



Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-Graduação Engenharia Ambiental
Mestrado em Engenharia Ambiental

Miriany Avelino Moreira

**“AVALIAÇÃO DE PERTURBADORES ENDÓCRINOS EM ÁGUAS
DO RIO DAS VELHAS POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA
ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título: “Mestre em Engenharia Ambiental – Área de Concentração: Saneamento Ambiental”

Orientador: Prof. Dr. Robson José de Cássia Franco Afonso

Ouro Preto, MG

2010

M838a

Moreira, Miriany Avelino.

Avaliação de perturbadores endócrinos em águas do Rio das Velhas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. [manuscrito] /Miriany Avelino Moreira - 2010.

xiv, 110 f.: il., color; graf., tabs., mapas.

Orientador: Prof. Dr. Robson José de Cássia Franco Afonso.
Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Francisco de Aquino.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.
Programa de Pós - graduação em Engenharia Ambiental.
Área de concentração: Saneamento ambiental.

1. Endocrinologia - Teses. 2. Cromatografia líquida - Teses. 3. Espectrometria de massa - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 543.42(815.1)

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



Ministério da Educação
Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Mestrado em Engenharia Ambiental
ICEB - Campus – Morro do Cruzeiro
Ouro Preto – MG – CEP 35.400-000
Fone: (031)3559-1725
E-mail: proagua@iceb.ufop.br

“Avaliação de perturbadores endócrinos em águas do rio das Velhas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas”

Autora: Miriany Avelino Moreira

Dissertação defendida e aprovada, em 25 de maio de 2010, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Professor Dr. Robson José de Cássia Franco Afonso- Orientador
Universidade Federal de Ouro Preto

Professor Dr. Adão Aparecido Sabino
Universidade Federal de Minas Gerais

Professor Dr. Sérgio Francisco de Aquino
Universidade Federal de Ouro Preto

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.
Muito, nos aproxima”

Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e sustento em todos os momentos da minha vida e pela capacitação na realização deste projeto.

Aos meus pais, Marcelo e Elizabete, e aos meus irmãos Wagner e Marcelo Júnio pelo apoio, esforço, amizade, amor e presença mesmo que à distância.

Aos meus familiares, em especial a minha avó Divina, *in memoriam*, pelo apoio e carinho.

Aos meus orientadores, Dr. Robson José de Cássia Franco Afonso e Dr. Sérgio Francisco de Aquino, pela oportunidade, paciência e ensinamentos que foram fundamentais para o crescimento acadêmico adquirido.

Aos professores do DEQUI, em especial ao prof. Dr. Maurício Coutrim, por compartilhar seus conhecimentos e experiências durante a graduação e mestrado.

A minha eterna casa SINTONIA e as minhas queridas irmãs de coração que compartilharam comigo todas as dificuldades e alegrias. Agradeço pela amizade e companheirismo que nunca faltaram.

Aos amigos da ABU e presbiteriana pela acolhida. Aos amigos da CASACA, em especial ao Ricardo, pela amizade fundamental nos piores e melhores momentos.

Aos companheiros de laboratório Júlio, Davi, Fernanda Queiroz, Fernanda Heleno, Aniel, Gustavo, Mark, Luana e Regiane pela amizade e preciosa ajuda.

Aos grandes amigos de Belo Horizonte e Divinópolis que mesmo distantes estiveram presentes me dando apoio e incentivo.

A fundação Gorceix pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
2- OBJETIVO.....	3
3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1- Introdução	4
3.2- Histórico e contextualização	7
3.3- Dinâmica Ambiental	10
3.4- Sistema endócrino	12
3.5- Mecanismo de ação dos perturbadores endócrinos.....	14
3.6- Efeitos dos Perturbadores Endócrinos.....	15
3.6.1- Efeitos em animais	15
3.6.2- Efeitos em humanos	17
3.7- Análise de Perturbadores Endócrinos	17
3.7.1- Amostragem	17
3.7.2- Preparo da amostra.....	18
3.7.3- Filtração e Ajuste de pH.....	18
3.7.4- Concentração e Extração.....	19
3.7.5- Eluição.....	19
3.8- Técnicas de análise de perturbadores	20
3.8.1- Imunoensaios.....	20
3.8.2- Métodos cromatográficos.....	22
3.9- Monitoramentos realizados	24
3.10- Remoção de Perturbadores Endócrinos	31
4- MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1- Padrões e Solventes.....	33
4.2- Limpeza de vidraria.....	33
4.3- Amostragem	34
4.4- Preparo da amostra	36
4.4.1- Filtração e Ajuste de pH.....	36
4.4.2- Extração e Concentração	37
4.4.3- Eluição e Secagem	38
4.5- Análise Cromatográfica.....	38
4.6- Ensaio de supressão.....	43
4.7- Validação da metodologia.....	43
4.7.1- Seletividade	44
4.7.2- Linearidade.....	45
4.7.3- Detectabilidade.....	45
4.7.4- Precisão	46
4.7.5- Exatidão.....	47
5- OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA	48
5.1- Solventes	48
5.2- Colunas.....	49
5.3- Modos de Ionização	49
5.4- Análise de nonilfenol	50
5.5- Efeito supressivo	51
5.6- Validação.....	52
5.6.1- Seletividade	52

5.6.2- Linearidade.....	55
5.6.3- Detectabilidade.....	57
5.6.4- Precisão	58
5.6.5- Exatidão.....	58
6- MONITORAMENTO	60
6.1- Estradiol e Etinilestradiol.....	61
6.2- Bisfenol.....	62
6.3- Dietilftalato	64
6.4- Nonilfenol	67
7- ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE OUTROS MICROCONTAMINANTES ORGÂNICOS PRESENTES NA ÁGUA DO RIO DAS VELHAS	76
7.1- Dietil(hexil) ftalato (DEHP).....	76
7.2- Cafeína	79
7.3- Octilfenol.....	81
7.4- Alquilbenzeno Sulfonato Linear (LAS).....	83
7.6- Triclosan.....	89
8- CONCLUSÃO	92
9- PERSPECTIVAS	93
10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 3. 1: Estruturas químicas dos PE estudados nesta pesquisa.....	6
Figura 3. 2: Representação esquemática de diferentes processos de transporte e destino de PE no meio ambiente.....	10
Figura 3. 3: Sistema endócrino	12
Figura 3. 4: Ação dos PE: a) resposta natural, b)efeito agonista, c) efeito antagonista	14
Figura 3. 5: Representação genérica da análise de PE por métodos de imunoenaios.....	21
Figura 4. 1: Mapa de localização das estações na bacia do alto curso do Rio das Velhas (Fonte: PNMAII –Programa Nacional do Meio Ambiente).....	35
Figura 4. 2: Fluxograma das etapas de preparo da amostra.....	36
Figura 4. 3: Cartucho C18 Strata (Phenomenex) com 500mg de fase sólida.....	37
Figura 4. 4: <i>Manifold</i> utilizado para extração em fase sólida.....	37
Figura 4. 5: Eluição das amostras.....	38
Figura 4. 6: Colunas C18 (Shimadzu) acopladas	39
Figura 4. 7: Esquematização do LCMS-IT-TOF.....	40
Figura 4. 8: Modelo de ionização por <i>electrospray</i> : (A) modelo da carga residual, e (B) modelo da evaporação de íons.....	40
Figura 4. 9: Cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas - <i>HPLC-MS-IT-TOF</i> (Shimadzu).....	42
Figura 5. 1: Estruturas químicas dos compostos analisados na forma iônica.....	50
Figura 5. 2: (a) Cromatograma da amostra av130nov para o bisfenol e dietilfitalato; (b) Espectro de massas MS^I para o bisfenol presente na amostra av130nov; (c) Espectro de massas MS^I para o dietilfitalato presente na amostra av130nov.....	53
Figura 5. 3: (a) Cromatograma da amostra av005maio para o estradiol e etinilestradiol; (b) Espectro de massas MS^I para o etinilestradiol presente na amostra av005maio; (c) Espectro de massas MS^I para o estradiol presente na amostra av005maio..	54
Figura 5. 4: (a) Cromatograma da amostra av005maio para o nonilfenol ; (b) Espectro de massas MS^I para o nonilfenol presente na amostra av005set.....	54
Figura 5. 5: Curvas analíticas dos compostos estudados.....	56
Figura 6. 1: Precipitação ocorrida na região metropolitana de Belo Horizonte no ano de 2009	60

Figura 6. 2: Boxplot da variação das concentrações de bisfenol nas diferentes pontos amostrais.....	63
Figura 6. 3: Distribuição de dietilftalato nas campanhas amostrais	65
Figura 6. 4: Boxplot da concentração de dietilftalato nos diferentes pontos de amostragem	65
Figura 6. 5: Boxplot dos valores de IQA medido nos pontos estudados em anos anteriores (2003 a 2008).....	66
Figura 6. 6: Boxplot da distribuição de nonilfenol nas campanhas amostrais	68
Figura 6. 7: Boxplot da concentração de nonilfenol nos diferentes pontos de amostragem	68
Figura 6. 8: Boxplot da distribuição de estreptococos fecais nos meses de janeiro e julho de anos anteriores (2003, 2004, 2007 e 2008).....	69
Figura 6. 9: Distribuição da razão CT/EF em amostras passadas	70
Figura 6. 10: Distribuição da turbidez no período de chuva e seca nos de 2003, 2004, 2007 e 2008	71
Figura 6. 11: Distribuição de sólidos totais em suspensão no período de chuva e seca nos de 2003, 2004, 2007 e 2008.....	71
Figura 6. 12: Análise das componentes principais dos parâmetros avaliados.....	72
Figura 7. 1: a) Cromatograma do ion medido $m/z=413,2667$; b) Espectro de massas obtido do íon $m/z=413,2667$	77
Figura 7. 2: (a) espectro de massas MS^2 obtido para fragmentação do íon $m/z=413,2667$; (b) cromatograma obtido para fragmentação do íon $m/z=413,2667$	78
Figura 7. 3: Mecanismo de fragmentação propostos para o bis etil(hexil)ftalato	78
Figura 7. 4: a) Cromatograma do ion medido $m/z=195,0876$; b) Espectro de massas obtido do ion $m/z=195,0876$	79
Figura 7. 5: (a) espectro de massas MS^2 obtido para fragmentação do íon $m/z=195,0876$; (b) cromatograma obtido para fragmentação do íon $m/z=195,0876$	80
Figura 7. 6: Mecanismo de fragmentação proposto para a cafeína	81
Figura 7. 7: (a) Cromatograma do ion medido $m/z=205,1598$; (b) Espectro de massas obtido do ion $m/z=205,1598$	81
Figura 7. 8: (a) e (c) espectro de massas MS^2 obtido para fragmentação do íon $m/z=205,1598$; (b) e (d) cromatograma obtido para fragmentação do íon $m/z=205,1598$	82
Figura 7. 9: Mecanismo de fragmentação propostos para dois isômeros do octilfenol.....	83

