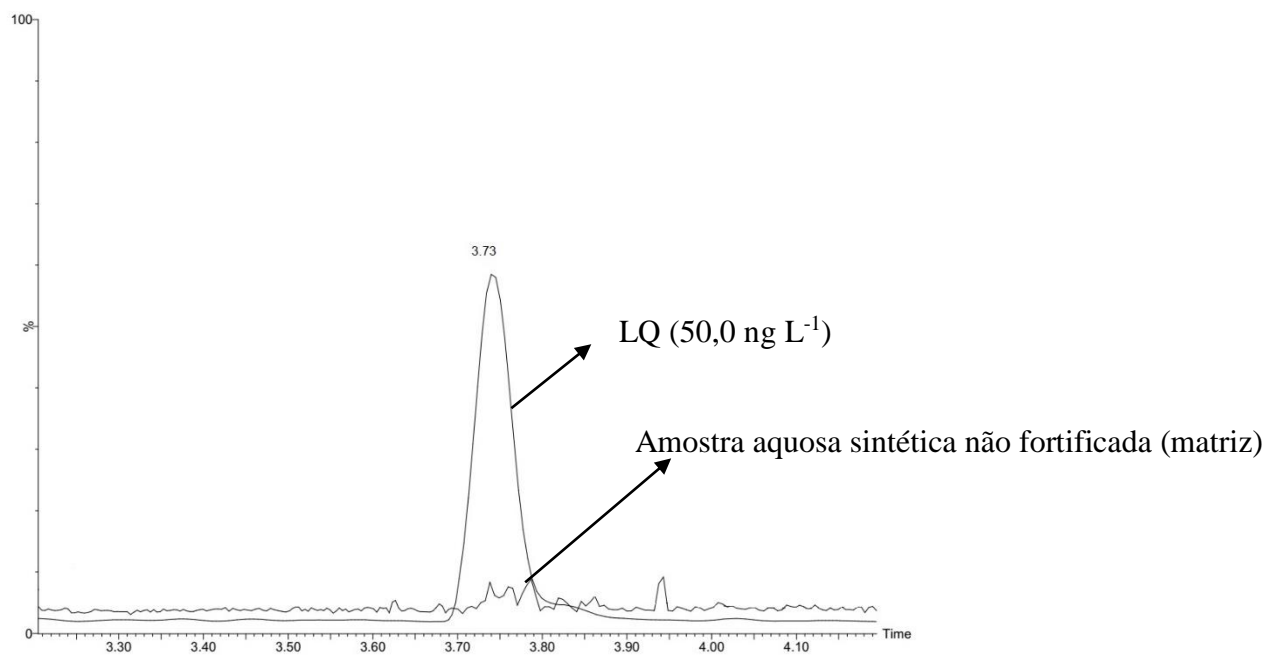
Fonte: Autor

Figura 47 - Cromatograma, no modo TIC, para o BEN comprovando a seletividade



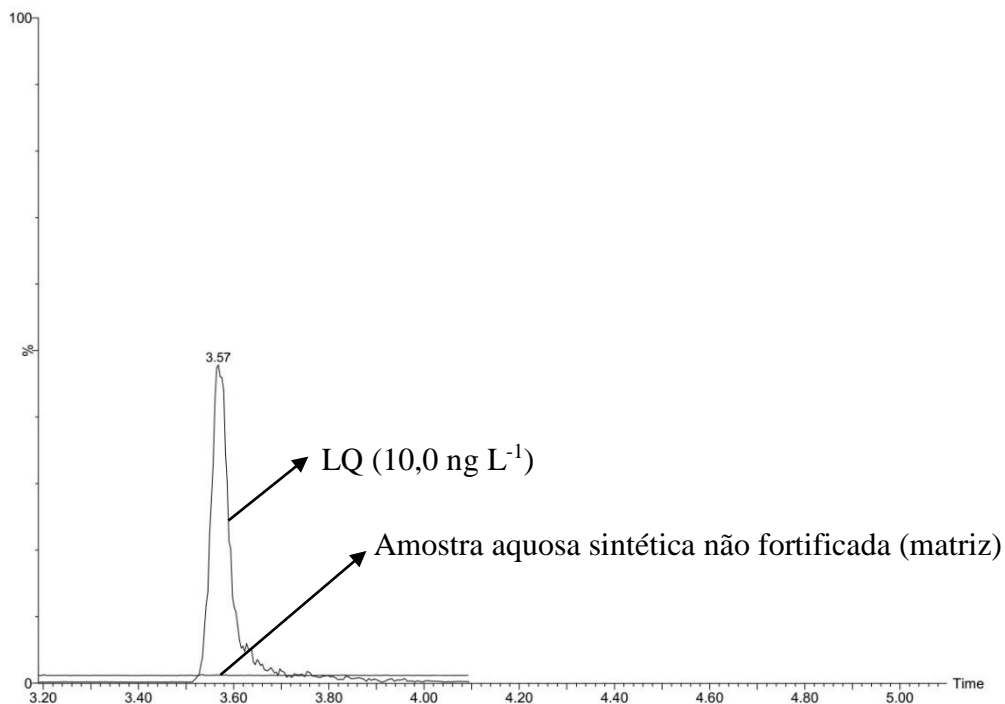
Fonte: Autor

Figura 48 - Cromatograma, no modo TIC, para o BPA comprovando a seletividade



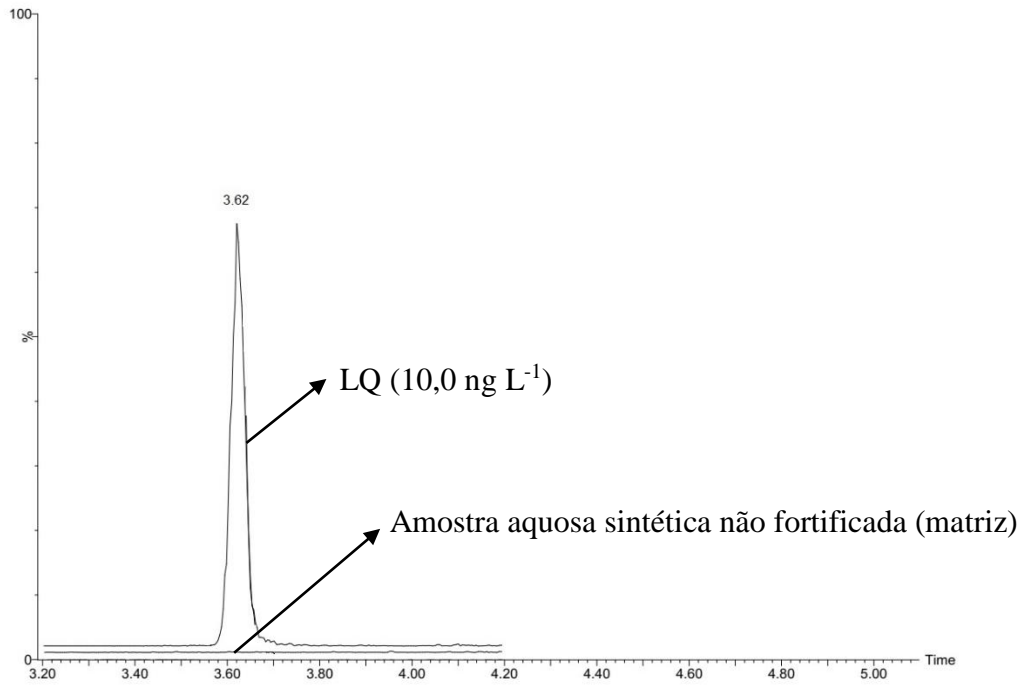
Fonte: Autor

Figura 49 - Cromatograma, no modo TIC, para o BZP comprovando a seletividade



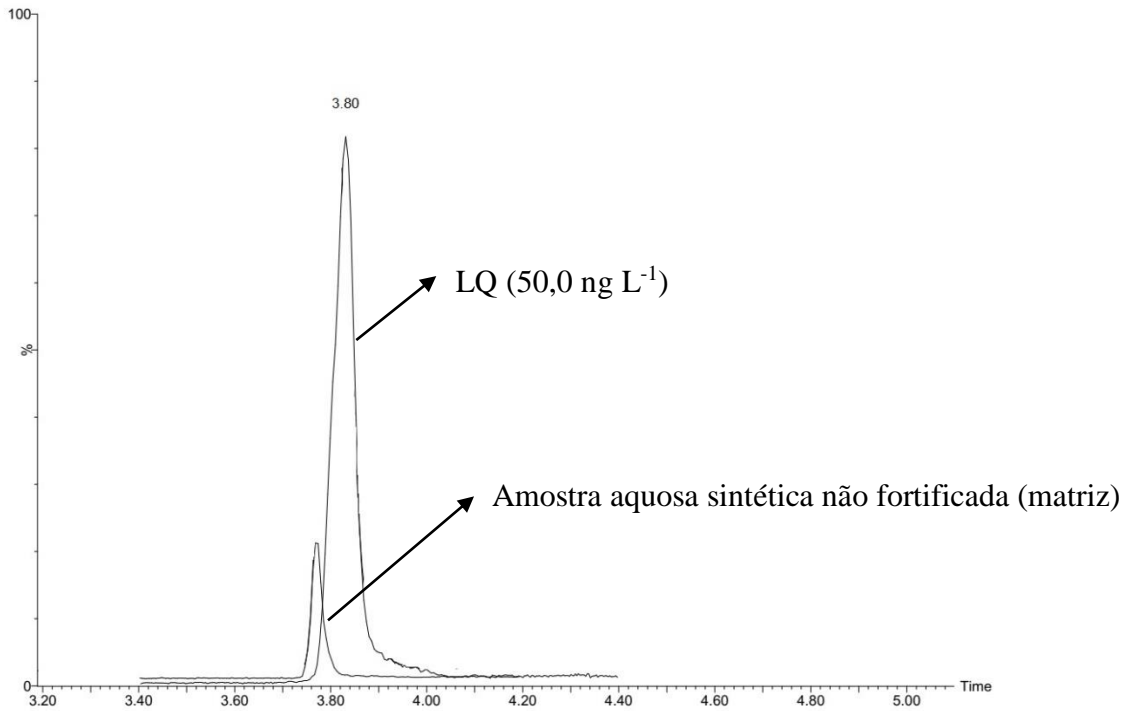
Fonte: Autor

Figura 50 - Cromatograma, no modo TIC, para o CZP comprovando a seletividade



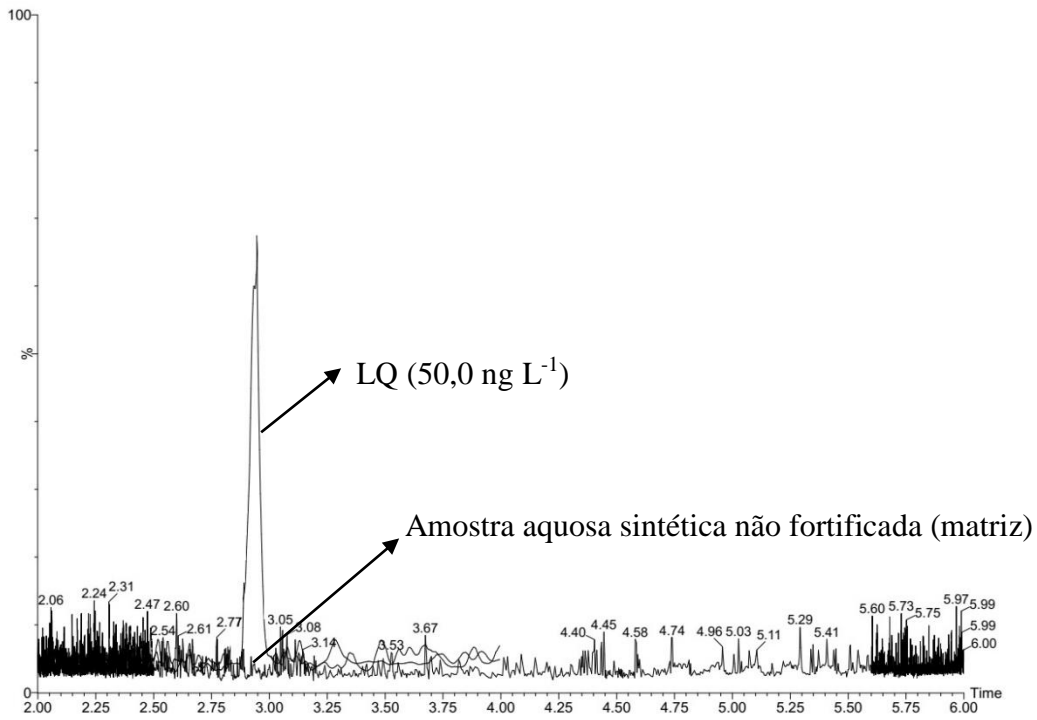
Fonte: Autor

Figura 51 - Cromatograma, no modo TIC, para o DEP comprovando a seletividade



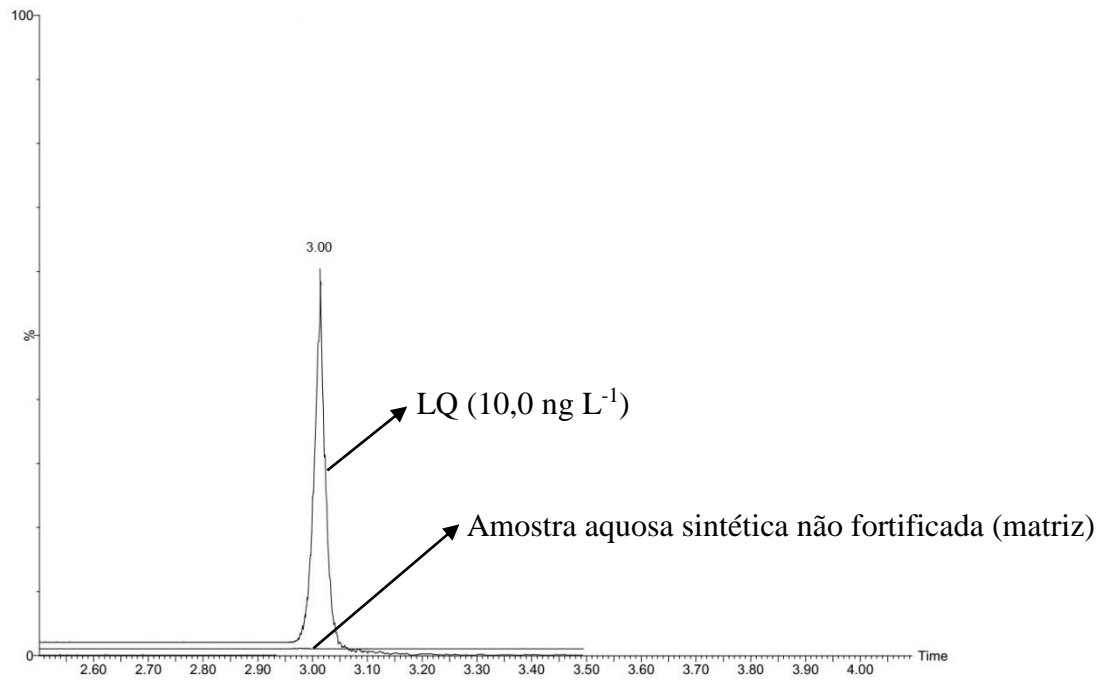
Fonte: Autor

Figura 52 - Cromatograma, no modo TIC, para o IBP comprovando a seletividade



Fonte: Autor

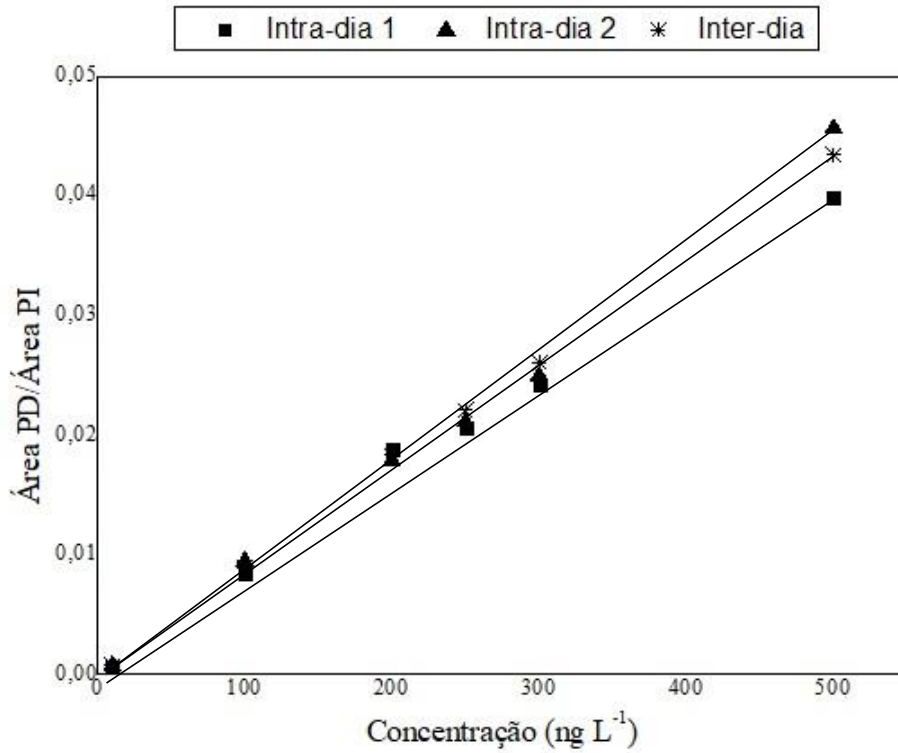
Figura 53 - Cromatograma, no modo TIC, para o BEN comprovando a seletividade



Fonte: Autor

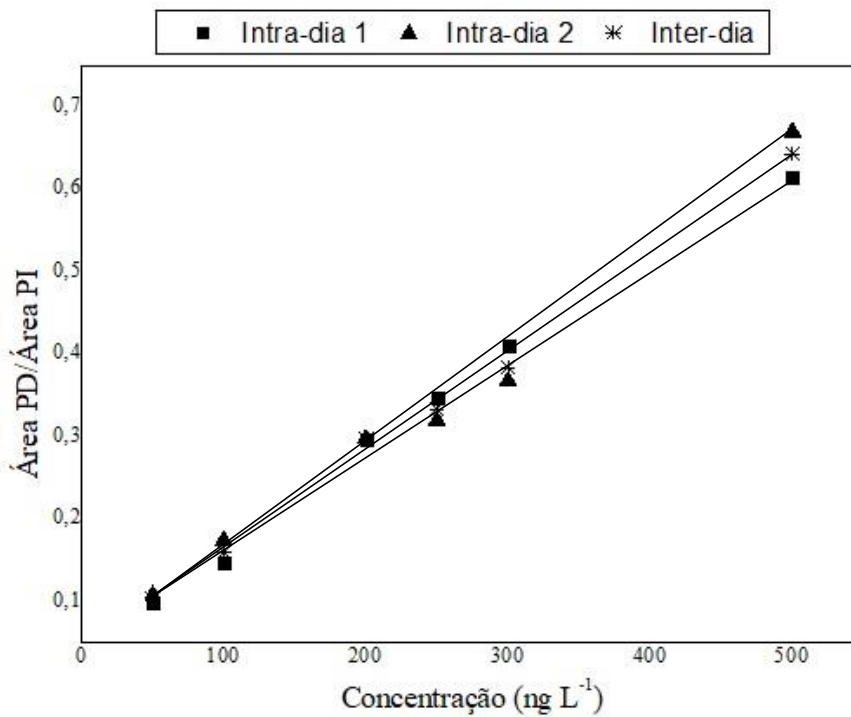
APÊNDICE B - Linearidade

Figura 54 - Curvas analíticas (Intra-dia 1, Intra-dia 2 e Inter-dia) para o 4NP



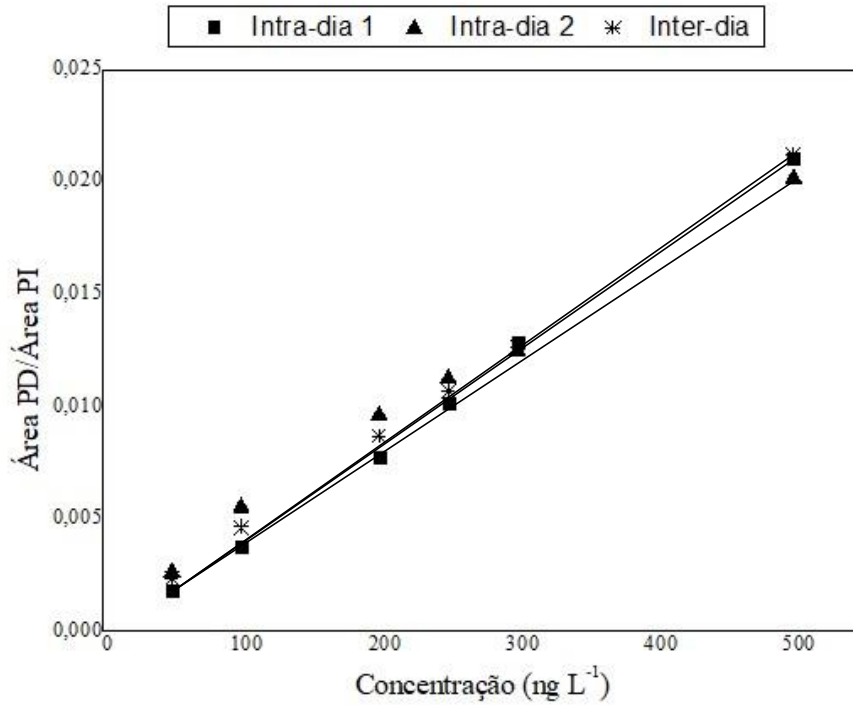
Fonte: Autor

Figura 55 - Curvas analíticas (Intra-dia 1, Intra-dia 2 e Inter-dia) para o BEN



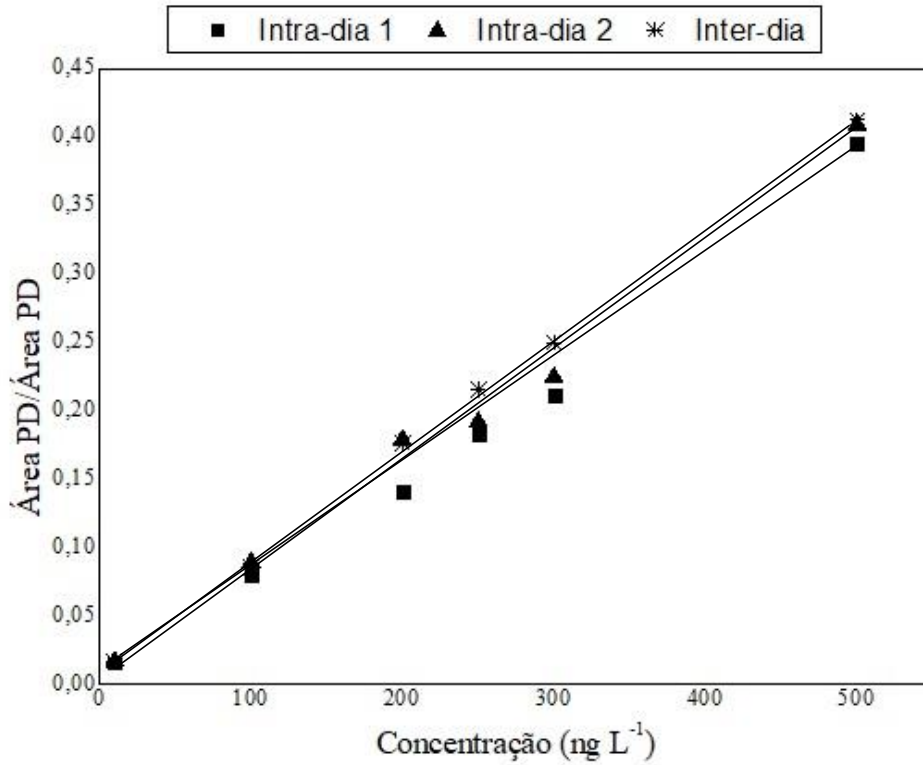
Fonte: Autor

Figura 56 - Curvas analíticas (Intra-dia 1, Intra-dia 2 e Inter-dia) para o BPA



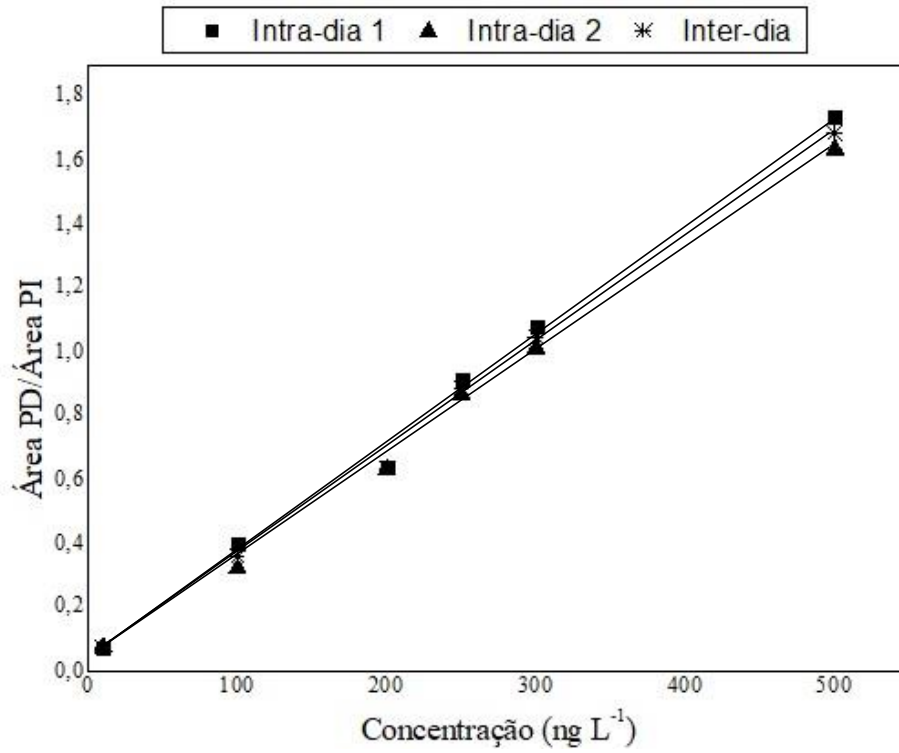
Fonte: Autor

Figura 57 - Curvas analíticas (Intra-dia 1, Intra-dia 2 e Inter-dia) para o BZP



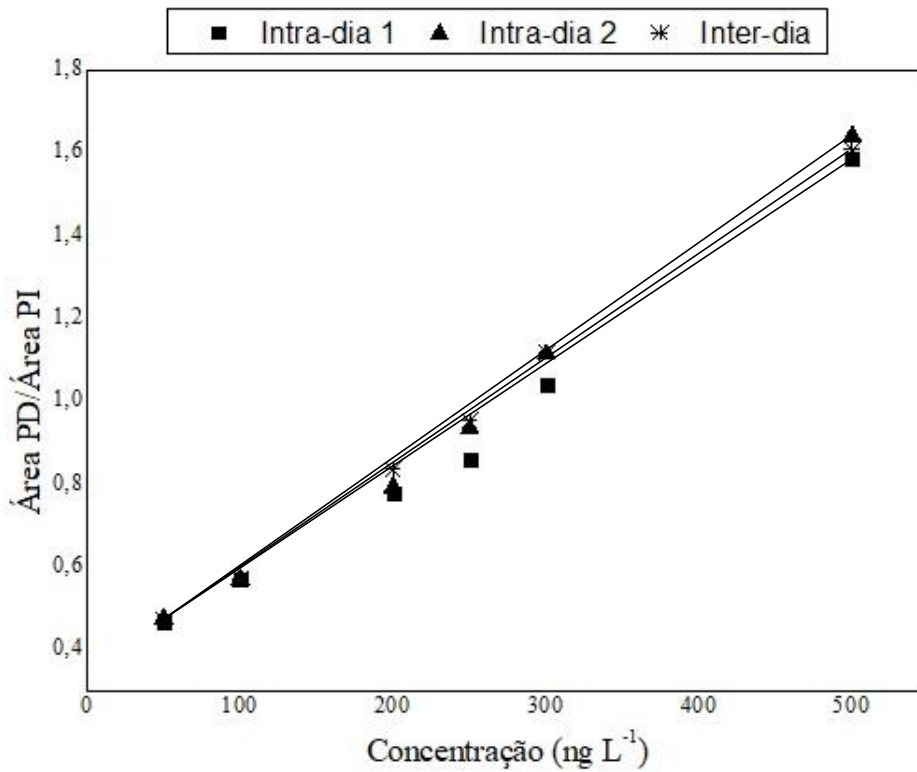
Fonte: Autor

Figura 58 - Curvas analíticas (Intra-dia 1, Intra-dia 2 e Inter-dia) para o CZP



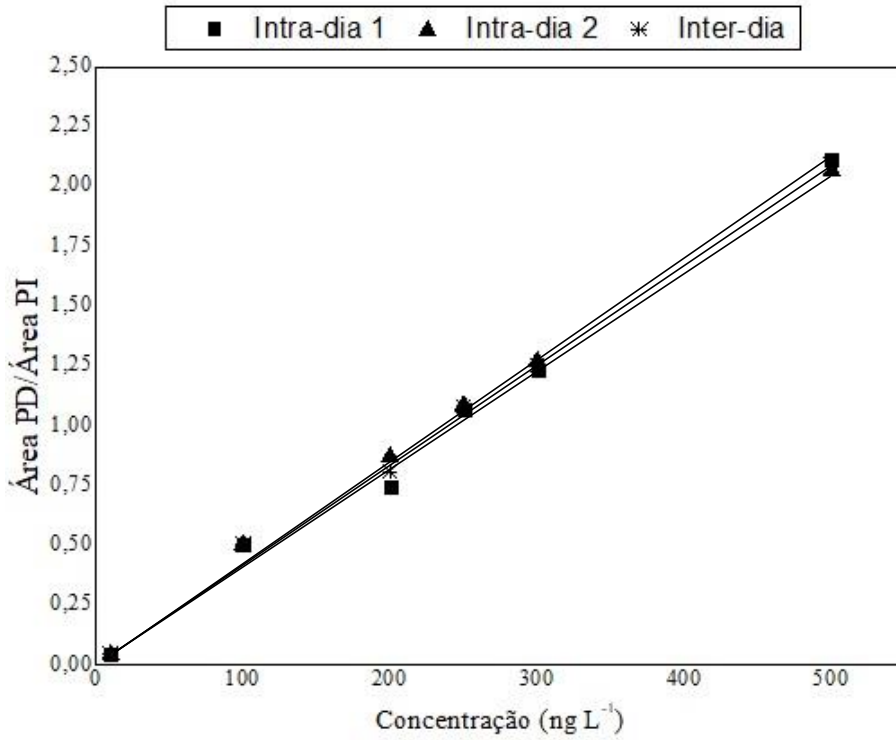
Fonte: Autor

Figura 59 - Curvas analíticas (Intra-dia 1, Intra-dia 2 e Inter-dia) para o DEP



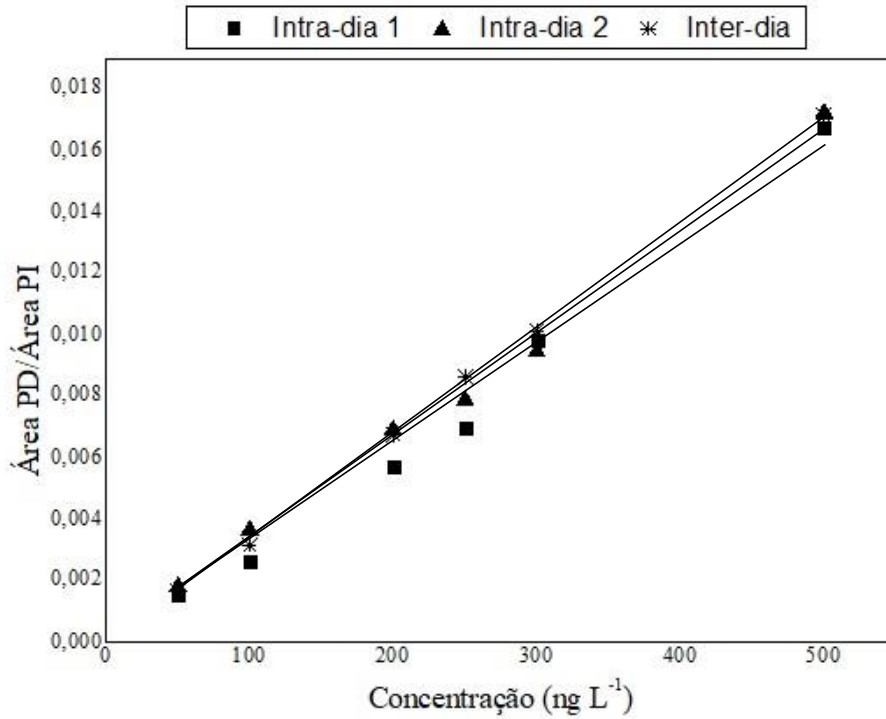
Fonte: Autor

Figura 60 - Curvas analíticas (Intra-dia 1, Intra-dia 2 e Inter-dia) para o DZP



Fonte: Autor

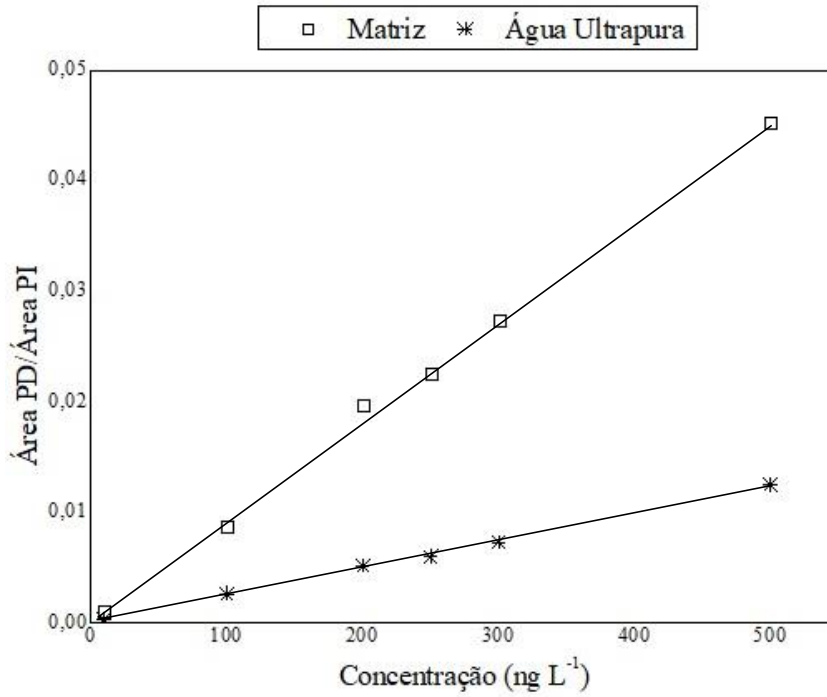
Figura 61 - Curvas analíticas (Intra-dia 1, Intra-dia 2 e Inter-dia) para o IBP