Figura 7. 10: (a),(b), (c) e (d) Cromatograma obtido para os íons $m/z=297,1515$, $m/z=311,1684$, $m/z=325,1840$ e $m/z=339,1999$	84
Figura 7. 11: (a), (b), (c) e (d) Espectros de massas obtidos para os íons $m/z=297,1515$, $m/z=311,1684$, $m/z=325,1840$ e $m/z=339,1999$	85
Figura 7. 12: (a), (b), (c) e (d): Cromatogramas obtidos na fragmentação dos íons $m/z=297,1515$, $m/z=311,1684$, $m/z=325,1840$ e $m/z=339,1999$	87
Figura 7. 13: (a), (b), (c) e (d): Espectros de massas MS^2 obtidos na fragmentação dos íons $m/z=297,1515$, $m/z=311,1684$, $m/z=325,1840$ e $m/z=339,1999$	88
Figura 7. 14: Mecanismos de fragmentação proposto para os LAS pesquisados.....	89
Figura 7. 15: (a) Cromatograma obtido para fragmentação do íon $m/z=286,9416$; (b) Espectro de massas MS^2 obtido para fragmentação do íon $m/z=286,9416$	90
Figura 7. 16: (a) Espectro de massas MS^1 observado para o íon de $m/z=286,9416$; (b) Espectro de massas MS^1 apresentado para o íon de $m/z=286,9439$; (c) Sobreposição dos espectros de massas MS^1 referentes ao íon medido de $m/z=286,9416$ e íon calculado de $m/z=286,9439$	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 3. 1: Algumas substâncias químicas classificadas como PE	5
Tabela 3. 2: Evolução cronológica dos fatos e evidências relativas aos efeitos relativos adversos causados pelos PE.....	8
Tabela 3. 3: Seminários, comitês e relatórios de avaliação sobre os PE	9
Tabela 3. 4: Propriedades físico-químicas de alguns perturbadores endócrinos.....	11
Tabela 3. 5: Principais hormônios produzidos pelo ser humano e suas funções.....	13
Tabela 3. 6: Trabalhos publicados sobre o monitoramento de perturbadores endócrinos em algumas matrizes ambientais	27
Tabela 3. 7: Tratamentos utilizados na remoção de perturbadores endócrinos.....	31
Tabela 3. 8: Tratamentos biológicos utilizados na remoção de perturbadores endócrinos .	32
Tabela 4. 1: Características dos padrões utilizados	33
Tabela 4. 2: Pontos de amostragem no Rio das Velhas.....	34
Tabela 4. 3: Tempo de análise e porcentagem de fase móvel	39
Tabela 4. 4: Segmentos e íons monitorados	42
Tabela 4. 5: Parâmetros de validação do INMETRO e ANVISA.....	44
Tabela 5. 1: Resposta (em área) obtida para os PE estudados para as fases móveis testadas	48
Tabela 5. 2: Porcentagem de supressão obtida para o nonilfenol em algumas amostras estudadas.....	52
Tabela 5. 3: Média e desvio padrão dos compostos para cada concentração usada na construção da curva de calibração	55
Tabela 5. 4: Parâmetros das equações das curvas analíticas dos compostos estudados e seus respectivos coeficientes de linearidade.....	57
Tabela 5. 5: Limite de detecção e quantificação do método desenvolvido para os compostos estudados.....	57
Tabela 5. 6: Desvio padrão relativo do padrão de 50µg/L	58
Tabela 5. 7: Índices de recuperação obtidos.....	59
Tabela 6. 1: Concentrações de etinilestradiol nas amostras	61
Tabela 6. 2: Concentrações de estradiol nas amostras.....	61
Tabela 6. 3: Concentrações de bisfenol A encontradas nas campanhas amostrais.....	63

Tabela 6. 4: Concentração de dietilftalato encontrada nas campanhas amostrais	64
Tabela 6. 5: Parâmetros utilizados no cálculo do IQA	66
Tabela 6. 6: Concentração de nonilfenol encontrada nas campanhas amostrais	67
Tabela 6. 7: Exemplos de efeitos endócrinos observados em animais machos expostos à perturbadores endócrinos no período pré-natal	73
Tabela 6. 8: Valores estimados de toxicidade (VM) para os perturbadores endócrinos estudados	75
Tabela 7. 1: Resultados gerados pelo programa <i>Formula Predictor</i> na busca por fórmulas correspondentes ao íon $m/z=413,2667$	77
Tabela 7. 2: Resultado gerado pelo programa <i>Formula Predictor</i> , na busca por fórmula correspondente ao íon $m/z=195,0876$	80
Tabela 7. 3: Resultado gerado pelo programa <i>Formula Predictor</i> , na busca por fórmula correspondente ao $m/z=205,1598$	82
Tabela 7. 4: Resultado gerado pelo programa <i>Formula Predictor</i> , na busca por fórmula correspondente aos íons $m/z=297,1515$, $m/z=311,1684$, $m/z=325,1840$ e $m/z=339,1999$	86
Tabela 7. 5: Resultado gerado pelo programa <i>Formula Predictor</i> , na busca por fórmula correspondente ao $m/z=286,9416$	90

LISTA DE NOTAÇÕES

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>
BPA	Bisfenol A
CAG	Carvão Ativado Granular
CDL	<i>Curved Dessolvation Line</i>
CEC	<i>Commission of the European Communities</i>
CG-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas
CI	<i>Chemical Ionization</i>
DEP	Dietilftalato
DEHP	Dietil(hexil)ftalato
DES	Dietilestibestrol
E1	Estrona
E2	Estradiol
E3	Estriol
EE2	Etinilestradiol
ECD	<i>Electron Capture Detector</i>
EI	<i>Electron Ionization</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ELRA	<i>Enzyme Linked Receptor Assay</i>
ESI	<i>Electrospray</i>
ETA	Estação de Tratamento de Água
FID	<i>Flame Ionization Detector</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>

INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IGAM	Instituto Mineiro de Gestão das Águas
IPCS	<i>International Programme on Chemical Safety</i>
IT	<i>Íon Trap</i>
Koc	Coeficiente de Sorção
Kow	Coeficiente de Partição Octanol-Água
LAS	<i>Linear alkylbenzene sulphonate</i>
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MS	<i>Mass Spectrometer</i>
NP	Nonilfenol
OMS	Organização Mundial da Saúde
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
POA	Processos de Oxidação Avançados
PE	Perturbador Endócrino
RIA	<i>Radio Immuno Assay</i>
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i>
SPME	<i>Solid Phase Micro-Extraction</i>
SRM	<i>Selected Reaction Monitoring</i>
TOF	<i>Time of Flight</i>
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
VTG	Vitelogenina

RESUMO

Compostos de difícil degradação sempre foram alvo de preocupação por parte de órgãos ambientais. Alguns destes compostos podem causar disfunção no sistema endócrino de homens e animais sendo conhecidos como perturbadores endócrinos. No presente estudo foram analisados cinco destes compostos (estradiol, etinilestradiol, bisfenol A, nonilfenol e dietilftalato) em amostras de água superficial, coletadas ao longo do Rio das Velhas (de Ouro Preto a Nova Lima - MG - Brasil). As análises foram realizadas utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas após a concentração dos analitos por meio de extração em fase sólida (SPE) com cartucho C18. A metodologia desenvolvida permitiu a análise de todos compostos simultaneamente, sendo o dietilftalato analisado no modo positivo de ionização e os demais compostos no modo negativo de ionização utilizando metanol e água como fases móveis. Um volume de 5µL de amostra foi injetado utilizando uma coluna C18 como fase estacionária com um tempo total de análise de 35 minutos. A quantificação dos perturbadores foi feita utilizando uma curva de calibração externa, sendo o limite de quantificação (S/N=10) de 4,3ng/L para o dietilftalato, 3,9ng/L para o nonilfenol, 3,6ng/L para o estradiol, 4,7ng/L para o etinilestradiol e 2,5ng/L para o bisfenol. As recuperações obtidas para o estradiol e etinilestradiol foram de 94,1% e 92,1%, respectivamente. Para dietilftalato, bisfenol e nonilfenol os valores obtidos de recuperação foram de 93%, 92,2% e 91,7%, respectivamente. Os compostos foram monitorados durante oito meses sendo o hormônio etinilestradiol encontrado ocasionalmente em concentrações que variam de 5,6 a 63,8ng/L, ao passo que o estradiol foi encontrado em apenas uma amostra na concentração de 62,6ng/L. Os compostos nonilfenol e dietilftalato foram encontrados em todas as amostras em concentrações que variam de 25,9 a 1435,3ng/L e 5,0 a 410,9ng/L. O bisfenol, o qual foi observado concentrações na faixa de 8,6 a 168,3ng/L, também foi encontrado em todas as amostras, contudo, em algumas análises as concentrações determinadas ficaram abaixo do limite de quantificação. Através de uma comparação com dados secundários determinou-se que o nonilfenol encontrado provavelmente provém da lixiviação deste composto de solo de culturas agrícolas, ao passo que o bisfenol e o dietilftalato provêm da lixiviação de plásticos presentes em esgotos e aterros sanitários. A origem dos hormônios estradiol e etinilestradiol não foi estabelecida devido a eventualidade com que estes foram encontrados.

ABSTRACT

Compounds of difficult degradation are always object of concern among environmental agencies. A growing interest in the scientific community has been observed when studies showed that some of these substances could cause dysfunction of the endocrine system of humans and animals, being known as endocrine disruptors. In this study five of these compounds (estradiol, ethinylestradiol, bisphenol A, nonylphenol and diethylphtalate) were analyzed in surface water samples collected along the Rio das Velhas river (from Ouro Preto to Nova Lima - MG - Brazil). The analyses were performed using liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry, after concentration of the analytes by solid phase extraction (SPE) with C18 cartridge. The method developed and validated allowed the simultaneous determination of all compounds, being diethylphtalate analyzed in positive ionization mode and the others compounds in negative ionization mode using methanol and water as mobile phase. The volume of 5 μ L of SPE extracts were injected into the HPLC, using C18 column as stationary phase, in a gradient reverse phase, with a total analysis time of 35 minutes. The quantification was done using external calibration curves and the estimated method quantification limit (S/N=10) was 4,3ng/L for diethylphtalate, 3.9ng/L for nonilphenol, 3.6ng/L for estradiol, 4.7ng/L for ethinylestradiol and 2.5ng/L for bisphenol A. Recoveries for estradiol and ethinylestradiol were 94.1% and 92.1% respectively. For diethylphtalate, bisphenol and nonylphenol recovery values obtained were 93.0%, 92.2% and 91.7% respectively. The substances were monitored for eight months at Rio das Velhas river. The synthetic hormone ethinylestradiol was occasionally found in concentrations ranging from 5.6 to 63.8ng/L, whereas estradiol was found in only one sample at a concentration of 62.6ng/L. Nonylphenol and diethylphtalate compounds were found in all samples in concentrations ranging from 25.9 to 1435.3ng/L and 5.0 to 410.9ng/L, respectively. The bisphenol A, which was observed at the concentration range from 8.6 to 168.3ng/L, was also found in all samples, however, in some of them the concentrations were found to be below the quantification limit. Through a comparison with secondary data it was determined that nonylphenol found probably comes from the leaching of soil from agricultural crops, while the bisphenol and diethylphtalate comes from leaching of plastics present in sewage and landfills. The source of estradiol and ethinylestradiol has not been established due to the eventuality that they were found.