Fonte: Autor

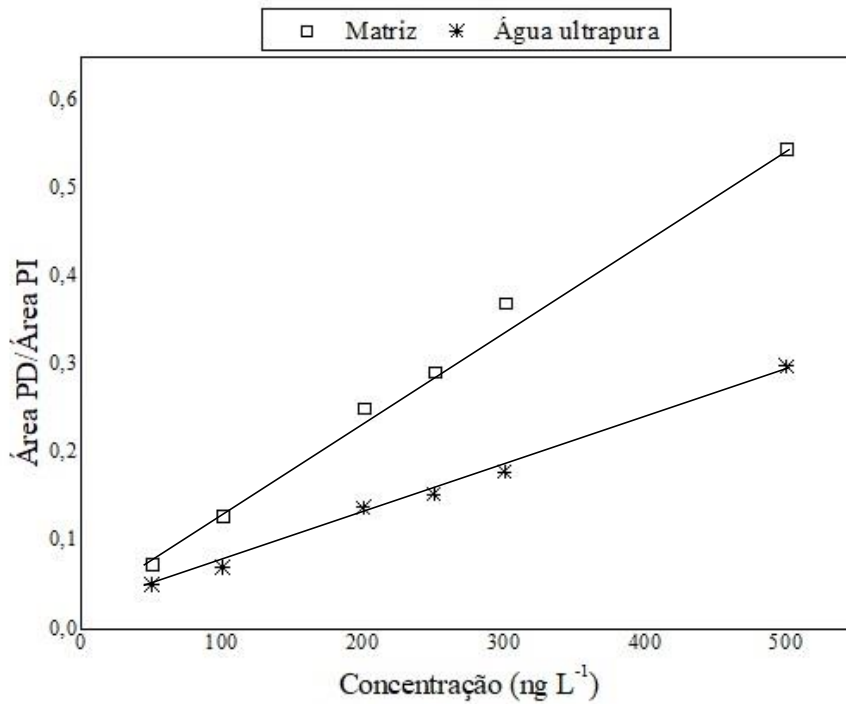
APÊNDICE C – Efeito de matriz

Figura 62 - Curvas analíticas das amostras aquosas sintéticas para o 4NP



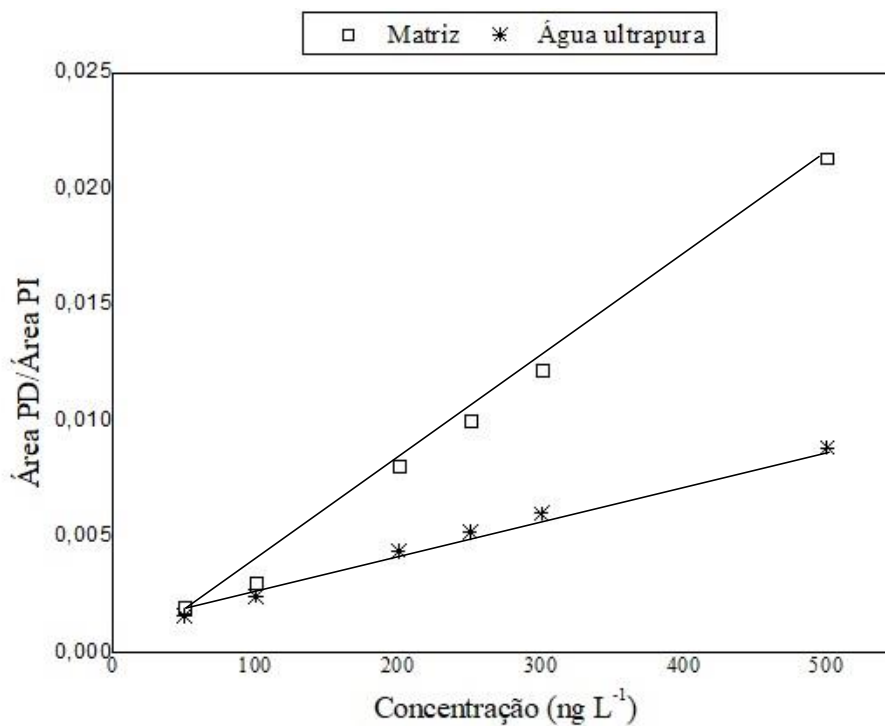
Fonte: Autor

Figura 63 - Curvas analíticas das amostras aquosas sintéticas para a BEN



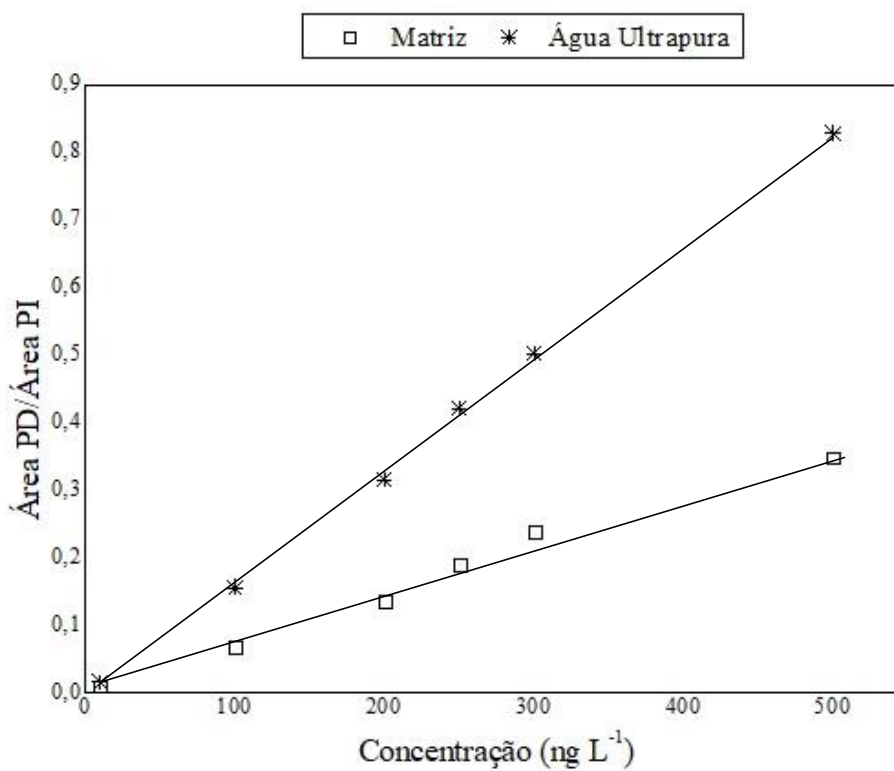
Fonte: Autor

Figura 64 - Curvas analíticas das amostras aquosas sintéticas para o BPA



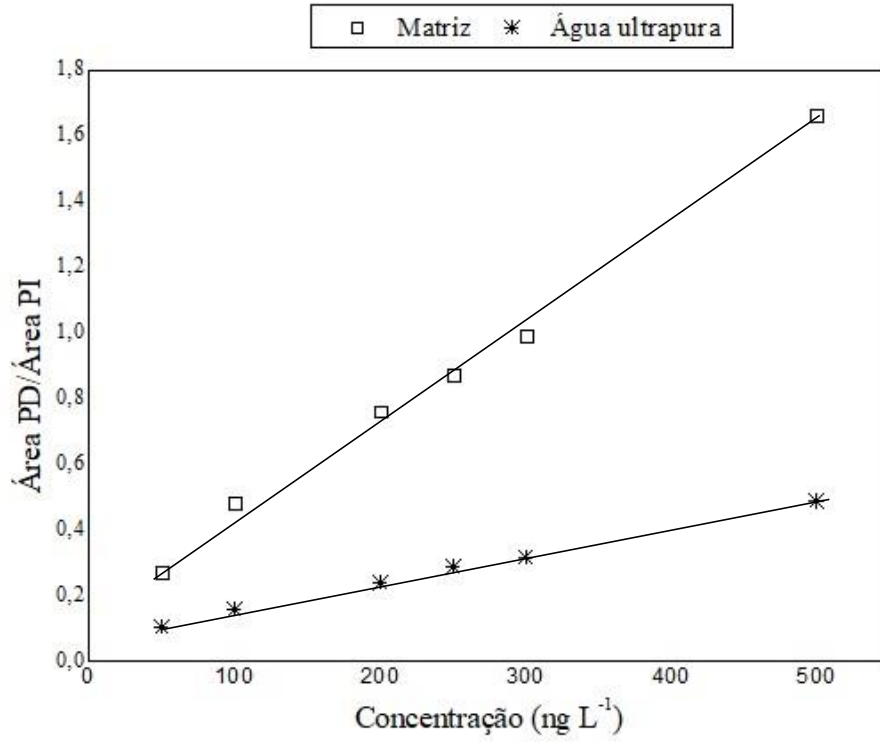
Fonte: Autor

Figura 65 - Curvas analíticas das amostras aquosas sintéticas para o BZP



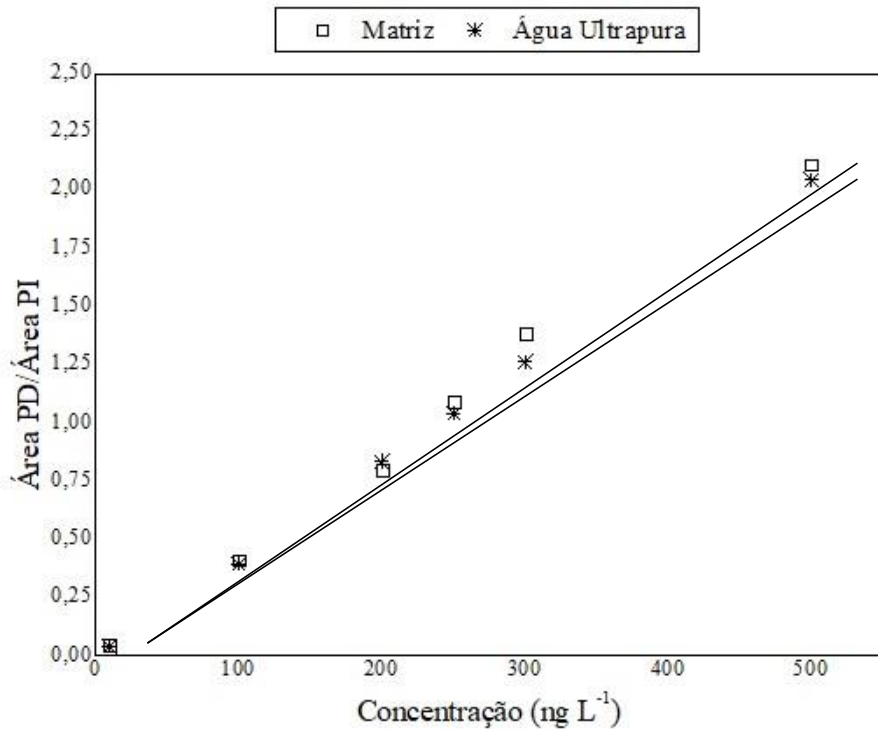
Fonte: Autor

Figura 66 - Curvas analíticas das amostras aquosas sintéticas para o DEP



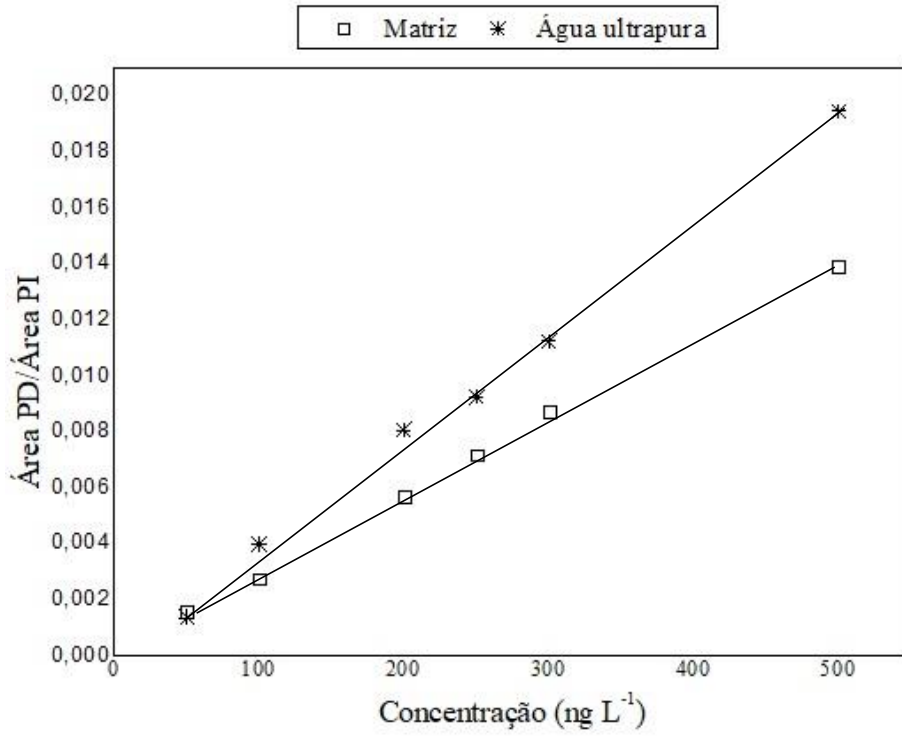
Fonte: Autor

Figura 67 - Curvas analíticas das amostras aquosas sintéticas para o DZP



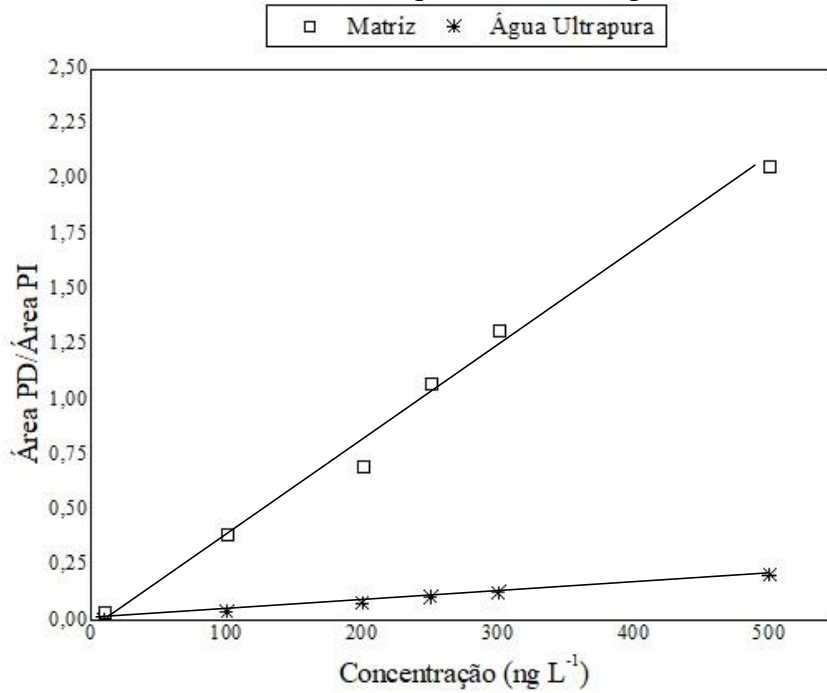
Fonte: Autor

Figura 68 - Curvas analíticas das amostras aquosas sintéticas para o IBP



Fonte: Autor

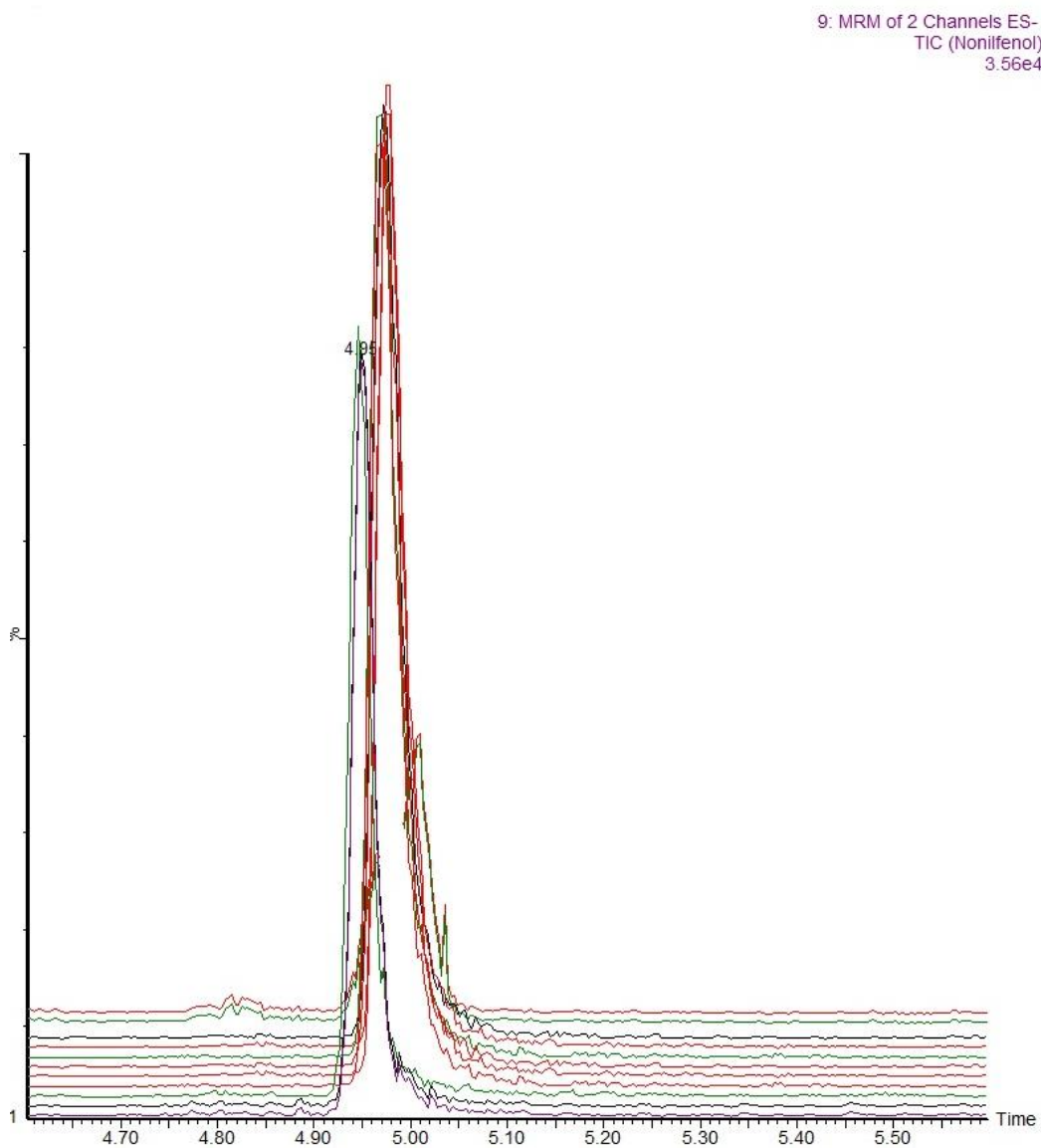
Figura 69 - Curvas analíticas das amostras aquosas sintéticas para o TMP



Fonte: Autor

APÊNDICE D - Validade das amostras I

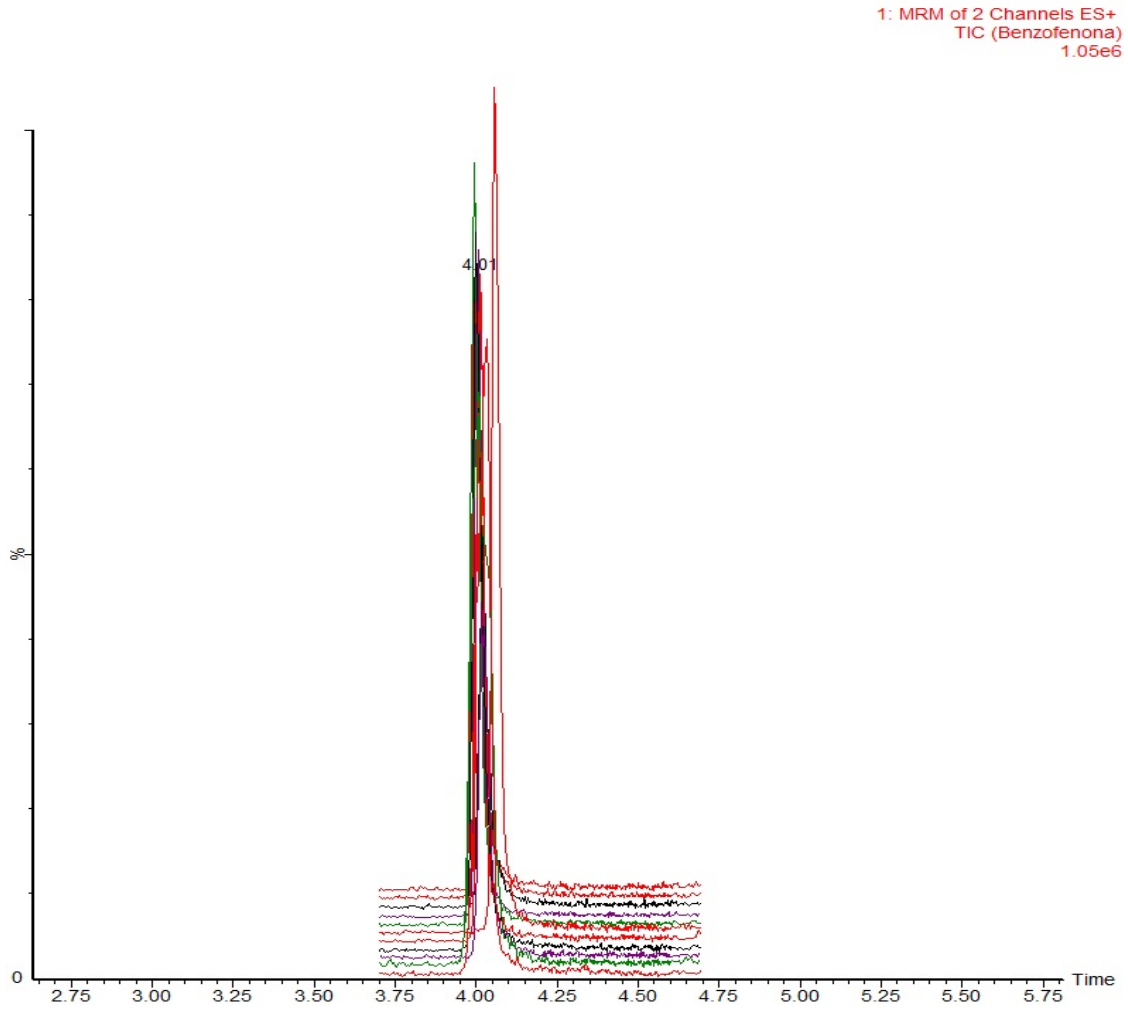
Figura 70 - Cromatograma, no modo TIC, para 4NP, avaliando a validade das amostras



Legenda: Tempo (time) em minutos; injeção das amostras aquosas sintéticas durante 12 meses

Fonte: Autor

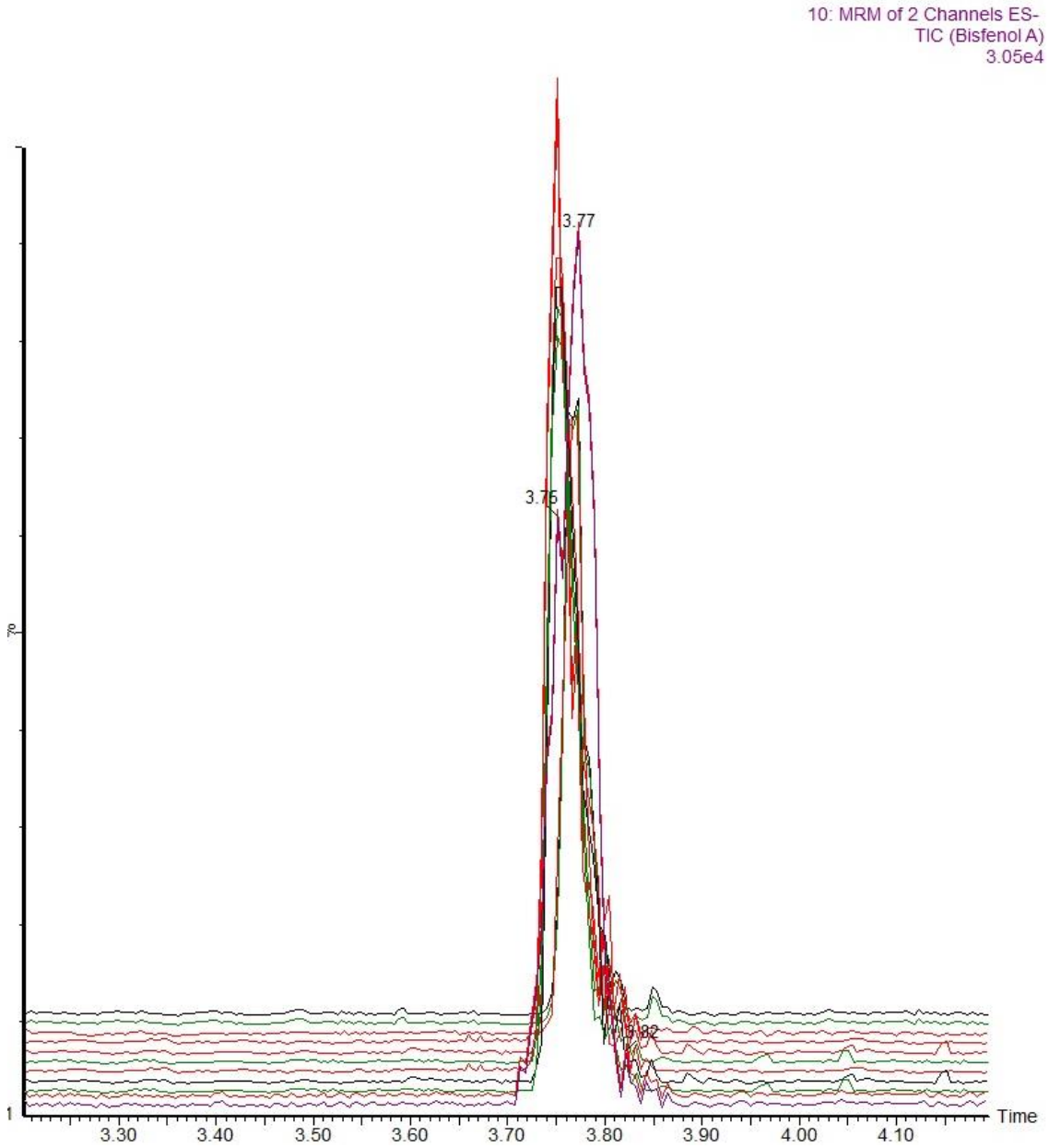
Figura 71 - Cromatograma, no modo TIC, para BEN, avaliando a validade das amostras



Legenda: Tempo (time) em minutos; injeção das amostras aquosas sintéticas durante 12 meses

Fonte: Autor

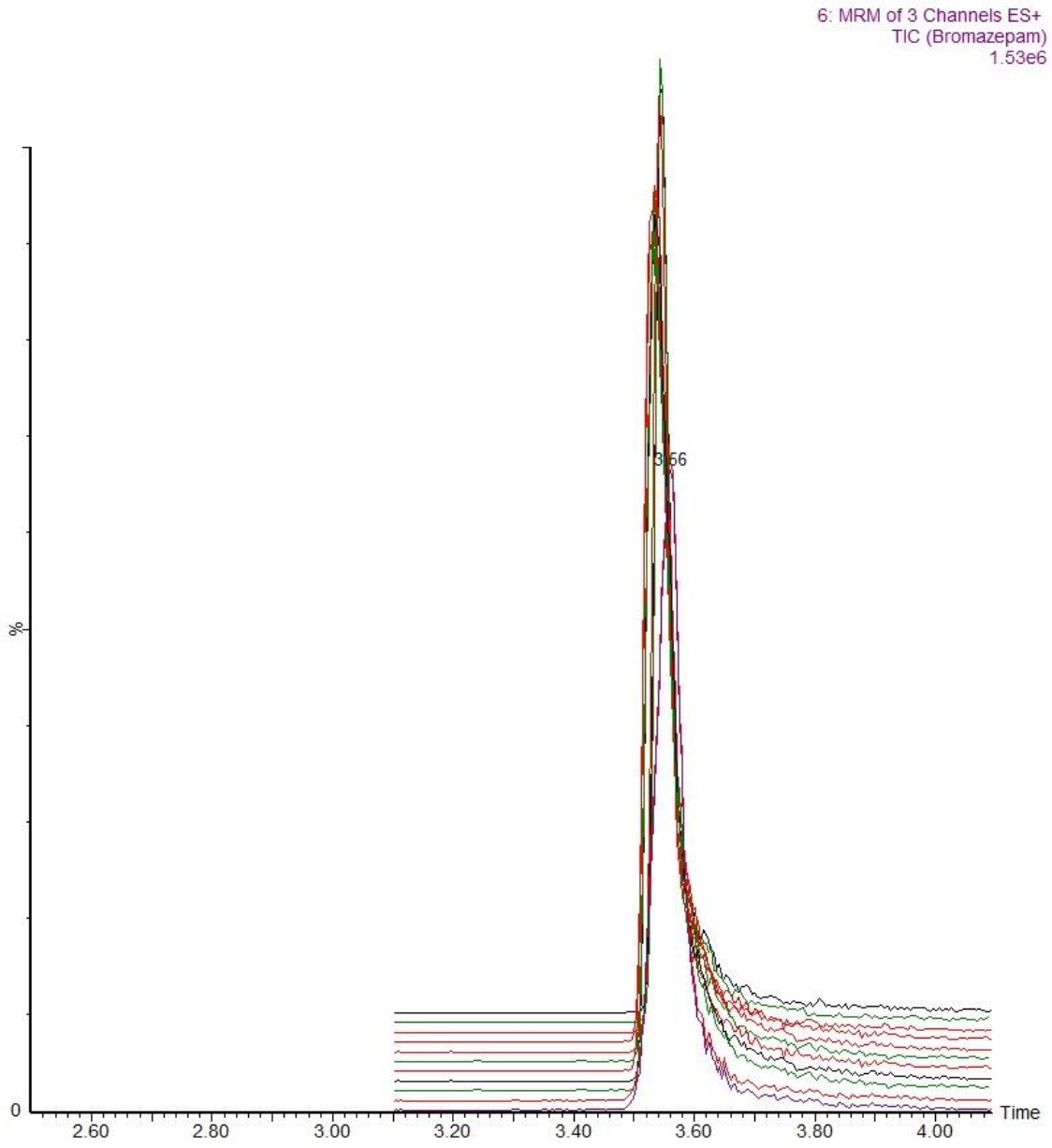
Figura 72 - Cromatograma, no modo TIC, para BPA, avaliando a validade das amostras



Legenda: Tempo (time) em minutos; injeção das amostras aquosas sintéticas durante 12 meses

Fonte: Autor

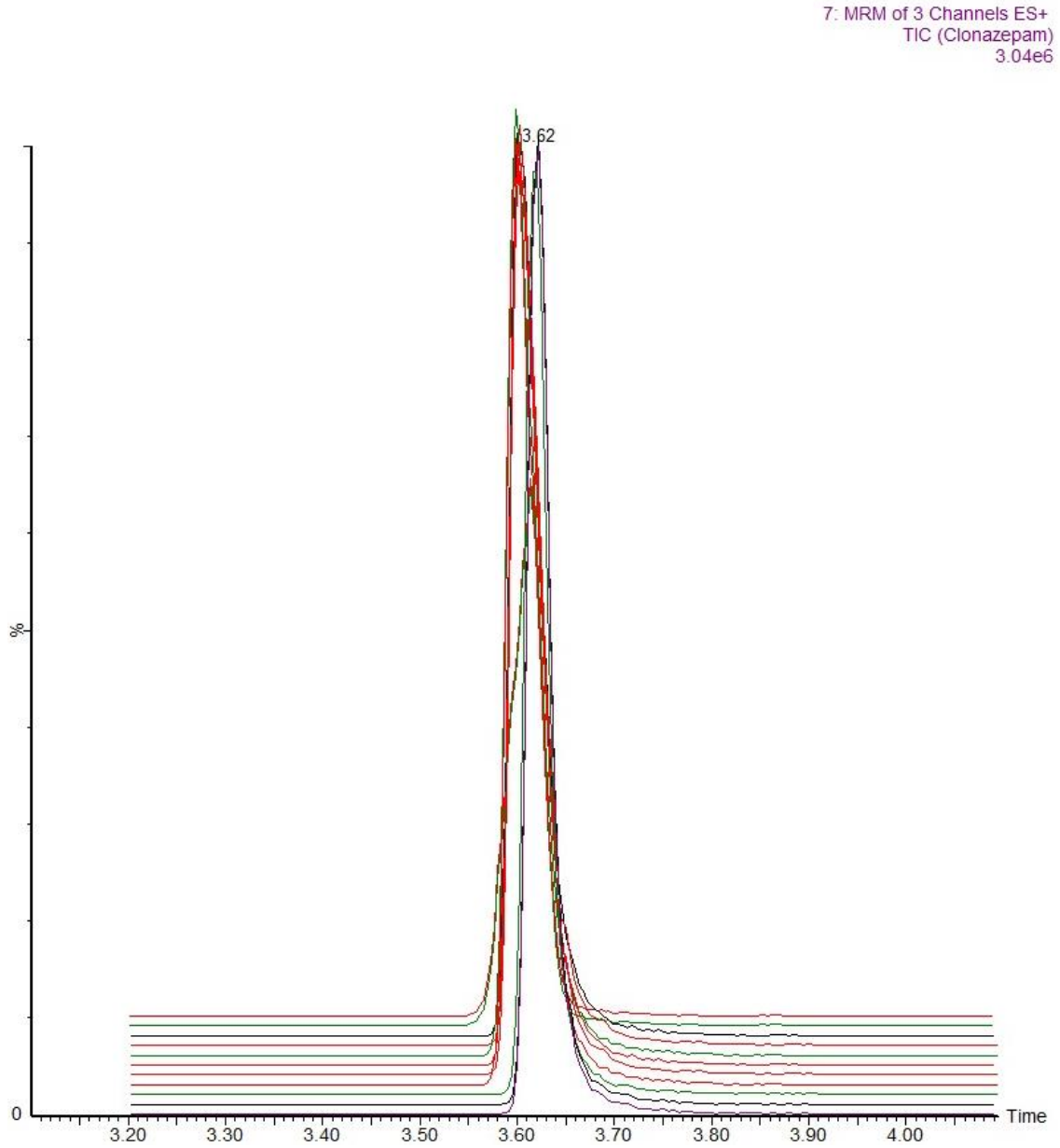
Figura 73 - Cromatograma, no modo TIC, para BZP, avaliando a validade das amostras