1- INTRODUÇÃO

Micro-contaminantes orgânicos são frequentemente encontrados em águas superficiais. Estes compostos, em sua maioria, são recalcitrantes, sendo que alguns podem causar disfunção do sistema endócrino de homens e animais, sendo classificados como perturbadores endócrinos (PE) (Segner *et al*, 2003; Routledge *et al*, 1998). Entre os compostos que apresentam tais características destaca-se a notabilidade de alguns grupos, tais como, esteróides, produtos de higiene pessoal, surfactantes e aditivos industriais, devido à quantidade em que são encontrados no meio ambiente.

Os PE chegam ao meio ambiente por diferentes rotas, sendo a principal a contaminação provinda do lançamento de efluentes industriais e esgoto doméstico, tratado ou *in natura*, em corpos d'água. Tais microcontaminantes podem apresentar atividade estrogênica ou outro efeito biológico em concentrações muito baixas (nanogramas/litro) (Giroto *et al.*, 2007), o que traz a preocupação destes compostos serem uma ameaça à saúde pública, uma vez que muitos estão presentes em potenciais mananciais de abastecimento de água.

Hormônios como estradiol (E2) e etinilestradiol (EE2) são lançados diariamente em corpos aquáticos. O estradiol é um hormônio natural produzido pela mulher, enquanto o etinilestradiol é um hormônio sintético presente em pílulas contraceptivas e em tratamentos de reposição hormonal (Streck, 2009). Vários estudos mostram a presença destes perturbadores em efluentes e águas superficiais de vários países (Beck *et al*, 2005, Chen *et al* 2009, Peng *et al* 2008). Além destas substâncias, outras como bisfenol, nonilfenol e ftalatos também têm chamado a atenção da comunidade científica pela presença constante em esgotos tratados ou *in natura* e, conseqüentemente, pela potencial presença em mananciais de abastecimento de água. Destaca-se entre estes, o nonilfenol (NP) que é um subproduto da degradação do alquilfenol polietoxilado, utilizados como agentes surfactantes não-iônicos em produtos de limpeza (Schroder, 2001) e o dietilftalato (DEP) que é uma substância sintética comumente usada para aumentar a flexibilidade de plásticos usados na manufatura de brinquedos, utensílios, partes de automóveis dentre outros (USEPA, 2001). Outra substância que merece igual importância, devido a sua constante presença em águas monitoradas, é o bisfenol (BPA), um produto da degradação de plásticos à base de policarbonatos e resinas epóxicas (USEPA, 2001).

A principal preocupação referente à presença destes compostos em matrizes ambientais reside na sua capacidade de afetar o sistema endócrino de alguns animais. Estudos reunidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) mostraram que baixas quantidades de bisfenol e etinilestradiol, 2 e 0,02 μ g/kg/d respectivamente, causaram aumento na próstata de camundongos. Outros efeitos como a redução na quantidade de espermatozoides também foram observados para compostos como nonilfenol e estradiol nestes animais (Damstra *et al*, 2002). A presença de PE em águas superficiais também é uma preocupação do ponto de vista de saúde pública uma vez que pouco se sabe sobre a eficiência de remoção de tais compostos nos processos convencionais de tratamento de água.

Um estudo realizado por Moreira (2007) comprovou a presença dos perturbadores endócrinos estradiol, etinilestradiol e nonilfenol em três mananciais de águas da região metropolitana de Belo Horizonte. No rio das Velhas a análise foi feita no ponto de captação da ETA, sendo o nonilfenol encontrado em todas as amostras analisadas, em uma faixa de concentração variando de 44 a 1918ng/L. Estradiol e etinilestradiol foram encontrados em 15% das amostras, com as concentrações variando de 2 a 54ng/L.

Do exposto, percebe-se a necessidade de pesquisas voltadas ao desenvolvimento de metodologias de análise que permitam o monitoramento de microcontaminantes orgânicos em águas superficiais, particularmente no Brasil onde há poucos estudos sobre os níveis de contaminação em águas que são destinadas ao abastecimento público.

2- OBJETIVO

O projeto tem por objetivo principal a identificação e quantificação dos microcontaminantes orgânicos estradiol, etinilestradiol, nonilfenol, bisfenol e dietilftalato em amostras de águas superficiais. Para tal, foi utilizada como referência amostras de água do Rio das Velhas, em um percurso que abrange desde a Cachoeira das Andorinhas em Ouro Preto/MG até a chegada na estação de tratamento de água (ETA) de Belo Horizonte em Nova Lima/MG.

Os objetivos específicos são:

- Desenvolver e validar metodologia analítica para identificar os PE estradiol, etinilestradiol, nonilfenol, bisfenol e dietilftalato eventualmente presentes nas águas do alto Rio das Velhas;
- Monitorar a presença de perturbadores endócrinos, como os estradióis, bisfenol, nonilfenol e dietilftalato, em mananciais de água superficial do estado de Minas Gerais;
- Avaliar a influência de outros fatores como a sazonalidade pluviométrica na concentração dos perturbadores endócrinos nas campanhas amostrais.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- Introdução

Vários são os termos em português para definir os compostos que podem causar disfunção no sistema endócrino, tais como disruptores endócrinos, desreguladores endócrinos, perturbadores endócrinos entre outros. Neste trabalho optou-se pelo termo “perturbadores endócrinos”. A Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) define um perturbador endócrino como um “agente exógeno que interfere com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônio natural no corpo que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos” (USEPA, 1997). Outra definição para esse grupo de compostos, elaborada pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) juntamente com o Japão, EUA, Canadá, União Européia e Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), diz que “um perturbador endócrino é uma substância ou um composto exógeno que altera uma ou várias funções do sistema endócrino e tem, conseqüentemente, efeitos adversos sobre a saúde no organismo intacto, sua descendência, ou (sub)populações” (COM,1999).

Vários são os compostos que se enquadram nessa classe de substâncias. Para viabilizar um estudo mais consistente, a comunidade científica subdividiu esses PE em grupos, de acordo com sua aplicação (de Alda *et al.*, 2003). O critério adotado para inclusão ou exclusão nestes grupos foi baseado em estudos já existentes que comprovam ou não os efeitos dessas substâncias no meio ambiente ou em organismos. Em uma classificação feita pela CEC (Commission of the European Communities) 118 compostos foram classificados como perturbadores endócrinos (COM, 2001). A Tabela 3.1 apresenta alguns PE e suas respectivas classes.

Alguns destes grupos, tais como esteróides, produtos de higiene pessoal, surfactantes e aditivos industriais, receberam certo destaque da comunidade acadêmica devido à quantidade em que foram encontrados no meio ambiente. A estrutura química dos perturbadores endócrinos que foram estudados neste trabalho é apresentada na Figura 3.1.

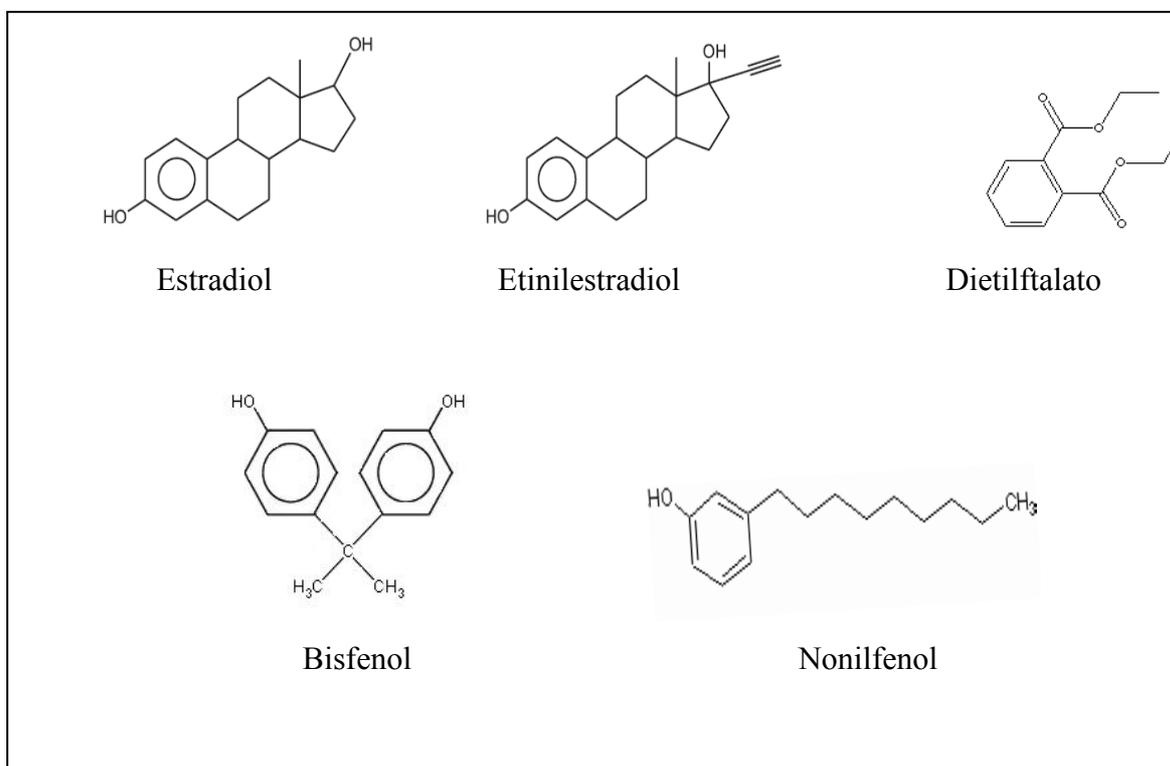


Figura 3. 1: Estruturas químicas dos PE estudados nesta pesquisa

Esteróides

Hormônios como estradiol e etinilestradiol são lançados diariamente em corpos aquáticos. O estradiol é um hormônio natural produzido pela mulher, ao passo que o etinilestradiol é um hormônio sintético utilizado na formulação de pílulas contraceptivas e em tratamentos de reposição hormonal (Streck, 2009). Estes estrogênios são excretados principalmente como conjugados de ácidos sulfúrico e glucorônico. Nesta forma, eles não possuem nenhuma atividade biológica direta, contudo, bactérias presentes no meio ambiente convertem estes hormônios na sua forma livre (Baronti *et al.*, 2000). Estudos mostram que a quantidade de hormônios excretados diariamente por uma mulher grávida pode chegar a 24mg/dia de estradiol (E3). Já o hormônio estradiol é excretado em menor quantidade alcançando uma média de 347µg/dia. Mulheres na pré-menopausa excretam uma média de 4,7µg/dia de estradiol e 10,73 µg/dia de estrona (E1). Para os homens estes

valores são bem menores com uma média de 1,5 µg/dia de estradiol e 3,9 µg/dia de estrona (Liu *et al.*, 2009).

Ftalatos

Os ftalatos possuem várias aplicações e alguns são citados pela União Européia como possíveis causadores de perturbação endócrina (COM,1999). Um destes compostos é o dietilftalato, uma substância sintética comumente usada para aumentar a flexibilidade de plásticos usados na manufatura de brinquedos, utensílios, partes de automóveis dentre outros. Este ftalato também é utilizado em cosméticos e inseticidas (USEPA, 2001).