Legenda: Tempo (time) em minutos; injeção das amostras aquosas sintéticas durante 12 meses

Fonte: Autor

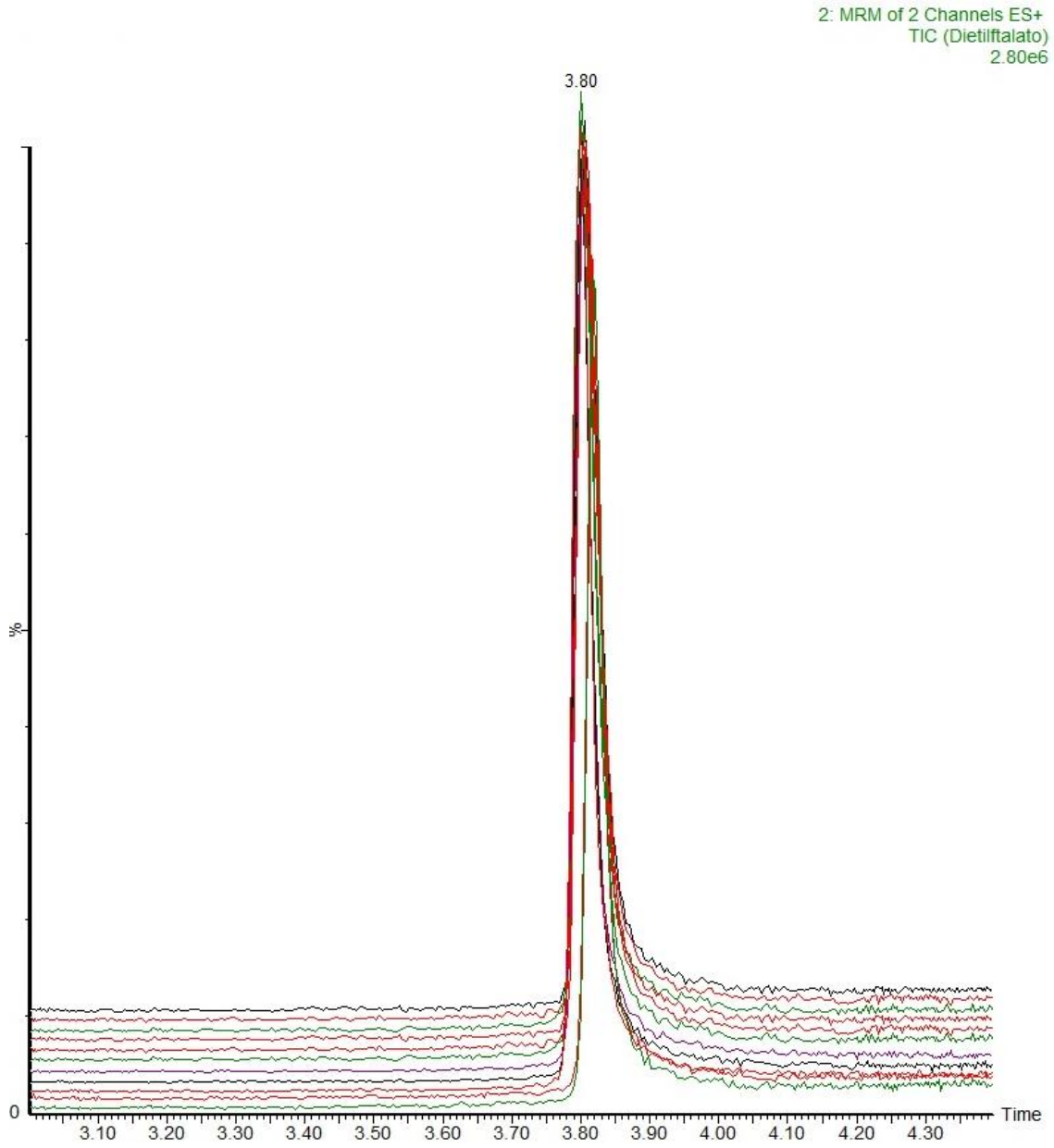
Figura 74 - Cromatograma, no modo TIC, para CZP, avaliando a validade das amostras



Legenda: Tempo (time) em minutos; injeção das amostras aquosas sintéticas durante 12 meses

Fonte: Autor

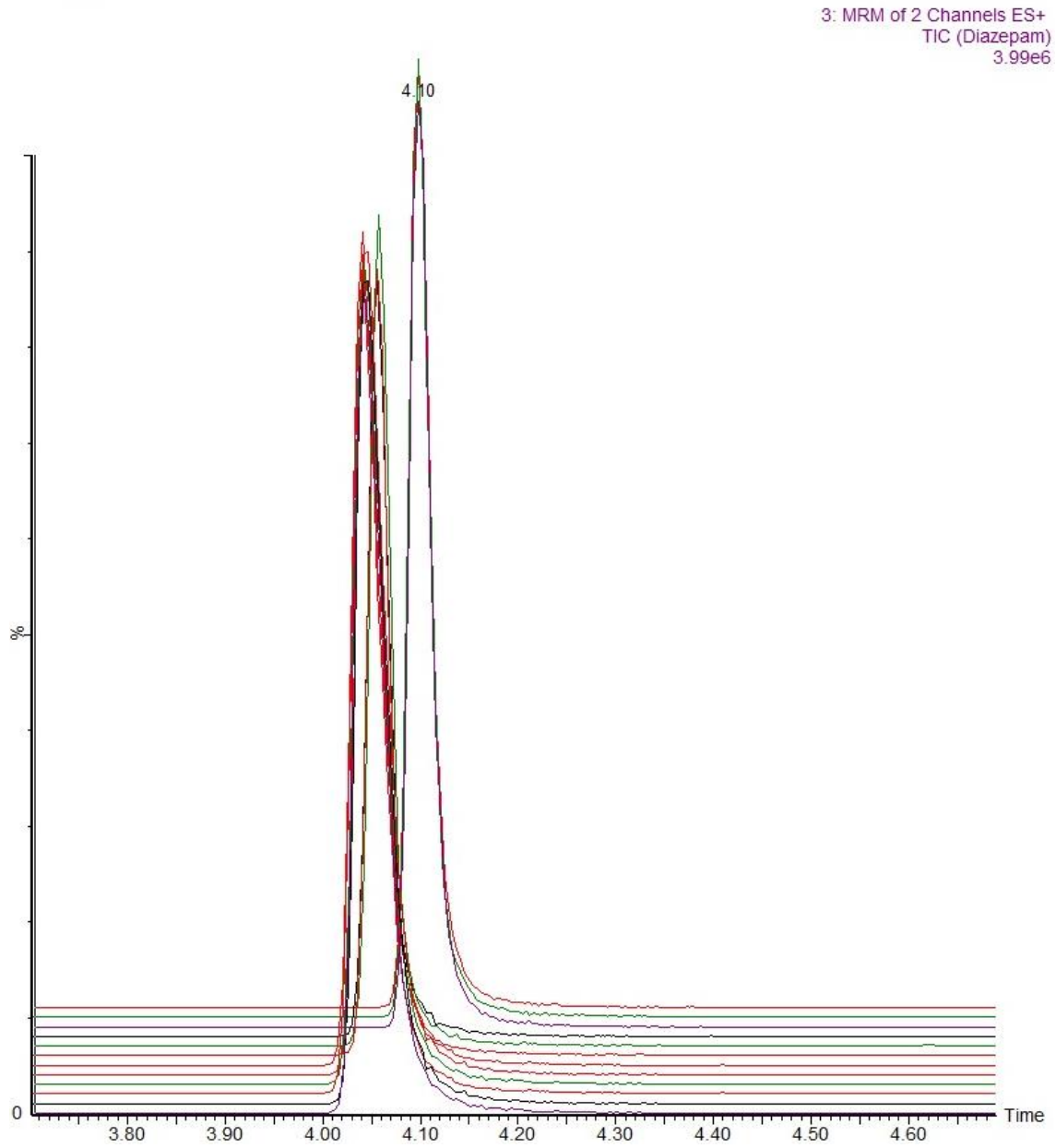
Figura 75 - Cromatograma, no modo TIC, para DEP, avaliando a validade das amostras



Legenda: Tempo (time) em minutos; injeção das amostras aquosas sintéticas durante 12 meses

Fonte: Autor

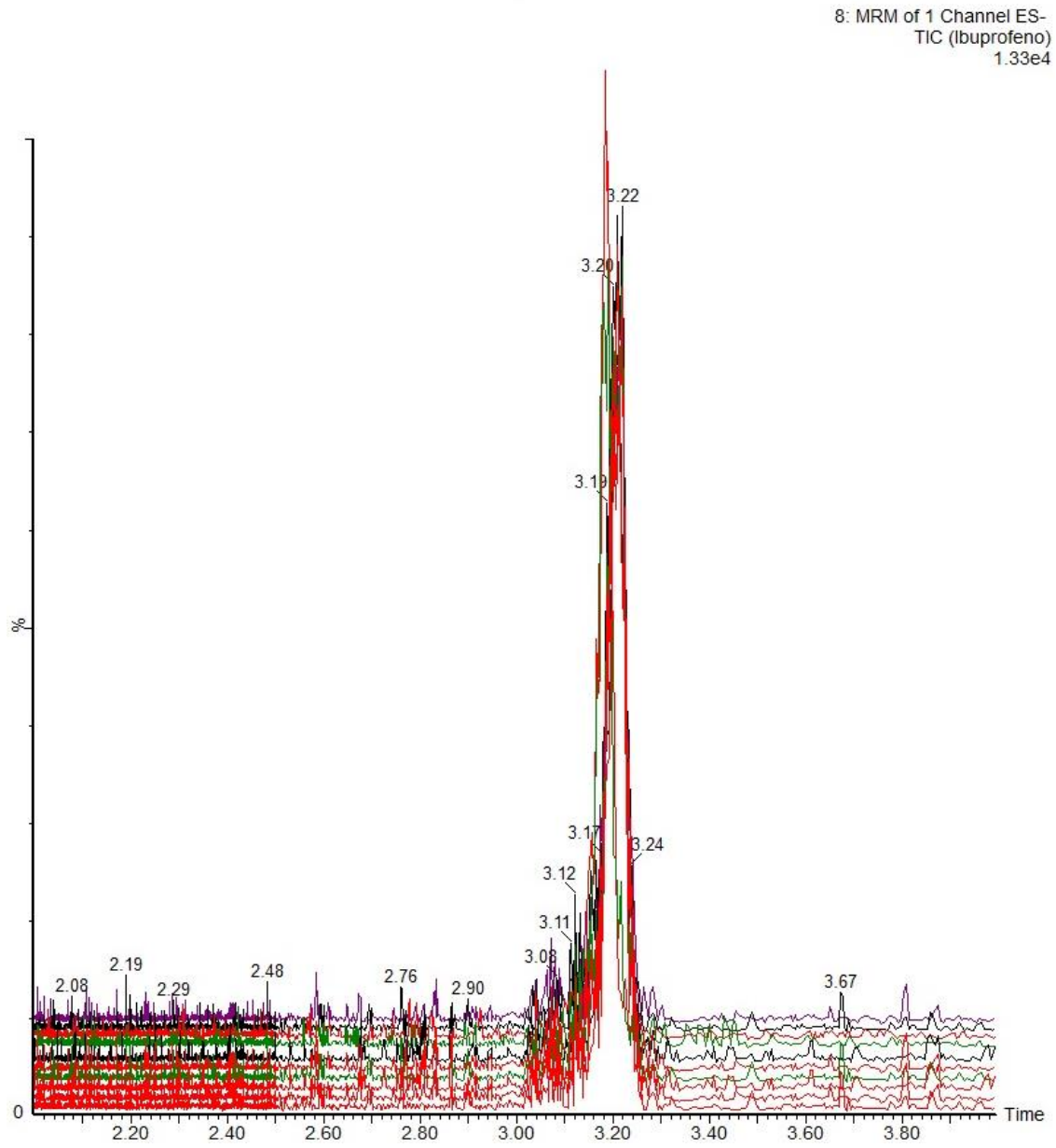
Figura 76 - Cromatograma, no modo TIC, para DZP, avaliando a validade das amostras



Legenda: Tempo (time) em minutos; injeção das amostras aquosas sintéticas durante 12 meses

Fonte: Autor

Figura 77 - Cromatograma, no modo TIC, para IBP, avaliando a validade das amostras

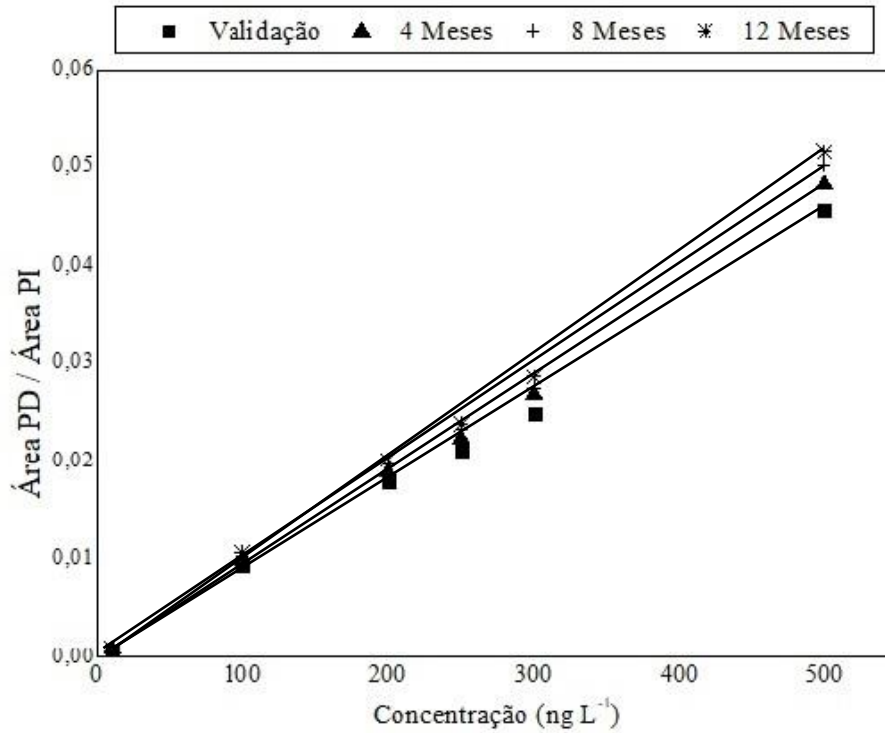


Legenda: Tempo (time) em minutos; injeção das amostras aquosas sintéticas durante 12 meses