Surfactantes e seus metabólitos

Os surfactantes são lançados diariamente em corpos d'águas e alguns, juntamente com seus metabólitos, possuem evidências que os classificam como perturbadores endócrinos. Um desses compostos é o nonilfenol, um subproduto da degradação do nonilfenol etoxilado utilizado como surfactante não-iônico em aplicações domésticas e industriais (Schroder, 2001). Estudos realizados por Brix *et al.* (2001) mostraram que o metabólito nonilfenol é considerado de baixa degradabilidade.

Aditivos Industriais

Muitos aditivos utilizados em produtos industriais possuem potencial estrogênico. Estes aditivos podem sofrer lixiviação e atingir o meio ambiente. Como exemplo cita-se o bisfenol A utilizado na produção de policarbonatos e resinas epóxicas. Esses policarbonatos são comumente empregados em embalagens de comidas e bebidas, brinquedos entre outros (USEPA, 2001). Outra aplicação menos importante inclui seu uso como antioxidantes na produção de policloreto de vinila.

3.2- Histórico e contextualização

O estudo de substâncias que podem causar disfunção no sistema endócrino ganhou um maior interesse da comunidade acadêmica nas últimas décadas, contudo, as evidências que certos compostos poderiam alterar o sistema endócrino de homens e animais surgiram no início do século passado. Alguns fatos, como o lançamento do livro *Silent Spring* (Primavera Silenciosa) de Rachel Carson e posteriormente do livro *Our Stolen Future*

(Nosso Futuro Roubado) de Theo Colborn contribuiu para que este tema se destacasse no meio científico. Muitos são os relatos que ajudaram a evidenciar as consequências destes compostos na natureza e alguns destes fatos são apresentados na Tabela 3.2 (Nogueira, 2003).

Tabela 3. 2: Evolução cronológica dos fatos e evidências relativas aos efeitos relativos adversos causados pelos PE

1923	Detecta-se atividade estrogênica em extratos biológicos
1950	Observa-se que o DDT evidencia atividade estrogênica
1962	Surgem as primeiras correlações entre os pesticidas/químicos sintéticos e os problemas de saúde ambiental observadas na vida selvagem
1963	Verifica-se que a exposição a hormônios naturais é perigosa e conduz ao câncer
1968	Descobre-se que o DDT apresenta atividade estrogênica nos mamíferos e aves
1971	Verifica-se que o DES (dietilestibestrol), um estrógeno, está na origem do câncer vaginal em mulheres cujas mães estiveram expostas a este produto durante a gravidez
1972	O uso de DDT é proibido em vários países
1976	Verifica-se que o DDE está interligado a problemas na reprodução humana
1977	A produção e aplicação de PCBs é restringida em alguns países
1980	A utilização de certos hormônios sintéticos é restringida em alguns países
1993	Detecta-se relação entre os xenoestrogênios e problemas no aparelho reprodutivo masculino e feminino
1996	Verifica-se que combinações de diversos xenoestrogênios apresentam sinergismos em diversos tipos de leveduras
1998	Começam a formar os primeiros grupos de investigação a nível mundial para estudar e dar resposta a esta problemática
1999	Desenvolvem-se estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> conducentes a elaboração de listas de substâncias classificadas como contendo potencial atividade estrogênica

Fonte: Adaptada de Nogueira (2003)

Mesmo com as diversas evidências citadas acima, organizações ambientais governamentais começaram a se reunir para discutir o problema bem posteriormente aos

primeiros relatos. A Tabela 3.3 apresenta alguns eventos realizados por organizações como a *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) e OMS para examinar e debater sobre o tema (Bila e Dezotti, 2007).

Tabela 3. 3: Seminários, comitês e relatórios de avaliação sobre os PE

Ano	Organização	Objetivos do Estudo
1995	Agência Ambiental Federal Alemã	Discussão sobre evidência e impactos dos PE e riscos potenciais que podem causar em humanos e animais
1995	USEPA	Seminários para avaliar os riscos à saúde e efeitos ambientais dos PE
1995	Ministério do Meio Ambiente e Energia da Dinamarca	Avaliação dos efeitos de substâncias estrogênicas no desenvolvimento e nas funções do sistema reprodutivo masculino
1996	USEPA	Seminário para desenvolvimento de estratégia para avaliar o risco dos PE no ambiente
1996	USEPA	Desenvolvimento de programa de testes e análises para avaliar a ação dos PE
1997	USEPA	Relatório sobre os PE presentes no meio ambiente
1998	USEPA	Revisão e discussão das informações científicas disponíveis sobre o PE
1998	(OCDE)	Desenvolvimento de métodos de ensaio para os PE
1999	<i>Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment (CSTEE)</i>	Revisão da literatura existente e opinião científica nas evidências dos PE, em particular, avaliação dos riscos ecológicos e diretrizes de ensaios toxicológicos
1999	Comissão das Comunidades Européias	Identificação do problema dos PE, suas causas, conseqüências e definição das medidas adequadas para dar uma resposta ao problema
2001	Comissão das Comunidades Européias	Primeiro relatório sobre o progresso dos trabalhos da comunidade europeia sobre os PE
2002	Comissão das Comunidades Européias	Programa COMPREHEND: Avaliação das evidências dos PE no ambiente aquático na Europa
2002	OCDE	Avaliação dos métodos de ensaios para as substâncias estrogênicas
2002	Organização Mundial da Saúde (OMS)	Avaliação global do estado da arte da ciência dos PE
2003	Instituto de Saúde Ecológica (IHE)	Relatório de avaliação do progresso internacional da pesquisa dos PE
2004	Comissão das Comunidades Européias	Segundo relatório sobre o progresso dos trabalhos sobre os PE.
2007	USEPA	Desenvolvimento de métodos para análise de PE em solo, sedimento e biosólidos por cromatografia.

Fonte: (adaptada de Bila e Dezotti, 2007)

Atualmente estas organizações já citam a existência e relevância destes perturbadores endócrinos em suas diretrizes referentes aos tratamentos de águas e efluentes, contudo, valores normativos ainda não foram estipulados.

3.3- Dinâmica Ambiental

Os PE chegam ao meio ambiente por diferentes rotas, mas a principal contaminação provém do lançamento de efluentes industriais e esgoto doméstico, tratado ou *in natura*, em corpos d'água. No Brasil o lançamento de esgoto *in natura* nos corpos d'água é comum, pois muitos municípios não possuem qualquer tipo de estação de tratamento. A Figura 3.2 mostra os diferentes caminhos dos PE no meio ambiente.

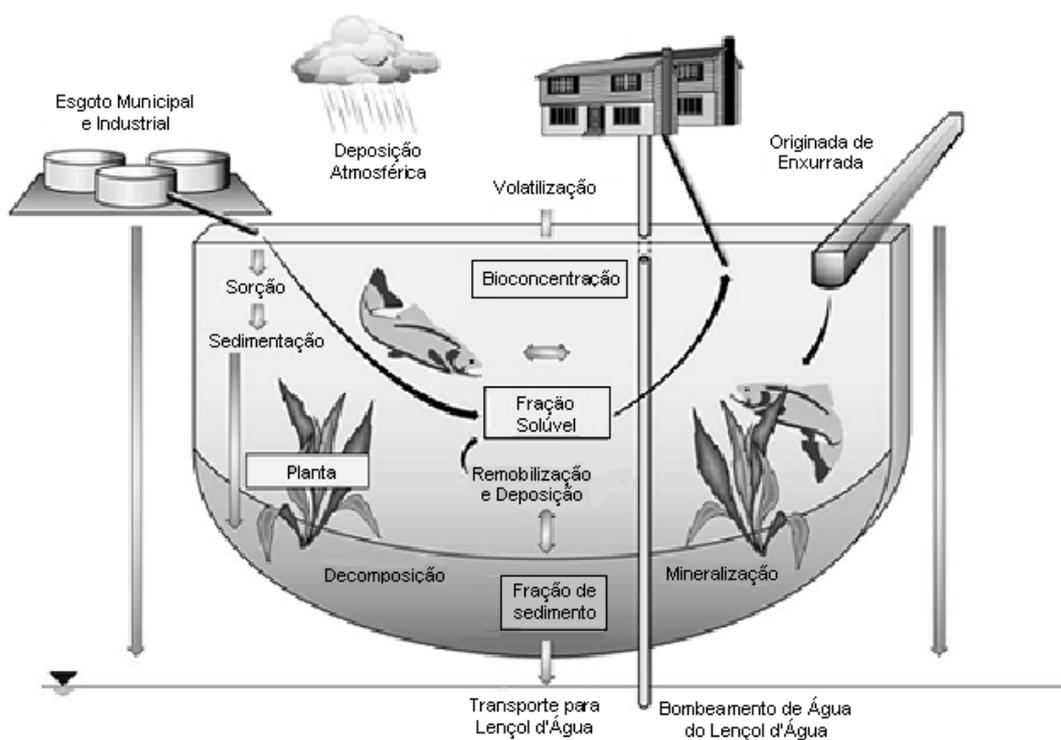


Figura 3. 2: Representação esquemática de diferentes processos de transporte e destino de PE no meio ambiente (adaptado de Campbell *et al.*, 2006)

Após o lançamento no meio ambiente, parte destes contaminantes orgânicos é adsorvida em sedimentos e/ou outros materiais e parte permanece dissolvida na água. A proporção de adsorção e dissolução é definida pelo coeficiente de sorção (K_{oc}) entre a fase

sólida e fase aquosa de cada composto e também por outras propriedades físico-químicas, tais como a sua solubilidade em água.

Outra propriedade peculiar de alguns PE que merece destaque é o coeficiente de partição octanol-água (Kow) que indica a afinidade dos compostos por substâncias lipofílicas. As definições de Koc e Kow são muito próximas. Compostos com alto Kow possuem grande afinidade por gorduras e pode acumular-se no tecido gorduroso de animais. Dos compostos estudados, o nonilfenol é o que apresenta maior Kow e estudos indicam que ele se acumula em tecido de peixes (Shao *et al.*, 2005). A Tabela 3.4 mostra algumas propriedades importantes para o estudo destes compostos no meio ambiente.

Tabela 3. 4: Propriedades físico-químicas de alguns perturbadores endócrinos

Composto	Solubilidade em água (mg/L)	Log Koc	Log Kow	pKa
E2	12,96	3,10 – 4,01	3,1 - 4,0	10,5-10,7
EE2	4,83	2,91 – 3,04	3,7 - 3,9	10,4
BPA	120	2,5 – 3,2	3,3	9,6 - 10,2
NP	5,43	3,56 – 5,67	5,76	10,7
DEP	1000	2,65	2,47 – 2,51	ne

Fonte: (Campbell *et al.*, 2006, Choi *et al.*, 2005, Lintelmann *et al.*, 2003, Westerhoff *et al.*, 2005, Yoon *et al.*, 2003, CICAD, 2003) ne: não encontrado

Nota-se que alguns PE possuem um log Koc relativamente elevado, portanto, podem ser adsorvidos em sedimentos ou outros materiais orgânicos. Contudo, apesar de possuírem uma maior possibilidade de permanecerem adsorvidos em sedimentos, alguns PE são constantemente encontrados em águas ou esgoto em quantidades significativas. Segundo Campbell *et al.* (2006) isto pode ocorrer devido a fatores como (1) maior solubilidade dos metabólitos gerados; (2) transporte facilitado por colóides; (3) aumento da solubilidade através da elevação do pH (muitos PE tem pKa próximo a 10) e; (4) formação de micelas. Um estudo realizado por Brix *et al.* (2001) mostrou que a formação de micelas foi observada em compostos como o nonilfenol etoxilado.