Fonte: Autor

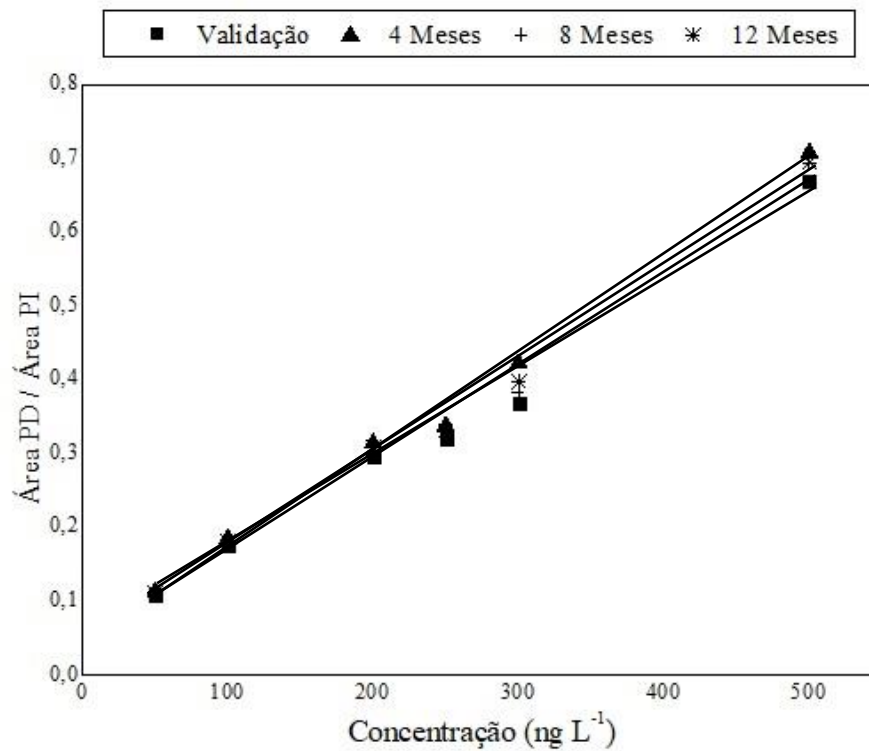
APÊNDICE E – Validação das amostras II

Figura 78 - Comparação entre as três curvas analíticas para o 4NP



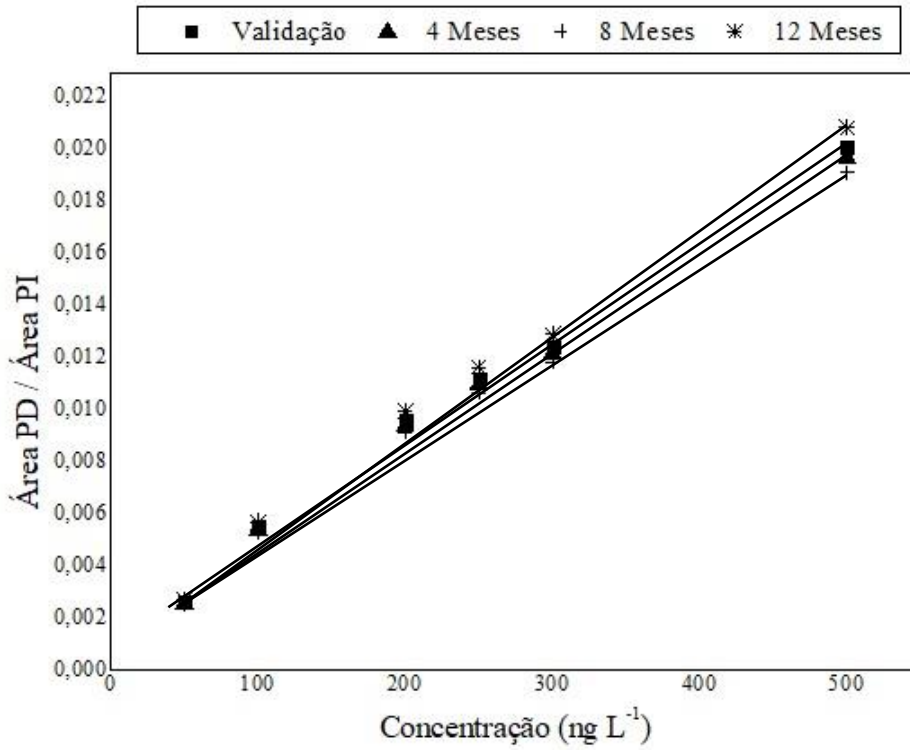
Fonte: Autor

Figura 79 - Comparação entre as três curvas analíticas para o BEN



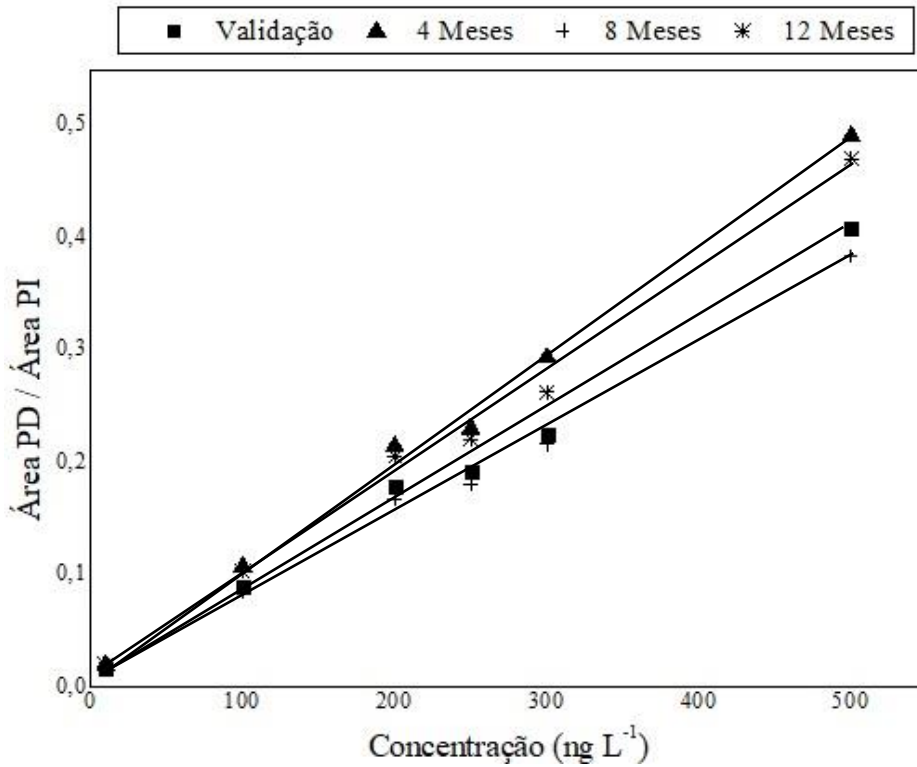
Fonte: Autor

Figura 80 - Comparação entre as três curvas analíticas para o BPA



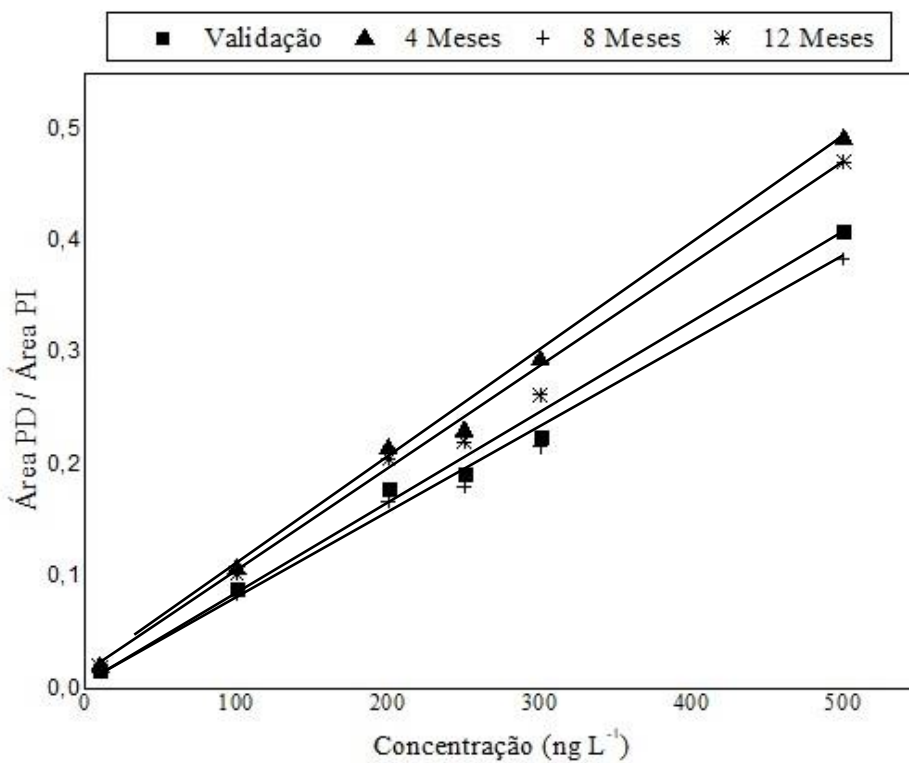
Fonte: Autor

Figura 81 - Comparação entre as três curvas analíticas para o BZP



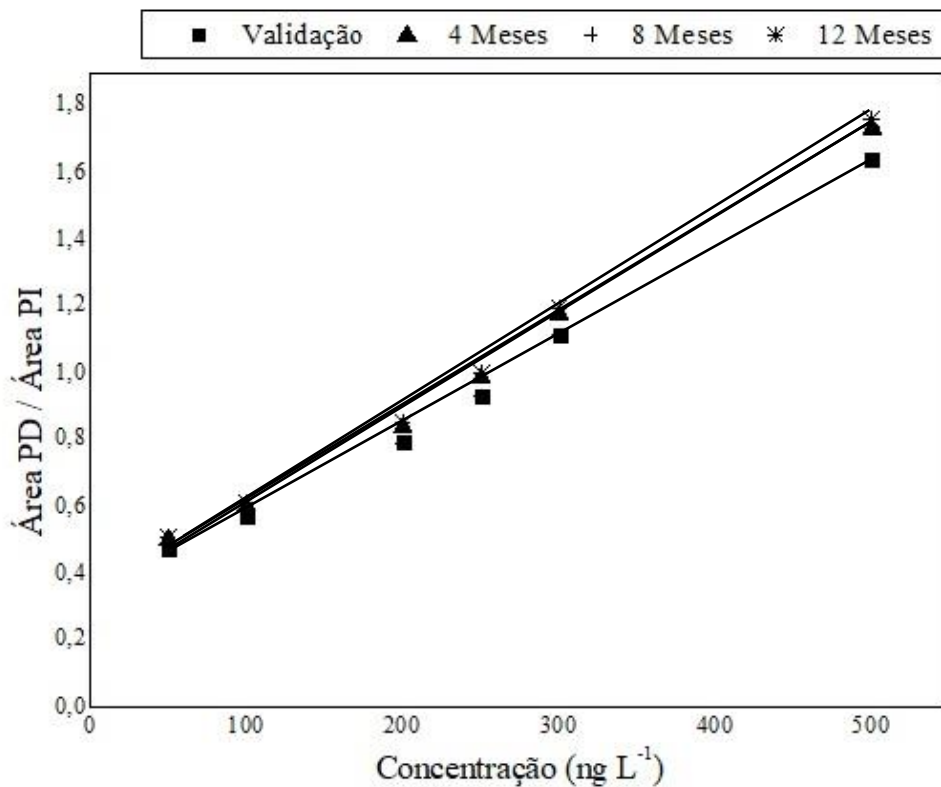
Fonte: Autor

Figura 82 - Comparação entre as três curvas analíticas para o CZP



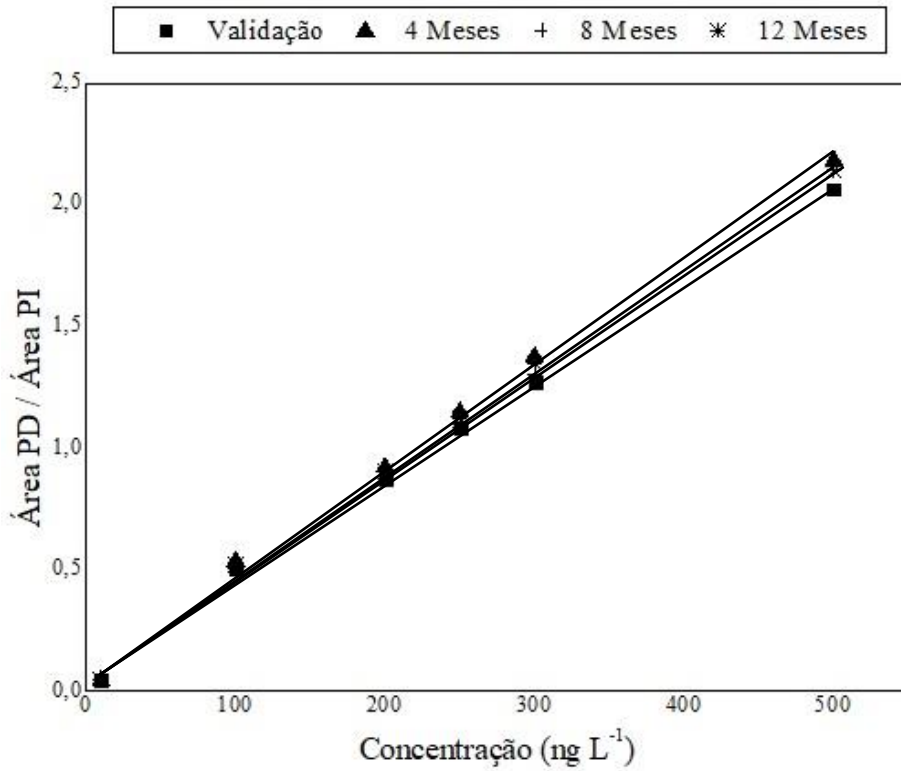
Fonte: Autor

Figura 83 - Comparação entre as três curvas analíticas para o DEP



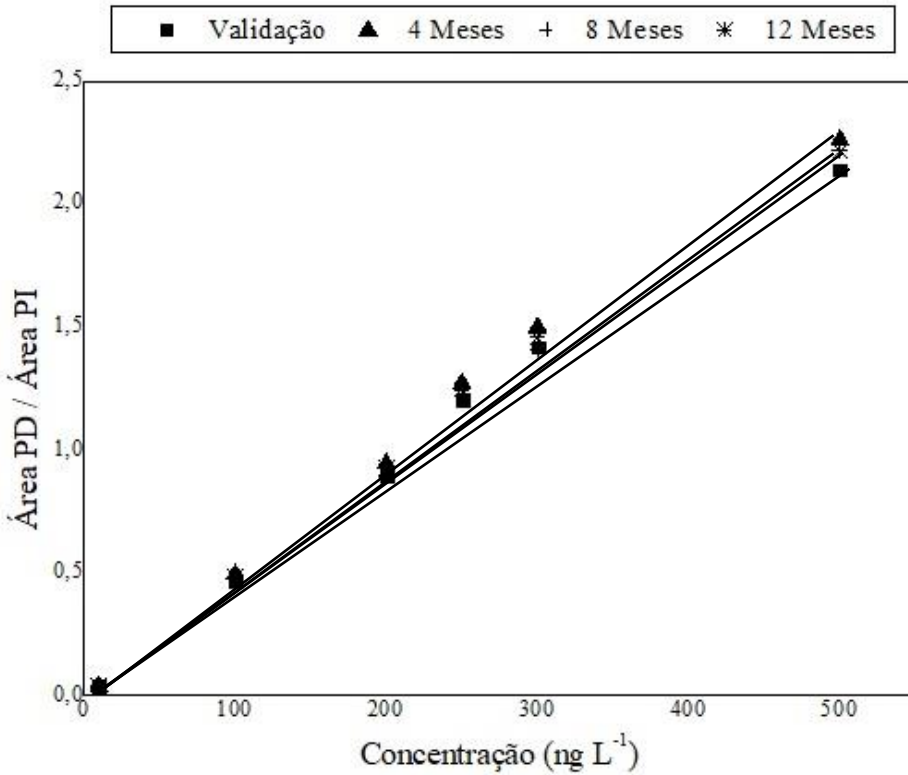
Fonte: Autor

Figura 84 - Comparação entre as três curvas analíticas para o DZP



Fonte: Autor

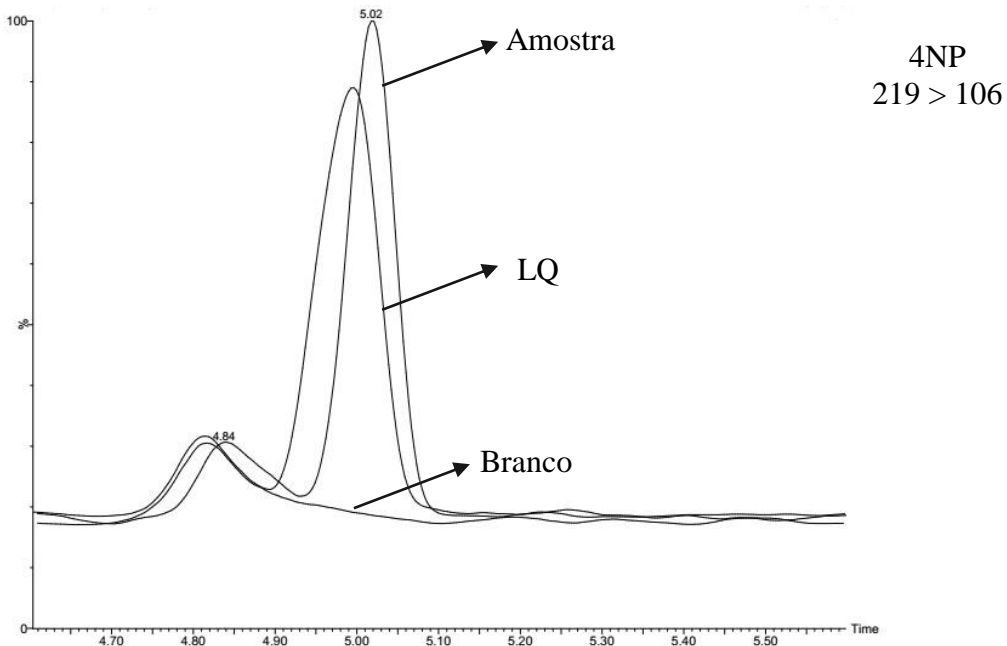
Figura 85 - Comparação entre as três curvas analíticas para o TMP



Fonte: Autor

APÊNDICE F – Quantificação amostras

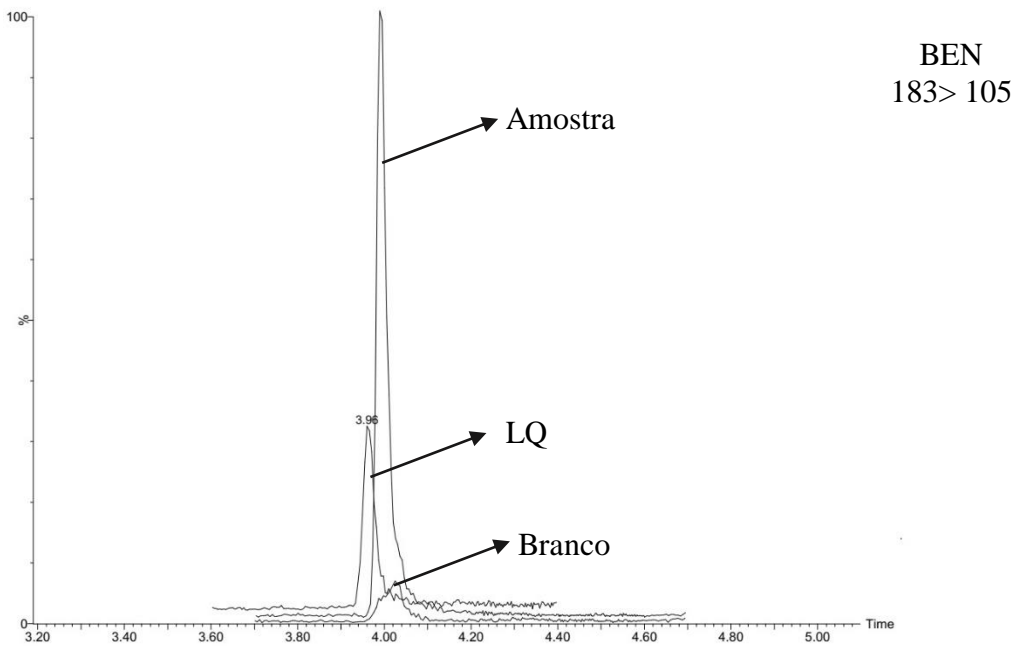
Figura 86 - Cromatogramas, no modo TIC, com quantificação do 4NP



Legenda: Cromatograma obtido com as condições descritas na Tabela 16

Fonte: Autor

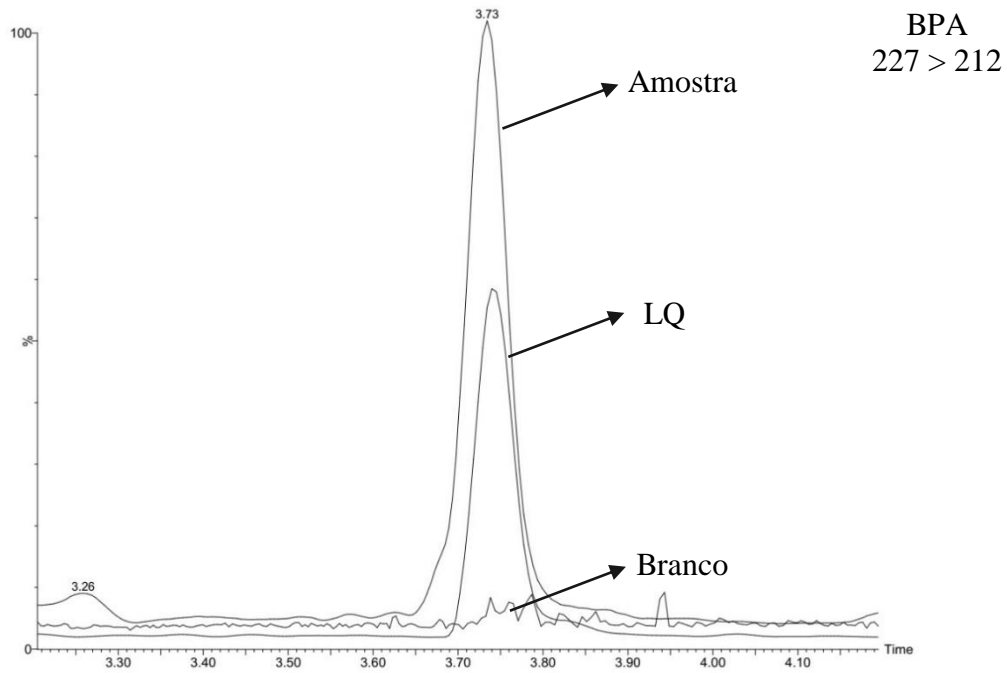
Figura 87 - Cromatogramas, no modo TIC, com quantificação do BEN



Legenda: Cromatograma obtido com as condições descritas na Tabela 16

Fonte: Autor

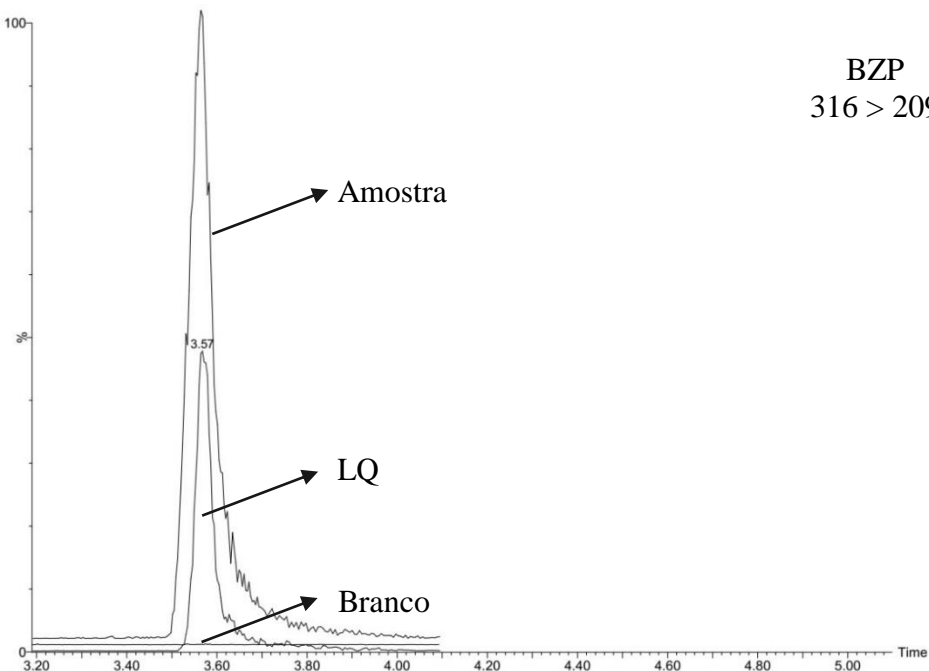
Figura 88 - Cromatogramas, no modo TIC, com quantificação do BPA



Legenda: Cromatograma obtido com as condições descritas na Tabela 16

Fonte: Autor

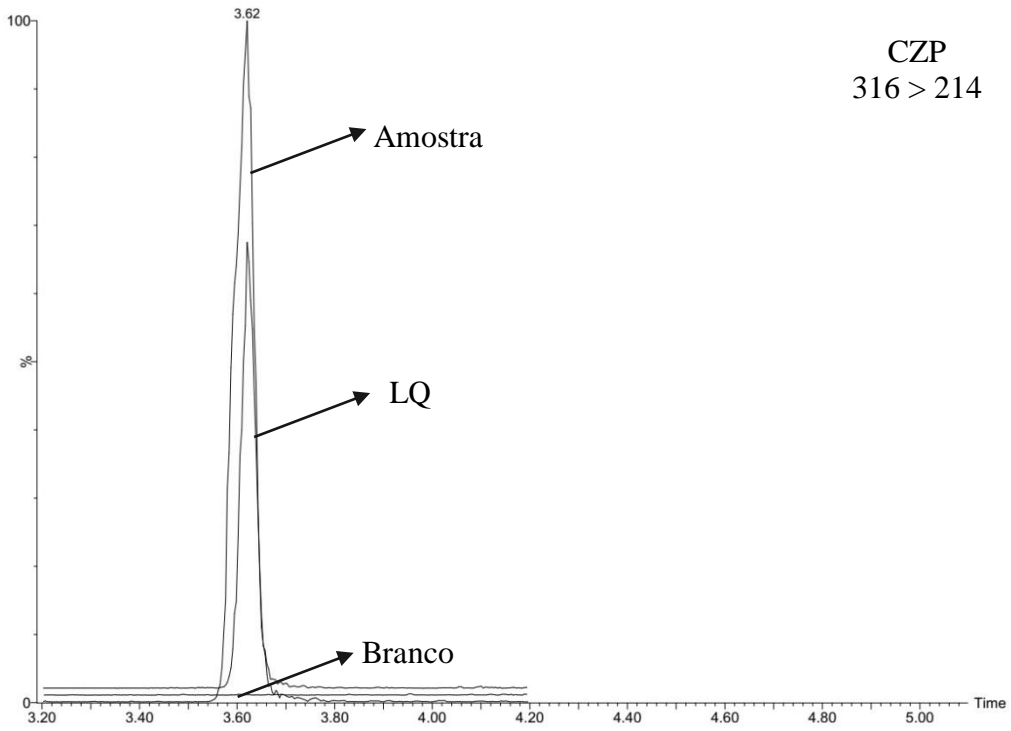
Figura 89 - Cromatogramas, no modo TIC, com quantificação do BZP



Legenda: Cromatograma obtido com as condições descritas na Tabela 16

Fonte: Autor

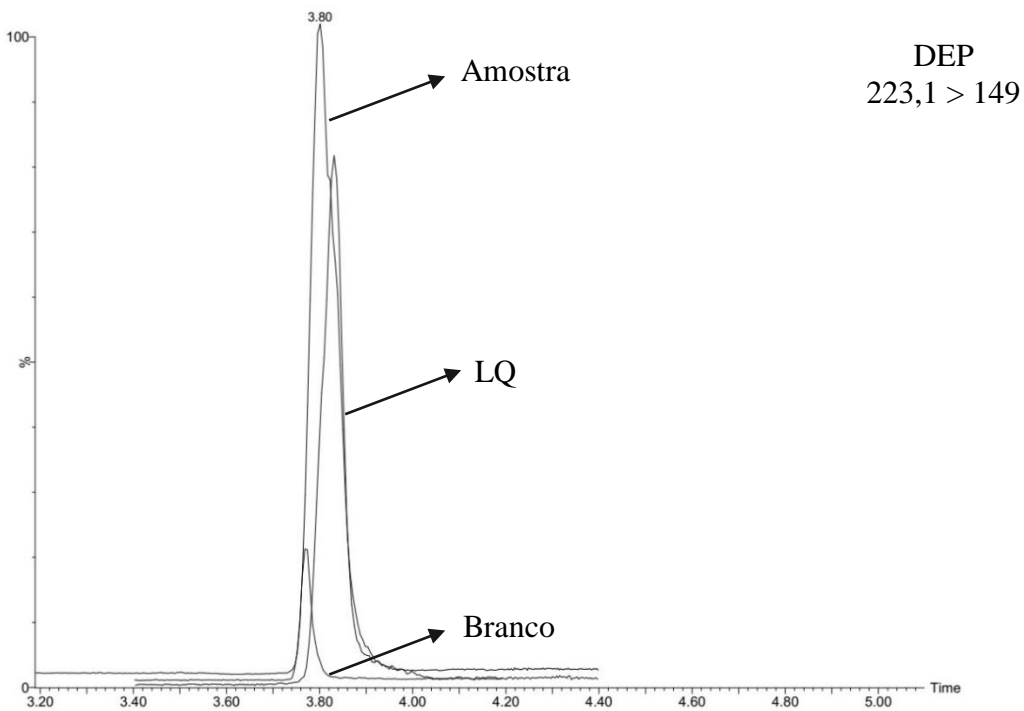
Figura 90 - Cromatogramas, no modo TIC, com quantificação do 4NP



Legenda: Cromatograma obtido com as condições descritas na Tabela 16

Fonte: Autor

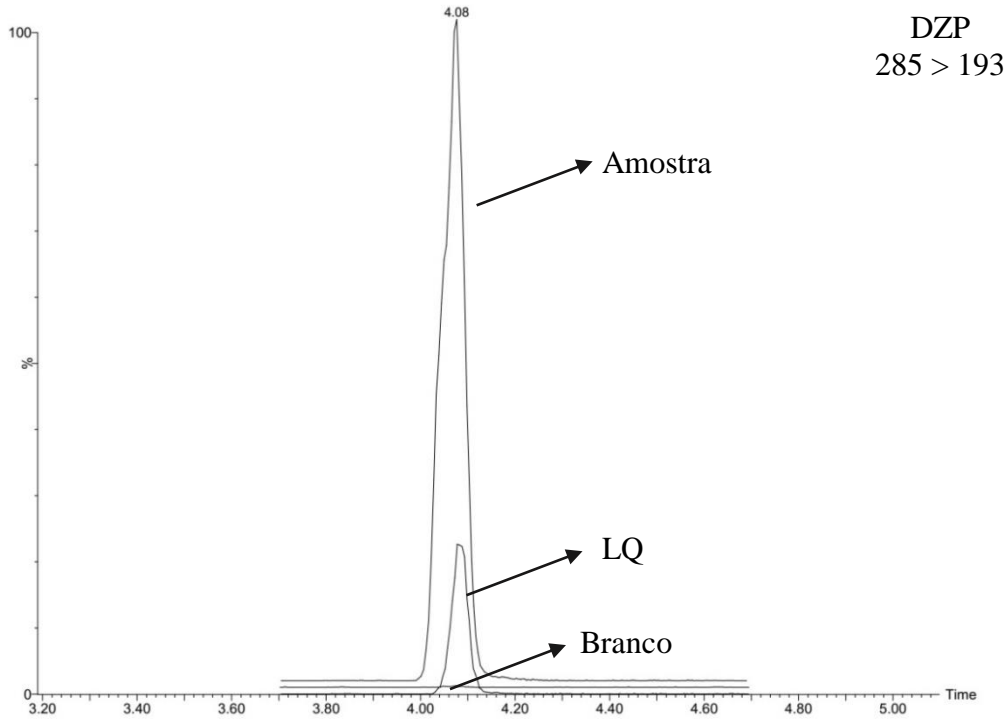
Figura 91 - Cromatogramas, no modo TIC, com quantificação do DEP



Legenda: Cromatograma obtido com as condições descritas na Tabela 16

Fonte: Autor

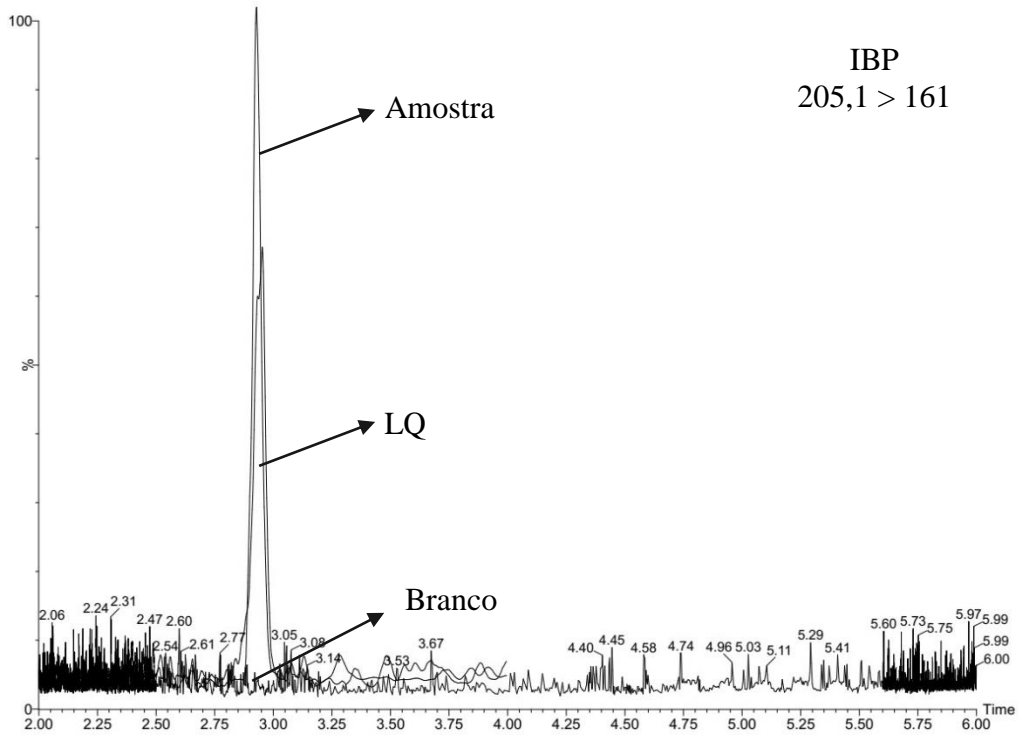
Figura 92 - Cromatogramas, no modo TIC, com quantificação do DZP



Legenda: Cromatograma obtido com as condições descritas na Tabela 16

Fonte: Autor

Figura 93 - Cromatogramas, no modo TIC, com quantificação do IBP.



Legenda: Cromatograma obtido com as condições descritas na Tabela 16.

Fonte: Autor



Psychoactive drugs: occurrence in aquatic environment, analytical methods, and ecotoxicity—a review

Deivisson Lopes Cunha^{1,2} · Frederico Goytacazes de Araujo^{1,3} · Marcia Marques¹ Received: 14 June 2017 / Accepted: 7 September 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract This review focused on seven psychoactive drugs being six benzodiazepines (alprazolam, bromazepam, clonazepam, diazepam, lorazepam, and oxazepam) and one antidepressant (citalopram) widely consumed by modern society and detected in different aqueous matrices (drinking water, surface water, groundwater, seawater, estuary water, influent and effluent of wastewater treatment plants). The review included 219 selected scientific papers from which 1642 data/entries were obtained, each entry corresponding to one target compound in one aqueous matrix. Concentrations of all investigated drugs in all aqueous matrices varied from 0.14 to 840,000 ng L⁻¹. Citalopram presented the highest concentrations in the aqueous matrices. Based on the Wilcoxon-Mann-Whitney test, differences between wastewater influents and effluents were not significant for most wastewater categories, suggesting that conventional wastewater treatment systems as such do not remove or remove partially these compounds. High-income countries showed much lower concentrations in surface water than the group formed by upper-middle-,

lower-middle-, and low-income countries. Regarding analytical methods, solid-phase extraction (SPE) was by far the most used extraction method (83%) and performance liquid chromatography (HPLC) (73%) coupled to mass spectrometry (99%) the most common analytical method. Changes in behavior and in survival rates were the most common effects reported on bioindicators (aquatic species) due to the presence of these drugs in water. Concentrations of psychoactive drugs found in surface waters were most of the time within the range that caused measurable toxic effects in ecotoxicity assays.