3.4- Sistema endócrino

O sistema endócrino ou hormonal juntamente com o sistema nervoso formam um dos principais mecanismos de controle de funções essenciais do organismo de humanos e animais e pode ser dividido em três componentes principais (União Européia, 2009).

- Glândulas endócrinas: situadas em várias partes do corpo humano e em áreas específicas do cérebro. As células destas glândulas secretam químicos específicos chamados de hormônios (Figura 3.3).
- Hormônios: circulam por todo o corpo através de canais sanguíneos e módulos celulares ligando-se a receptores alvos nas células. Hormônios que estimulam e controlam a atividade de outras glândulas endócrinas são chamados de hormônios tróficos.
- Receptores: estão presentes nas células e uma vez ativados pela ligação dos hormônios, regulam as funções e processos através de interações com o DNA das células ou outros processos intracelulares complexos.

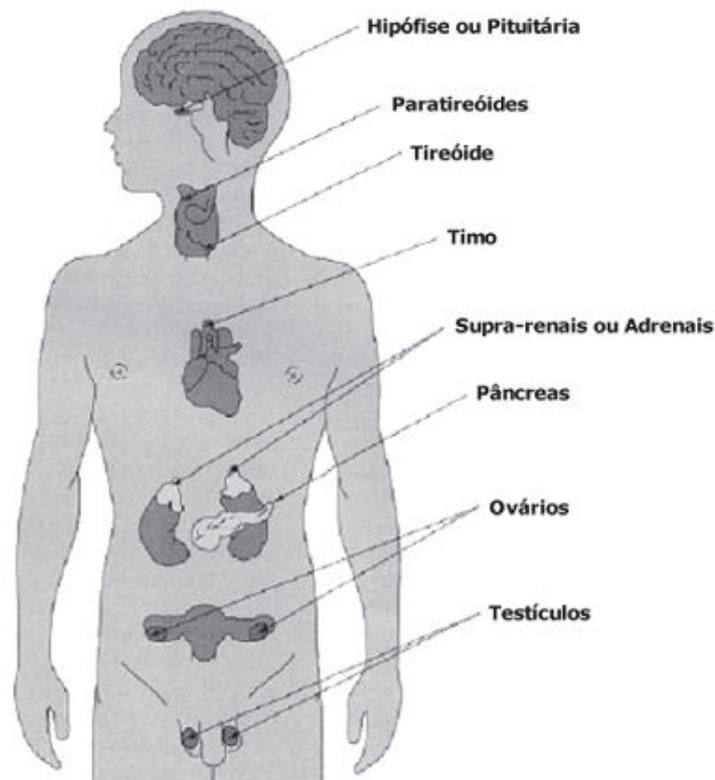


Figura 3. 3: Sistema endócrino (Ghiselli e Jardim, 2007)

De uma forma geral, o mecanismo de ação do sistema endócrino é iniciado na reação de células nervosas a certos estímulos como fome, medo ou outras alterações no organismo. Com isso, sinais são enviados às glândulas endócrinas, as quais liberam hormônios adequados que levarão instruções para células alvos onde se ligarão a receptores específicos. O receptor interpreta a mensagem hormonal traduzindo-a mediante um de dois processos celulares distintos: (i) ordena ao gene que produza novas proteínas, o que causa efeito a longo prazo como crescimento ou maturação sexual e reprodutiva; (ii) altera a atividade de proteínas existentes na célula, o que provoca uma resposta rápida do organismo como o aumento do ritmo cardíaco ou variação dos níveis de açúcar no sangue (Nogueira, 2003). A Tabela 3.5 apresenta os principais hormônios produzidos no organismo humano.

Tabela 3. 5: Principais hormônios produzidos pelo ser humano e suas funções

Glândula	Hormônio	Função
Hipotálamo	Libera hormônios	Estimula a atividade pituitária
Pituitária	Hormônios tróficos (estimulantes)	Estimula atividade (tireoidal, adrenal, gonadal e pancreática)
Tireóide	Hormônios tireoidais	Regulam o metabolismo, crescimento, desenvolvimento, comportamento e puberdade
Adrenal	Hormônios corticosteróides Catecolaminas	Regulam o metabolismo e o comportamento
Pâncreas	Insulina e glucagona	Regulam os níveis de açúcar no sangue
Gônadas	Hormônios esteróides sexuais	Regulam o desenvolvimento e crescimento, reprodução, imunidade, começo da puberdade e comportamento

Fonte: site http://ec.europa.eu/environment/endocrine/definitions/index_en.htm (acessado em 28/11/2009)

Os hormônios influenciam em várias outras funções reguladoras essenciais do organismo e por isso o seu equilíbrio é fundamental para evitar distúrbios funcionais. Segundo Nogueira (2003) o sistema endócrino nos organismos é estimulado com baixíssimas concentrações de hormônios, da ordem de parte por bilhão (ppb) ou até mesmo parte por trilhão (ppt) e por isso a presença de traços ou teores vestigiais de químicos orgânicos exógenos poderão ser perniciosos prejudicando gravemente o desenvolvimento de todo o organismo.

3.5- Mecanismo de ação dos perturbadores endócrinos

Os PE afetam o sistema endócrino e conseqüentemente as funções vitais nos seres vivos, imitando, bloqueando ou provocando o colapso dos hormônios esteróides, sendo o mecanismo para esta desregulação complexo e diversificado (Nogueira, 2003). A sua ação no organismo humano e animal pode ocorrer de maneira direta ou indireta.

A ação natural do hormônio é de se ligar a um receptor específico que possui elevada afinidade e sensibilidade, produzindo uma resposta natural. Um PE pode afetar esse mecanismo diretamente se ligando ao receptor hormonal, imitando assim a ação do hormônio e gerando uma falsa resposta. Esse fenômeno é conhecido como efeito agonista. Outra interferência que pode ocorrer é o bloqueio do receptor hormonal pelos PE impedindo assim que ocorra a ligação entre o receptor e o hormônio. A este processo dá-se o nome de efeito antagonista. A Figura 3.4 exemplifica estes efeitos.

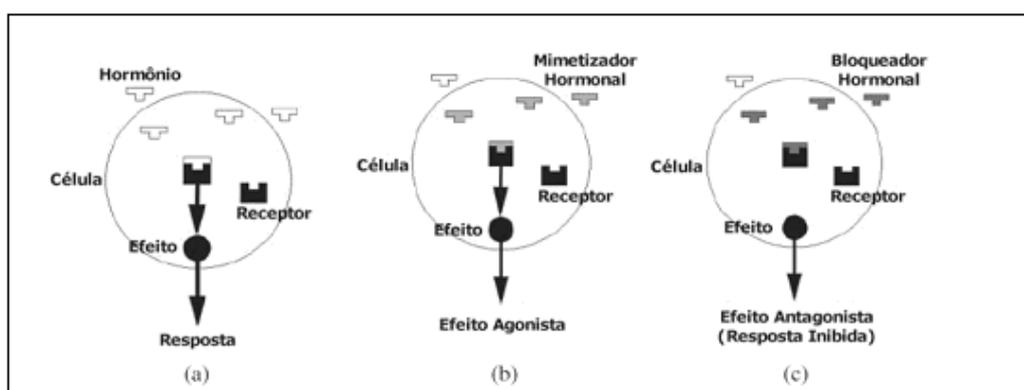


Figura 3. 4: Ação dos PE: a) resposta natural, b)efeito agonista, c) efeito antagonista (Ghiselli e Jardim, 2007)

Os PE podem causar vários tipos de danos ao organismo. Segundo Santamarta (2001) os efeitos que estes causam variam de uma espécie para outra e de uma substância para outra. Contudo, podem ser formulados em quatro hipóteses gerais: (1) os compostos podem ter efeitos totalmente distintos sobre o embrião, o feto e o organismo perinatal em relação ao adulto; (2) os efeitos provocados se manifestam com maior frequência nos filhos do que no progenitor exposto; (3) o momento da exposição no organismo em desenvolvimento é decisivo para determinar seu caráter e seu potencial futuro; e (4) ainda que a exposição crítica ocorra durante o desenvolvimento embrionário, as manifestações óbvias podem não se produzir até a maturidade (Santamarta, 2001).

A alteração do sistema endócrino também pode ocorrer na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação dos hormônios naturais do organismo, conduzindo a uma nova resposta hormonal, fraca ou forte, resultando em um sinal inexato para o corpo (Nogueira, 2003).

Vários são os danos que um PE pode causar no sistema endócrino e estes efeitos podem tornar-se mais críticos quando ocorre a ação simultânea de um ou mais perturbadores. Com isso, pode-se ter um aumento no potencial de ação destes compostos.

3.6- Efeitos dos Perturbadores Endócrinos

3.6.1- Efeitos em animais

Os PE estão conseguindo cada vez mais uma atenção especial da comunidade acadêmica devido aos efeitos que estes podem causar em animais e humanos. Muitos são os estudos que evidenciam uma ligação direta entre a presença desta classe de substâncias e alterações endocrinológicas em animais, contudo, não se sabe em que quantidade estes compostos são prejudiciais. Alguns autores defendem que mesmo em baixíssimas quantidades alguns destes perturbadores pode causar ao longo de anos efeitos na saúde humana e alterações em animais.

Os estudos realizados para comprovar estes efeitos normalmente utilizam o monitoramento de biomarcadores. Um biomarcador normalmente utilizado é a vitelogenina (VTG), uma proteína presente no plasma sanguíneo de animais vertebrados ovíparos fêmeas que é regulada por estrogênios (Cargouet *et al.*, 2007). Os machos destas espécies possuem baixos níveis desta proteína no plasma, contudo, quando expostos a compostos estrogênicos a produção de VTG é altamente induzida.

A exposição destes organismos a estes estrogênios causam um impacto direto sobre seus sistemas endócrinos. Um estudo realizado por Routledge *et al.* (1998) em duas espécies diferentes de peixes, *Oncorhynchus mykiss* e *Rutilus rutilus*, mostrou que a exposição destes animais ao 17 β -estradiol e à estrona por 21 dias em diferentes concentrações (1, 10, e 100ng/L) induziram um aumento de VTG no plasma proporcional as concentrações expostas. Estudos anteriores como o de Purdom *et al.*, (1994) também obtiveram resultados semelhantes para outros estrogênios como o 17 α -etinilestradiol. Os resultados obtidos indicaram que a presença deste composto causou feminização de peixes. Estudos mais recentes também mostraram que peixes apresentaram um aumento na produção de VTG em baixas concentrações (5ng/L a 24ng/L) de 17 α -etinilestradiol indicando um alto potencial estrogênico para este composto (Ferreira *et al.*, 2009, Saaristo *et al.*, 2009).

Estudos desenvolvidos ao longo dos anos mostraram que outros compostos como Bisfenol A também possuem atividade estrogênica. Isto foi comprovado quando camundongos expostos a este perturbador em baixas concentrações diárias (2 a 20 μ g/kg) apresentaram alterações no sistema reprodutor e redução na quantidade de espermatozoides em machos (Vom Saal *et al.*, 1998, Nagel *et al.*, 1997). Em peixes os efeitos no sistema endócrino foram observados em doses mais elevadas (375 μ g/L) (Segner *et al.*, 2003). Estudos mais recentes mostraram que BPA também pode provocar alterações no desenvolvimento embrionário e reprodutivo de peixes (Ramakrishnan e Wayne, 2008). Em altas concentrações BPA pode causar ainda câncer em ratos (Jenkins *et al.*, 2009).

Outra classe de alquilfenóis que possui atividade estrogênica são os nonilfenóis. Uma pesquisa realizada por Matozzo e Marin (2005) mostrou que este composto provoca a produção de VTG em moluscos machos da espécie *Tapes philippinarum*, contudo, o potencial estrogênico deste composto é menor quando comparados com estrogênios naturais como o 17 β -estradiol (Nimrod e Benson, 1996).

Além de causar perturbação no sistema endócrino estes compostos podem sofrer bioacumulação. Alguns dados de monitoramentos realizados indicam que nonilfenol pode sofrer bioacumulação em algas, peixes e outros animais (Shao *et al.*, 2005, Ahel *et al.*, 1993).

O mesmo efeito de estrogenicidade pode ser observado em ftalatos. Pesquisas realizadas mostraram o DEHP (1mg/kg/dia) causou alterações no sistema hormonal e desenvolvimento fetal de camundongos (Tanida *et al.*, 2009).

3.6.2- Efeitos em humanos

Assim como em animais silvestres alguns estudos também apontam efeitos danosos relacionados à ingestão crônica de PE em humanos.

Uma das primeiras evidências de que determinados compostos orgânicos poderiam causar danos aos seres humanos surgiu em 1971 quando estudos com mulheres com um tipo raro de câncer apontaram a utilização de DES, um hormônio sintético, por suas mães como um dos principais causadores da doença. Outra consequência relacionada ao consumo desta substância foi a esterilidade destas mulheres (Herbst *et al.*, 1971). Outros estudos realizados posteriormente mostraram evidências de alteração no sistema endócrino causada por outros compostos. Harrison *et al.* (1997) relataram que os efeitos mais citados incluem:

- aumento da incidência de câncer testicular e próstata em homens e mama em mulheres;
- redução na qualidade e quantidade de espermatozoides;
- aumento na incidência de criptorquidismo e malformação do pênis;
- aumento na incidência de ovários policísticos em mulheres; e
- alteração física e mental no desenvolvimento de crianças.

Outros estudos ainda relatam a diminuição da ovulação e aumento da secreção da prolactina causado por bisfenol (Wozniak *et al.*, 2005).

3.7- Análise de Perturbadores Endócrinos

Do exposto acima percebe-se a necessidade de técnicas analíticas voltadas para o estudo destes perturbadores em amostras ambientais. É importante salientar que para se ter uma boa resposta com alta repetibilidade é necessário um grande rigor para evitar contaminação da amostra e perda do analito de interesse.

3.7.1- Amostragem

A amostragem é o primeiro estágio na análise de perturbadores e o rigor metodológico nesta etapa é fundamental para evitar contaminações ou outros problemas durante o preparo da amostra. Normalmente as amostras são coletadas em frascos âmbar de vidro para evitar adsorção dos compostos de interesse e fotodegradação. O volume de

amostra coletado depende do tipo de matriz analisada e da técnica de preparo utilizada. Estudos onde se utiliza micro extração em fase sólida (SPME) como forma de concentração dos analitos uma pequena quantidade de amostra é requerida. Psillakis e Kalogerakis (2003) utilizaram 5mL de amostra na análise de ftalatos em águas de rios. Volumes maiores são necessários quando extração em fase sólida (SPE) ou extração líquido-líquido são utilizadas. Os volumes comumente reportados para análise de perturbadores endócrinos em águas de rio são de 1000 ml (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2008a) e 500ml (Pedrouzo *et al.*, 2009). Volumes maiores podem saturar os cartuchos quando se utiliza SPE como forma de extração (Quintana *et al.*, 2004).

3.7.2- Preparo da amostra

A análise de perturbadores endócrinos em matrizes ambientais exige um tratamento prévio das amostras, pois normalmente têm-se matrizes complexas onde os analitos de interesse estão presentes em baixas concentrações. O tratamento inicial da amostra é uma etapa crucial no estudo dos PE, pois alguns efeitos causados pela complexidade da matriz só podem ser corrigidos nesta etapa. Em matrizes líquidas as etapas desse pré-tratamento são basicamente filtração da amostra, extração e concentração dos analitos.

3.7.3- Filtração e Ajuste de pH

A etapa de filtração consiste na retirada de sólidos das amostras onde normalmente se utiliza filtros de acetato de celulose ou fibra de vidro. A escolha do material do filtro deve ser cautelosa para evitar que os analitos de interesse sejam adsorvidos no material dos filtros. Em muitos estudos a retirada dos sólidos é feita utilizando-se filtros com pequenas porosidades (0,45 e 0,22 μ m) para evitar entupimentos na etapa de extração.

O ajuste de pH é realizado em muitos estudos para aumentar a afinidade entre os analitos de interesse e a fase orgânica utilizada para concentração e extração. Em um estudo realizado por (Quintana *et al.*, 2004) foi mostrado que a recuperação de compostos como o estradiol ou etinilestradiol não é afetada pelo pH, contudo, Liu *et al.* (2004) mostraram que para o nonilfenol a recuperação diminui com o aumento do pH. De fato, vários estudos que fazem análise de nonilfenol ou outros alquilfenóis em amostras aquosas utilizam ajustes de pH que variam entre 2 e 3.

3.7.4- Concentração e Extração

Diversos são os métodos existentes de concentração e extração de amostras ambientais líquidas. Métodos como sublimação do solvente, destilação a vapor e extração líquido-líquido foram muito utilizados no passado, entretanto, as desvantagens nas suas utilizações como gasto excessivo de solvente e formação de emulsões (extração líquido-líquido) fizeram com que outras alternativas fossem utilizadas na análise de amostras ambientais (Wu *et al.*, 2009, Petrovic *et al.*, 2002).

Atualmente os métodos mais comuns de extração de PE de fases aquosas são a SPME e a SPE. A SPME é baseada na distribuição dos analitos das amostras entre uma fase extratora imobilizada em uma fibra de sílica fundida e um headspace (fase líquida, sólida ou gasosa) ou entre uma fibra e a amostra líquida. Quando o equilíbrio é alcançado, uma quantidade máxima de analito é retida (Kayali *et al.*, 2006). Já mecanismo de SPE funciona como uma separação cromatográfica, onde ocorre a separação dos analitos de interesse pela afinidade de polaridade entre as fases envolvidas. Normalmente a fase estacionária é acoplada em discos ou cartuchos (Petrovic *et al.*, 2002).

Muitos são os materiais que podem ser usados na SPE, contudo, os mais frequentemente usados no estudo de PE são os de C18, que consiste em cadeia alifática de carbonos em suporte de sílica, e HLB Oasis que consiste em um copolímero poroso, o poli(divinil-benzeno-co-N-vinilpirrolidona), com uma capacidade de adsorção de compostos hidrofílicos e lipofílicos (Fontanals *et al.*, 2007, Gatidou *et al.*, 2007, Nie *et al.*, 2009). Em um estudo realizado por Liu *et al.* (2004) o cartucho HLB Oasis se mostrou com uma melhor eficiência de recuperação frente ao cartucho C18 na análise de estrogênios ambientais. Entretanto, o preço desse tipo de cartucho é bem superior aos demais, caracterizando uma desvantagem no custo-benefício.

3.7.5- Eluição

A etapa de eluição é realizada quando a extração é feita por SPE e consiste na retirada dos analitos retidos no cartucho durante a extração. A escolha do solvente utilizado nesta etapa depende das propriedades dos compostos de interesse e do cartucho utilizado. Assim em cartuchos C18 reporta-se com certa frequência a utilização de acetato de etila ou diclorometano (Farre *et al.*, 2007). Contudo, outros solventes como acetonitrila, acetona, metanol, dentre outros, também são utilizados para eluição (Zafra-Gomez *et al.*, 2008, Hu *et al.*, 2005).

Posteriormente à eluição é realizada a análise instrumental dos perturbadores endócrinos. Entretanto, em determinados estudos o solvente utilizado com melhor índice de recuperação é incompatível com a coluna utilizada na análise cromatográfica. Por isso é necessário uma secagem do extrato da amostra concentrado e ressuspensão com um solvente apropriado. O uso de nitrogênio gasoso nesta etapa é reportado em diversos trabalhos. A reconstituição normalmente é feita com o mesmo solvente utilizado na fase móvel, quando é utilizada cromatografia líquida para análise, e solventes voláteis, quando é utilizada cromatografia gasosa.

3.8- Técnicas de análise de perturbadores

Os PE estão presentes nas amostras ambientais em baixas concentrações e por isso são necessárias para sua análise técnicas que consigam a quantificação destes compostos em níveis traços. Para este tipo de análise tem-se utilizado basicamente métodos de imunoenaios ou cromatografia aliada a espectrometria de massas. Os métodos de imunoenaios são métodos biológicos que utilizam a especificidade das enzimas para determinação do analito de interesse, ao passo que a cromatografia se baseia na separação destes compostos pela diferença de afinidade entre os analitos para com uma fase estacionária.

3.8.1- Imunoenaios

Imunoenaios são facilmente efetuados e apresentam boa sensibilidade e especificidade, além disso, não necessitam de qualificação pessoal ou equipamentos de elevado custo (Ballesteros-Gomez *et al.*, 2009). Este método se baseia na produção de anticorpos ou receptores que se ligam de forma específica a substâncias que apresentam atividade estrogênica (Nogueira, 2003). Diversos são os anticorpos e receptores específicos utilizados para este fim. A Figura 3.5 representa genericamente a análise de PE por métodos de imunoenaios.