Keywords Psychoactive drugs · Aqueous matrices · Analytical methods · Ecotoxicity · Benzodiazepines · Antidepressant drugs

Abbreviations

D-WWI	Domestic wastewater influent
D-WWE	Domestic wastewater effluent
DI-WWI	Domestic and industrial wastewater influent
DI-WWE	Domestic and industrial wastewater effluent
DH-WWI	Domestic and hospital wastewater influent
DH-WWE	Domestic and hospital wastewater effluent
DHI-WWI	Domestic, hospital, and industrial wastewater influent
DHI-WWE	Domestic, hospital, and industrial wastewater effluent
S-WWI	Slaughterhouse wastewater influent
S-WWE	Slaughterhouse wastewater effluent
LDI-WWI	Leachate, domestic and industrial wastewater influent
LDI-WWE	Leachate, domestic and industrial wastewater effluent

Responsible editor: Ester Heath

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11356-017-0170-4>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Marcia Marques
marciam@uerj.br

¹ Department of Sanitary and Environmental Engineering, Rio de Janeiro State University (UERJ), R. São Francisco Xavier, 524, CEP, Rio de Janeiro, RJ 20550-900, Brazil

² Post-Graduation Program in Environment (PPGMA), UERJ, Rio de Janeiro, Brazil

³ Post-Graduation Program in Chemistry (PPGQ), UERJ, Rio de Janeiro, Brazil



Development and Validation of an Analytical Method for the Detection and Quantification of Bromazepam, Clonazepam and Diazepam by UPLC-MS/MS in Surface Water

Frederico Goytacazes de Araujo^{1,4} · Glauco Favilla Bauerfeldt² · Marcia Marques³ · Eduardo Monteiro Martins^{1,3}Received: 30 November 2018 / Accepted: 9 May 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

The development of analytical methods capable of determining micropollutants is essential for quality control of drinking water. Benzodiazepines, a class of pharmaceuticals with anxiolytic properties, have received increasing attention as micropollutants. The purpose of this study was to develop an analytical method for determination of three benzodiazepine drugs (bromazepam, clonazepam and diazepam) in surface water. For the extraction of the matrix analytes, SPE cartridges (C18, 500 mg/3 mL) were used. The method was validated according to the quality criteria of the USEPA 8000D Validation Guide. The developed and validated method showed recovery values between 57 and 100%, RSD < 20% and $R^2 > 0.9949$. LD ranged between 2.70 and 5.00 ng L⁻¹ for bromazepam and clonazepam respectively whereas LQ was 0.01 µg L⁻¹ for all analytes. The matrix affected the signal intensity of clonazepam thus evidencing the matrix effect by analysis statistic (F test).

Keywords PPCPs · Micropollutants · Surface waters · Benzodiazepines · UPLC-MS/MS

Large number of organic and inorganic contaminants are continuously discharged into receiving water bodies along with municipal and industrial effluents. Among these, pharmaceuticals and personal care products (PPCP) end up in water bodies, posing risks to aquatic ecosystems (Luo et al. 2014; Arbeláez et al. 2015; de Almeida et al. 2015; Stipaničev et al. 2017). Given the growing concern about the presence, fate and potential effects on ecosystems and human health, and the knowledge that such contaminants are inefficiently removed in water treatment and sewage treatment systems (Matsuo et al. 2011; Silveira et al. 2013; Tran

et al. 2013; Dai et al. 2014; Caldas et al. 2016; Mann et al. 2016; Valls-Cantenys et al. 2016), it is necessary to develop analytical methods capable of detecting and quantifying these contaminants.

According to the International Narcotics Control Board (INCB 2015), the most representative benzodiazepine drugs consumed worldwide were those with anxiolytic and anti-epileptic effects. Diazepam (DZP), bromazepam (BZP), and clonazepam (CZP) are found among these drugs and also among the less investigated ones in surface water (Cunha et al. 2017), regardless the increase in their production (INCB 2015) and their persistence in conventional biological treatment systems (Cunha et al. 2017).

In order to achieve an analytical method with low limit of detection (LD) and limit of quantification (LQ) for psychoactive drugs – particularly benzodiazepines – in surface water, different methods have been applied, as reported in an extensive literature survey (Cunha et al. 2017). The solid phase extraction followed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry detection is the most common applied strategy. However, aspects concerning matrix effects and possible interferents in polluted waters, to the best of our knowledge, has not been addressed.

The Guandu river basin is an important water supplier for the metropolitan region of Rio de Janeiro and Rio de

✉ Frederico Goytacazes de Araujo
fredgoytacazes@gmail.com

¹ Post-Graduation Program in Chemistry (PPGQ), UERJ, Rio de Janeiro, Brazil

² Chemistry Institute, Rural Federal University of Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465, Km 47, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil

³ Department of Sanitary and Environmental Engineering, Rio de Janeiro State University (UERJ), R. São Francisco Xavier, 524, CEP, Rio de Janeiro, RJ 20550-900, Brazil

⁴ Industrial Chemistry Department, Federal Institute of Espirito Santo (IFES), Av. Moroba, 248, Moroba, Aracruz, ES 29192-733, Brazil



Development and validation of an analytical method for detection and quantification of benzophenone, bisphenol A, diethyl phthalate and 4-nonylphenol by UPLC-MS/MS in surface water

Frederico Goytacazes de Araujo^{Corresp. 1, 2}, Glauco Favilla Bauerfeldt³, Marcia Marques⁴, Eduardo Monteiro Martins^{1, 4}

¹ Post-Graduation Program in Chemistry (PPGQ), UERJ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

² Industrial Chemistry Department, IFES, Aracruz, Espírito Santo, Brazil

³ Chemistry Institute, UFRRJ, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

⁴ Department of Sanitary and Environmental Engineering, UERJ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Corresponding Author: Frederico Goytacazes de Araujo
Email address: frederico.araujo@ifes.edu.br

The present study included the development of a chromatographic method and its application to assess the occurrence of 4-nonylphenol (4NP), benzophenone (BEN), bisphenol A (BPA) and diethyl-phthalate (DEP), known as endocrine disruptors (EDs), in Guandu River, which is the main water source for 9 million inhabitants in Rio de Janeiro city and some others included in the metropolitan region of the Rio de Janeiro State, Brazil. Sample preparation involved solid phase extraction (SPE) with C18 cartridge and methanol as elution solvent. To validate the methodology, the USEPA 8000D guide was chosen, where selectivity, matrix effect, linearity, precision, accuracy, robustness, limit of detection (LD) and limit of quantification (LQ) were evaluated. The recovery was greater than 88%, accuracy between 82% and 100% and relative standard deviation below 11.5%. The LQ ranged from 10.0 to 50.0 ng L⁻¹, while the LD ranged from 0.251 to 0.822 ng L⁻¹. The coefficients of determination (R²) were greater than 0.99 for all compounds within a linearity ranges of 10.0 to 500 ng L⁻¹ for 4NP and BEN and 50.0 and 500 ng L⁻¹ for BPA and DEP respectively. The method was therefore considered selective and robust for all micropollutants. Matrix effect was observed for BEN, 4NP and DEP. The developed method was applied to analyze five samples collected monthly during 2018 at a selected sampling point of a river in Rio de Janeiro State. BEN was detected (below LQ) in one and quantified in four samples; 4NP was detected in all but quantified in only one sample; BPA and DEP were quantified in all samples. The average concentrations found for BPA, BEN, DEP and 4NP were 93.2, 146, 2.56 x 10³ and 10.6 ng L⁻¹ respectively. These values were high

ANEXO D - Participação no Linnaeus Eco-Tech 2016.

PHOTOLYSIS AND HETEROGENEOUS PHOTOCATALYSIS DEGRADATION OF EMERGING CONTAMINANTES IN WATER

*Deivisson Lopes Cunha
Frederico Goytacazes de Araujo
Marcia Marques*

*Department of Sanitary and Environmental Engineering
Rio de Janeiro State University-UERJ, Rio de Janeiro, Brazil*

ABSTRACT

Pharmaceutical compounds have been increasingly concerned for their pseudo-persistent properties, and their potential harm to humans and the environment. Heterogeneous photocatalysis using titanium dioxide (TiO₂) as catalytic is the most advanced oxidation processes recently investigated to remove several emerging contaminants in different aqueous environment compartments. One of the significant advantage of this process is it can be absorbed sunlight radiation. This study evaluated photolysis and heterogeneous photocatalysis process using Aeroxide P25 TiO₂, under sunlight simulated lamp, to remove six pharmaceutical compounds, such as: sulfamethoxazole, ibuprofen, 17 α -ethynylestradiol, levonorgestrel, bromazepam and diazepam, in spiked water using ultrapure water at environmental relevance concentrations. In addition, liquid chromatography method, using UPLC-MS/MS, was evaluated to identify and quantify these six compounds in water. Photolysis was able to degrade sulfamethoxazole in 120 min of experiment, but was not degrade the others compounds. Heterogeneous photocatalysis using TiO₂ Aeroxide P25 completely degraded sulfamethoxazole, ibuprofen and 17 α -ethynylestradiol under 60 minutes of exposure, and partially degraded levonorgestrel, bromazepam and diazepam. The last three compounds can be considered as recalcitrant, due to their chemical structure are more complex. This work provides new information about degradation of bromazepam and diazepam (benzodiazepines compounds) in water using TiO₂ heterogeneous photocatalysis. More studies are requested to evaluate the efficient of photolysis and heterogeneous photocatalysis using solar pilot reactor and in different aqueous matrices.

KEYWORDS

Photolysis; heterogeneous photocatalysis; emerging contaminants degradation; TiO₂.

1 INTRODUCTION

In recent decades population growth, unplanned urbanization in developing countries, without sanitation infrastructure, industrial activities expansion, and agricultural production has greatly exacerbated the degradation and pollution of the environment. In this context, aquatic ecosystems and water as a natural resource essential to human activities have been growing wastewater emission target of a diverse and increasingly complex range of contaminants.

In this context, pharmaceutical compounds are considering as emerging contaminants (EC) or micropollutants and are often found in sewage, industrial waste water, drinking water and

ANEXO E - Participação no 57º Congresso Brasileiro de Química 2017.



ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE QUÍMICA

Certificado

Certificamos que **de Araujo, F.G.; Coutinho, R.S.; Marques, M.; Martins, E.M.** apresentou(aram) o trabalho "Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por UPLC-MS/MS para determinação de fármacos e desreguladores endócrinos na bacia hidrográfica do rio Guandu - RJ" no **57º Congresso Brasileiro de Química**, realizado de 23/10/2017 à 27/10/2017, no Centro Cultural FAURGS, em Gramado / RS.

Gramado, 27 de Outubro de 2017

Leandro Rosa Camacho
Presidente do 57º CBQ

ANEXO F - Participação no Linnaeus Eco-Tech 2018.

Linnaeus ECO-TECH 2018
Kalmar, Sweden, November 19-21, 2018

DETERMINATION OF PPCPs AND ENDOCRINE DISRUPTORS IN THE GUANDU RIVER BASIN BY UPLC-ESI-MS/MS

Frederico Goytacazes de Araujo¹

Marcia Marques²

Eduardo Monteiro Martins^{1,2}

¹*Post-Graduation Program in Chemistry, Institute of Chemistry, UERJ-Brazil*

²*Department of Sanitary and Environmental Engineering, UERJ-Brazil*

ABSTRACT

Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) and endocrine disrupters (EDs) are micropollutants found in concentrations ranging from ng L⁻¹ to µg L⁻¹ and are potentially hazardous to the environment as well as to human beings. Among the most widely used pharmaceutical drugs one can mention: Trimethoprim (antibiotic), Bromazepam, Clonazepam and Diazepam (benzodiazepines psychoactive drugs), Ibuprofen (anti-inflammatory) and Benzophenone (UV radiation blocker). EDs, in turn, are substances that impair the normal functioning of endocrine systems. Among them, it can be mentioned 4-Nonylphenol (surfactant), Bisphenol-A and Diethyl-phthalate (plasticizers). The development of analytical methods with increasing reduction of limits of detection and quantification, capable of detecting micropollutants at concentrations in the range of ng L⁻¹ has been essential mostly for drinking water quality control and assessment of surface water quality. The objective of this work was to develop analytical procedure using solid phase extraction (SPE) and ultraperformance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS/MS) with electrospray ionization (ESI) for the determination of Trimethoprim, Bromazepam, Clonazepam, Diazepam, Ibuprofen, 4-Nonylphenol, Bisphenol A and Diethyl phthalate in surface water of Guandú River, which has the highest national priority due to the water supplied in Rio de Janeiro State. For concentration and extraction of the analytes from the matrix, solid phase extraction (C18 stationary phase cartridge and 500 mg) was used. The separation was done using a BEH C18 (2.1 mm ID x 50 mm, 1.7 µm) chromatographic column, with a running time of 8 min, and mobile phase of methanol and ultrapure water, both with 0.01% ammonium hydroxide in gradient mode with a flow rate of 0.4 mL min⁻¹. The recovery rate of all analytes ranged from 57% for Clonazepam to 99% for Benzophenone; the accuracy of all analytes was adequate (RSD <20%), the uncertainty lower than 20% with acceptable standard error (less than 7.88). The limits of quantification (LQ) of the method ranged from 10.0 ng L⁻¹ for Bromazepam, Clonazepam, Diazepam and Trimethoprim to 100.0 ng L⁻¹ for Diethyl phthalate. The first four sampling campaigns (April, May, June, July 2018) of a monitoring program in a segment of Guandu River with focus has already shown the presence of some of these pollutants.

KEYWORDS: benzodiazepine drugs; method validation chromatography in liquid phase; water quality

ANEXO G - Participação no Encontro Nacional de Química Analítica 2018.



Certificado



19° ENQA
7° CIAQA

**19° Encontro Nacional de Química Analítica e
7° Congresso Iberoamericano de Química Analítica**
Inovação para a Química Analítica Sustentável

16 a 19 de Setembro de 2018
Centro de Eventos e Convenções DiRoma,
Caldas Novas - GO

Certificamos que

o trabalho intitulado: Desenvolvimento e validação de metodologia por UPLC-MS/MS para determinação de PPCPs e DES na bacia hidrográfica do rio Guandu – RJ e no rio Piraquê-Açu – Aracruz - ES, de autoria de Frederico Goytacazes de Araujo, Marcia Marques Gomes, Eduardo Monteiro Martins, foi apresentado na modalidade 3. Espectrometria de Massas, durante o 19° ENQA - Encontro Nacional de Química Analítica e o 7° CIAQA - Congresso Iberoamericano de Química Analítica, realizado de 16 a 19 de setembro de 2018 no Centro de Eventos e Convenções do DiRoma em Caldas Novas/GO.

Caldas Novas, 19 de setembro de 2018.

Wendell Coltro
Wendell Karlos Tomazelli Coltro
Presidente do 19° ENQA e 7° CIAQA

ANEXO H - Participação no Encontro Nacional de Química Ambiental (Poster) 2019.



CERTIFICATE

We certify that **Frederico Goytacazes de Araujo, Marcia Marques e Eduardo Monteiro Martins** presented the work entitled "**Determinação de fármacos, produtos de cuidados pessoais e desreguladores endócrinos por UPLC-MS/MS na bacia hidrográfica do rio Guandu RJ**", as poster communication in the XIV Latin American Symposium on Environmental Analytical Chemistry, IX National Meeting on Environmental Chemistry, XII Workshop on Recent Advances on Sample Preparation and II CORSAN Seminar on Research and Innovation.


Renato Zanella
 RACAL President


Ednei Gilberto Primel
 Chair

Bento Gonçalves, November 8, 2019.

Osmar Damian Prestes
 General coordinator

ANEXO I - Participação no Encontro Nacional de Química Ambiental (Apres. Oral) - 2019.

XIV LASEAC
LATIN AMERICAN SYMPOSIUM ON ENVIRONMENTAL ANALYTICAL CHEMISTRY
NOVEMBER 6-8, 2019 BENTO GONCALVES - BRAZIL

Parallel Events
IX ENQAmb
Encontro Nacional de Química Ambiental
Workshop em Avanços Recentes no Projeto de Análises

CORSAN
II Seminário Corsan de Pesquisa e Inovação

CERTIFICATE

We certify that **FREDERICO GOYTACAZES DE ARAUJO** presented the lecture entitled "**Determinação de fármacos, produtos de cuidados pessoais e desreguladores endócrinos por UPLC-MS/MS na bacia hidrográfica do rio Guandu-RJ**" in the XIV Latin American Symposium on Environmental Analytical Chemistry, IX National Meeting on Environmental Chemistry, XII Workshop on Recent Advances on Sample Preparation and II CORSAN Seminar on Research and Innovation.

Renato Zanella
Renato Zanella
RACAL President

Ednei Gilberto Primel
Ednei Gilberto Primel
Chair

Bento Gonçalves
Bento Gonçalves, November 8, 2019.
General coordinator

Osmar Damian Prestes
Osmar Damian Prestes
General coordinator