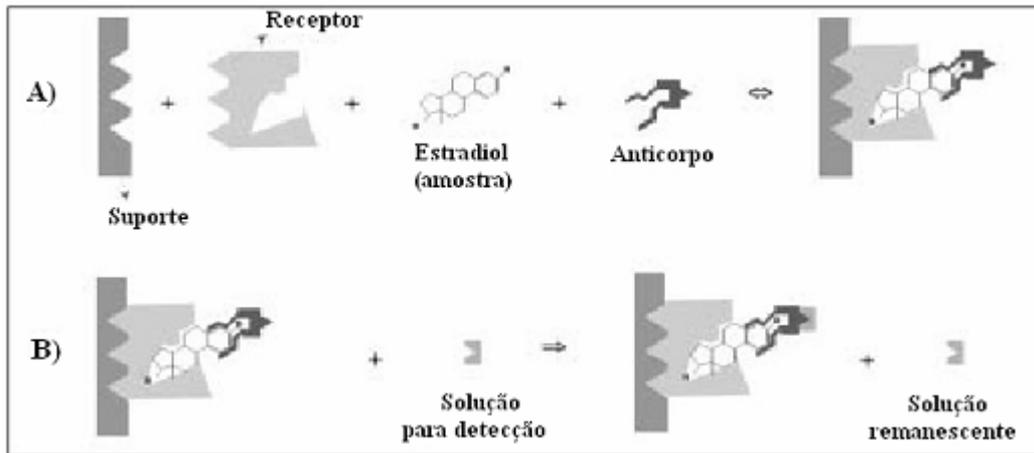


Figura 3. 5: Representação genérica da análise de PE por métodos de imunoenaios (Nogueira, 2003)

O receptor é imobilizado em um suporte onde posteriormente adiciona-se a amostra em estudo contendo estrogênios e anticorpos. Após um período de incubação (1-4h) uma solução adequada ao tipo de detecção é adicionada. As técnicas de detecção mais utilizadas são fluorescência (ELRA: *Enzyme Linked Receptor Assay*), atividade enzimática (ELISA: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) e radiação isotópica (RIA: *Radio Immuno Assay*) (Nogueira, 2003). A vantagem na utilização de biosensores está no fato destas análises serem consideradas simples e de baixo custo frente a outras técnicas, pois exigem o mínimo de preparação de amostras com matrizes complexas. Outras vantagens incluem a portabilidade para estudos de campo, e alguns biosensores podem ainda revelar outros efeitos biológicos como toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade (Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2007). Entretanto, algumas desvantagens fazem com que este tipo de análise para determinação de perturbadores endócrinos em amostras ambientais seja menos utilizada. Entre elas, destaca-se a impossibilidade de múltiplas análises e o elevado erro observado em estudos comparativos. Hankinson *et al.* (1994) mostraram em um estudo de reprodutibilidade interlaboratorial que o erro para medidas de estrogênios como estradiol em amostras de plasma por radioimunoensaios foi frequentemente superior a 25%. Em outro estudo, Mauricio *et al.* (2006) fizeram uma análise comparativa de PE entre a técnica de imunoenensaio ELISA e a técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS-MS). Em determinadas análises a diferença entre os valores chegou a mais de 50%. Estes erros podem ser relacionados a interferências de outros esteróides ou metabólitos presentes na amostra (Salvador *et al.*, 2007).

A necessidade de análises simultâneas de diversos compostos fez com que os kits de imunoenaios fossem menos utilizados. Assim métodos cromatográficos conquistaram um maior espaço para análise de perturbadores endócrinos em amostras ambientais.

3.8.2- Métodos cromatográficos

A cromatografia, tanto em fase líquida quanto gasosa, tem sido largamente utilizada para análise de PE. Esta técnica é um procedimento analítico fundamental e uma separação eficiente dos analitos durante a análise pode ajudar a evitar efeitos de ionização na matriz, diminuindo o risco de falsos resultados positivos ou negativos (Kuster *et al.*, 2009). Diversos são os modos de detecção para esta técnica, entretanto na análise de PE o uso de detector de captura de elétrons (ECD), espectrometria de massas (MS), detector de ionização de chama (FID) para cromatografia gasosa e UV, arranjo de diodos, MS e fluorescência para cromatografia líquida é frequentemente citado (Li *et al.*, 2008, Liang *et al.*, 2008, Ribeiro *et al.*, 2009, Sole *et al.*, 2000). Mesmo com tantas opções o acoplamento de espectrometria de massas com a cromatografia se destacou entre as demais devido a sensibilidade, especificidade e universalidade desta técnica.

Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) é habitualmente usada em análises ambientais. Uma das vantagens no uso de GC-MS é a alta resolução na separação de multianalitos (Giese, 2003). Entretanto, a pouca volatilidade de alguns compostos exige o acréscimo de uma etapa de derivatização no preparo das amostras (Petrovic *et al.*, 2002). Os métodos analíticos propostos na literatura aplicam diferentes agentes derivatizantes os quais incluem o uso de pentafluorobenzil (PFBr) N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) ou N-(tert-butildimetilsilil)-N-metil-trifluoroacetamida (MTBSTFA) que conduzem a formação de trimetilsilil (TMS) e tributilsilil (TBS). Estes compostos são frequentemente usados por apresentarem uma boa estabilidade e sensibilidade. (Fine *et al.*, 2003, Nakamura *et al.*, 2001, Schoene *et al.*, 1994, Shareef *et al.*, 2004).

As formas de ionização mais utilizadas para GC-MS são a ionização por elétrons (EI) e ionização química (CI). Os limites de detecção (LD) obtidos na utilização de cromatografia com estes tipos de detectores atendem as análises destes compostos em amostras ambientais. Em estudos realizados em águas de rios, obteve-se um LD de 2,0 ng/L para o BPA utilizando ionização por elétrons (Azevedo *et al.*, 2001). No estudo feito

por Nie *et al.* (2009) o LD encontrado para o NP utilizando EI como fonte de ionização foi de 30,3 ng/L. Uma comparação entre a utilização de EI e CI mostra que os cromatogramas obtidos quando ionização química é utilizada possuem menos interferentes, pois há uma redução na possibilidade de interferentes na etapa de ionização em matrizes complexas. Conseqüentemente, GC-CI-MS proporciona uma melhor razão entre sinal/ruído (S/N) (Barreda *et al.*, 2006).

Cromatografia Líquida

O grande problema na utilização de cromatografia líquida com a espectrometria de massas era o interfaciamento entre as duas técnicas, contudo, o desenvolvimento tecnológico das últimas décadas permitiu a aplicação desta técnica para análise de diversos compostos orgânicos. A principal vantagem da cromatografia líquida frente à gasosa é a análise de compostos como os PE sem a necessidade de derivatização. Em alguns estudos a detecção por meio de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas se mostrou superior a métodos de imunoenaios ou GC/MS em termos de seletividade, sensibilidade e simplicidade analítica (Sun *et al.*, 2009). Atualmente as interfaces mais utilizadas para análise de perturbadores em amostras ambientais aquáticas são electrospray (ESI) e ionização química por pressão atmosférica (APCI). ESI é particularmente utilizada para compostos polares enquanto APCI é muito eficiente na análise compostos de baixa e média polaridade (de Alda *et al.*, 2003). Um problema comumente encontrado na utilização de ESI e APCI para análise de PE é a dependência da resposta em função da pureza dos analitos. Em amostras mais complexas pode ocorrer um aumento do efeito matriz com a supressão ou a intensificação do sinal dos analitos (Mei *et al.*, 2003).

Diversas são as configurações de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para análise de compostos orgânicos, contudo, para análise de PE percebe-se uma maior utilização do triplo quadrupolo no modo SRM (*selected reaction monitoring*), pois assim tem-se uma boa seletividade e sensibilidade na análise de traços destes compostos no meio ambiente (de Alda *et al.*, 2003). Entretanto, mesmo com tais características, a resolução do triplo quadrupolo não é capaz de distinguir compostos com massas muito próximas, pois este tipo de aparelho possui resolução unitária assim, pode-se obter em determinadas análises falsos resultados positivos (Farre *et al.*, 2007, Grover *et al.*, 2009). Uma alternativa para aumentar a seletividade e evitar falsos resultados é a utilização de um espectrômetro de massas com tempo de voo (TOF-MS). Instrumentos que

possuem TOF como um de seus analisadores de massa combinam a habilidade e acurácia na determinação de massas com uma excelente sensibilidade (Niessen, 1999).

Em matrizes mais complexas, mesmo o uso de técnicas que aumentam a exatidão como TOF não são capazes de eliminar a ocorrência de supressão do sinal do analito de interesse. Isso acontece porque a supressão ocorre basicamente na fonte de ionização. Em determinadas amostras compostos presentes na matriz competem com os analitos de interesse no momento da ionização. A intensidade dessa supressão depende basicamente da estrutura química dos interferentes que determina a sua facilidade de ionização frente ao analito de interesse. Uma avaliação desse efeito supressivo realizada por Chiu *et al.* (2009) na análise de compostos estrogênicos mostrou que compostos mais polares como E1 e E3 apresentaram uma supressão de 8 a 18% em amostras de esgoto, ao passo que compostos como estradiol e etinilestradiol apresentaram uma supressão de 10 a 28% em matrizes sólidas mais complexas. Para redução dessa supressão um acréscimo de uma etapa de limpeza na amostra durante o pré-tratamento pode ser realizada. No estudo feito por Chiu, além desta etapa de limpeza, foi utilizado um spike com padrão interno deuterado dos compostos de interesse.

A análise do efeito supressivo em amostras ambientais complexas também foi feita por Koh *et al.* (2008) em alquilfenóis. O estudo mostrou que estes compostos podem apresentar uma supressão de 24% em efluentes domésticos. Estes valores foram bem superiores no estudo realizado por Jahnke *et al.* (2004), onde a supressão observada variou de 32% a 79%.

Os limites de detecção encontrados quando se utiliza cromatografia líquida com espectrometria de massas são bem expressivos. Em um estudo realizado por Lagana *et al.* (2004) em águas de rio o LD variou de 0,2 a 36 ng/L para xenoestrogênicos.

3.9- Monitoramentos realizados

O monitoramento de perturbadores endócrinos é realizado em vários países. Os estudos mostram que estes compostos estudados são encontrados em diversas quantidades. Os primeiros monitoramentos foram realizados após a suspeita de que determinados compostos químicos poderiam ser os causadores de anomalias observadas em animais silvestres.

Estudos posteriores como o de Rudel *et al.* (1998), onde BPA foi monitorado em afluentes e efluentes de uma ETE, relataram significantes quantidades destes compostos no meio ambiente.

Outros estudos publicados mostraram o monitoramento de BPA e outros PE em águas de rios e outras matrizes. Snyder *et al.* (1999), utilizando um cromatógrafo líquido com detector de fluorescência e o imunoensaio RIA, mostraram que 0,18 a 2,67 ng/L, 0,25 a 0,52 ng/L e 160 a 1140 ng/L de E2, EE2 e NP, respectivamente, foram encontrados em amostras de águas de rios dos Estados Unidos. Beck *et al.* (2005) monitoraram a presença de BPA, E2, EE2 e NP em águas marítimas da Alemanha utilizando LC-MS/MS. As quantidades encontradas foram de 0,11 a 5,7 ng/L, <4ng/L, 1,7 a 17,9 ng/L e 2,5 a 13,8ng/L respectivamente.

No Brasil o estudo de PE é relativamente recente. O primeiro relato da presença destes compostos em águas brasileiras foi publicado por Ternes *et al.* em 1999. Estradiol e etinilestradiol foram monitorados em um curto período de 6 dias em estações de tratamento de efluentes domésticos do Rio de Janeiro e foram encontrados com uma média de 21ng/L e <1ng/L, respectivamente. Monitoramentos com uma duração maior foram posteriormente realizados em águas brasileiras. Em 2006 Ghiselle monitorou PE em águas de rios de Campinas e as quantidades encontradas, 1,8 a 6,0 µg/L de E2, 1,3 a 3,5µg/L de EE2, 1,1 a 1,8µg/L de NP, 2,0 a 64,0µg/L de BPA e 0,2 a 3,0µg/L de DEP, foram relativamente significantes.

Em Minas Gerais o único trabalho realizado foi o de Moreira (2008) onde o monitoramento de E2, EE2 e NP nos principais mananciais de abastecimento da região metropolitana de Belo Horizonte foi efetuado. A concentração média encontrada de nonilfenol foi 402,9ng/L. E2 e EE2 foram encontrados em 15% das amostras analisadas em uma faixa de concentração de 2 a 54 ng/L. Os resultados obtidos foram semelhantes a estudos realizados em outros países onde estes compostos foram encontrados eventualmente. ,

Algumas propriedades inerentes a alguns destes compostos mostram-se relevantes nas quantidades em que estes são encontrados em determinadas matrizes. Um estudo realizado por Nie *et al.* (2009) na fase aquosa e sólida de lodos ativados mostrou que NP está presente em uma quantidade significativamente maior em matrizes sólidas. Este composto foi encontrado com média de 2308,7ng/g em sedimentos, enquanto na fase aquosa essa proporção foi bem menor, 199,8ng/L. Estas proporções já são esperadas, visto

que compostos como nonilfenol, com Kow e Koc relativamente elevados e baixa solubilidade, tem maior afinidade por sedimentos e se adsorvem neste tipo de matriz.

São vários os estudos realizados em matrizes ambientais. Estudos mais recentes mostram o monitoramento destes compostos no EUA, Alemanha, Austrália, China e em outros diversos países. A Tabela 3.6 apresenta alguns dados de monitoramento realizados pelo mundo dos perturbadores endócrinos estudados neste trabalho.

Tabela 3. 6: Trabalhos publicados sobre o monitoramento de perturbadores endócrinos em algumas matrizes ambientais

Referências	Localização	Fonte de origem	Tipo de extração	Tipo de detecção	NP (ng/L)	E2 (ng/L)	EE2 (ng/L)	BPA (ng/L)	DEP (ng/L)
(Azevedo <i>et al.</i> , 2001)	Portugal	Rio	SPE	CG-MS	(0,2 a 30)x10 ³	NA	NA	(0,2 a 4,0)x10 ³	NA
(Beck <i>et al.</i> , 2005)	Alemanha	Mar	SPE	LC-MS/MS	2,5 a 13,8	<LD	1,7 a 17,9	0,11 a 5,7	NA
(Benotti <i>et al.</i> , 2009)	EUA	ETA	SPE	LC-MS/MS e CG-MS/MS	130	17	1,4	14	NA
(Boyd <i>et al.</i> , 2004)	EUA	Rio	SPE	CG/MS	NA	< LD	NA	1,9 a 158	NA
(Bruchet <i>et al.</i> , 2002)	França	Esgoto bruto	SPE e líquido-líquido	CG-MS	<LD	10	2,5	NA	1,25x10 ⁴
(Cespedes <i>et al.</i> , 2006)	Espanha	Esgoto bruto	SPE	LC-MS	(5,59 a 17,5)x10 ³	NA	NA	(0,06 – 1,51)x10 ³	(3,67 – 16,2)x10 ³
(Cespedes <i>et al.</i> , 2006)	Espanha	Esgoto tratado	SPE	LC-MS	(0,33- 2,07)x10 ³	NA	NA	(0,7 – 2,7)x10 ²	(3,64 – 13,3)x10 ³
(Cespedes <i>et al.</i> , 2006)	Espanha	Rio	SPE	LC-MS	(0,10- 1,32)x10 ³	NA	NA	<LD	(0,15 – 9,77)x10 ³
(Chen <i>et al.</i> , 2009)	Taiwan	Esgoto bruto	APPI	LC-MS/MS	NA	84	<LD	NA	NA
(Farre <i>et al.</i> , 2007)	Espanha	Esgoto bruto	SPE	LC-MS/MS Kit ELISA	NA	0,5 a 1,1	<LD	NA	NA
(Fatoki e Noma, 2002)	África do Sul	Rio	SPE	CG- FID	NA	NA	NA	NA	(0,03 – 33,1)x10 ³
(Fernandez <i>et al.</i> , 2009)	Espanha	Esgoto bruto	SPE	LC-ESI-MS-MS e CG/MS	(3,31 a 7,22)x10 ³	NA	NA	(0,54- 2,06)x10 ³	NA

NA: não analisado <LD: menor que o limite de detecção NP: nonilfenol E2:estradiol EE2:etinilestradiol BPA:bisfenol DEP: dietilftalato

Tabela 3.6: Trabalhos publicados sobre o monitoramento de perturbadores endócrinos em algumas matrizes ambientais (continuação)

Referências	Localização	Fonte de origem	Tipo de extração	Tipo de detecção	NP (ng/L)	E2 (ng/L)	EE2 (ng/L)	BPA (ng/L)	DEP (ng/L)
(Fromme <i>et al.</i> , 2002)	Alemanha	Rio	SPE	GC-MS/MS	NA	NA	NA	(0,005 a 4,1)x10 ²	NA
(Ghiselli, 2006)	Campinas (Brasil)	Rio	SPE	CG-MS	(1,1 a 1,8)x10 ³	(1,8 a 6,0)x10 ³	(1,3 a 3,5)x10 ³	(0,20 a 6,4)x10 ⁴	(0,2 a 3,0)x10 ³
(Gibson <i>et al.</i> , 2007)	México	Esgoto bruto	SPE	CG-MS/MS	(11,0 a 22,4)x10 ³	18,0 a 22,0	<LD	(0,77 a 2,5) x10 ³	NA
(Gibson <i>et al.</i> , 2007)	México	Nascente	SPE	CG-MS/MS	1,8 a 8,0	0,01 a 0,02	0,06	0,4	NA
(Hibberd <i>et al.</i> , 2009)	Reino Unido	Rio	SPE	CG-MS/MS	NA	3,1–21,4	1,5	69,3	NA
(Kasprzyk-Hordern <i>et al.</i> , 2008b)	Reino Unido	Rio	SPE	LC-MS	NA	NA	NA	9 a 68	NA
(Kolpin <i>et al.</i> , 2002)	Estados Unidos	Esgoto bruto	Líquido – Líquido	CG-MS	(0,8 a 40)x10 ³	(1,6 a 2,0) x10 ²	(7,3 a 83,1)x10 ¹	(0,14 a 12)x10 ³	(2,0 a 4,2)x10 ²
(Komori <i>et al.</i> , 2004)	Japão	ETE	SPE	LC-MS/MS	NA	11 a 21	<LD	NA	NA
(Kuch e Ballschmiter, 2001)	Alemanha	Rio	SPE	CG-MS	6,7 a 134	0,15 a 3,6	0,10 a 5,1	0,5 a 14	NA
(Kuch e Ballschmiter, 2001)	Alemanha	Esgoto bruto	SPE	CG-MS	25 a 770	0,15 a 5,2	0,1 a 8,9	4,8 a 47	NA
(Kuch e Ballschmiter, 2001)	Alemanha	Água Potável	SPE	CG-MS	2,50 a 16	0,20 a 2,1	0,15 a 0,50	0,50 a 2,0	NA
(Lagana <i>et al.</i> , 2004)	Itália	Rio	SPE	LC-MS/MS	(1,3 a 1,5)x 10 ³	2–6	1,0	15 a 29	NA

NA: não analisado <LD: menor que o limite de detecção NP: nonilfenol E2:estradiol EE2:etinilestradiol BPA:bisfenol DEP: dietilftalato

Tabela 3.6: Trabalhos publicados sobre o monitoramento de perturbadores endócrinos em algumas matrizes ambientais (continuação)

Referências	Localização	Fonte de origem	Tipo de extração	Tipo de detecção	NP (ng/L)	E2 (ng/L)	EE2 (ng/L)	BPA (ng/L)	DEP (ng/L)
(Lei <i>et al.</i> , 2009)	China	Rio	SPE	CG/MS	NA	0,93 a 32,4	1,64 a 35,6	NA	NA
(Li <i>et al.</i> , 2008)	China	Rio	SPE	HPLC-UV	NA	NA	NA	NA	(1,15 a 2,10) x10 ³
(Liang <i>et al.</i> , 2008)	China	Água mineral	DLLME	HPLC-VWD	NA	NA	NA	NA	3,2x10 ³
(Liang <i>et al.</i> , 2008)	China	Água de lago	DLLME	HPLC-VWD	NA	NA	NA	NA	19,1x10 ³
(Liu <i>et al.</i> , 2004)	Reino Unido	Rio	SPE	CG-MS	4,0	14 a 17	<LD	9 a 24	NA
(Moreira, 2008)	Brasil	Rio	SPE	LC-MS	44 a 1918,2	1,5 a 36,8	3,0 a 54,0	NA	NA
(Nie <i>et al.</i> , 2009)	China	Esgoto bruto	SPE	CG-MS	199,8 a 229,6	<LD	6,3 a 6,7	134,0 a 135,3	NA
(Nie <i>et al.</i> , 2009)	China	Lodo	Ultrasson e SPE	CG-MS	2308.7 a 2323.6	<LD	<LD	101.3 a 127.3	NA
(Peng <i>et al.</i> , 2008)	China	Rio	SPE	CG-MS	30,55 a 6526	1 a 2	<LD	6 a 881	NA
(Ribeiro <i>et al.</i> , 2009)	Portugal	Rio	SPE	HPLC-DAD e GC-MS	<LD	<LD	<LD	183,0 a 880,0	NA
(Rudel <i>et al.</i> , 1998)	EUA	Esgoto tratado	CLLE	CG-MS	(2,5 a 3,3)x10 ⁴	NA	NA	0,94 a 1,5)x10 ²	NA

NA: não analisado <LD: menor que o limite de detecção NP: nonilfenol E2:estradiol EE2:etinilestradiol BPA:bisfenol DEP: dietilftalato

Tabela 3.6: Trabalhos publicados sobre o monitoramento de perturbadores endócrinos em algumas matrizes ambientais (continuação)

Referências	Localização	Fonte de origem	Tipo de extração	Tipo de detecção	NP (ng/L)	E2 (ng/L)	EE2 (ng/L)	BPA (ng/L)	DEP (ng/L)
(Rudel <i>et al.</i> , 1998)	EUA	Esgoto tratado	CLLE	CG-MS	ND	NA	NA	2,0 a 5,5)x10 ¹	NA
(Sanchez-Avila <i>et al.</i> , 2009)	Espanha	Esgoto doméstico /industrial	SPE	CG-MS	(5,09 a 193)x10 ³	NA	NA	(0,78 a 11,1)x10 ³	(2,22 a 19,2)x10 ⁴
(Snyder <i>et al.</i> , 1999)	Estados Unidos	Lago	SPE	LC-Fluorescência e RIA	160 a 1140	0,18 a 2,67	0,25 a 0,52	NA	NA
(Sole <i>et al.</i> , 2000)	Espanha	Rio	SPE	LC-DAD-MS	(0,2 a 6,4)x10 ²	NA	NA	NA	NA
(Sun <i>et al.</i> , 2009)	China	Rio	SPE	LC-MS/MS	NA	NA	5,0 a 127,9	NA	NA
(Ternes <i>et al.</i> , 1999)	Brasil	ETE	SPE	CG-MS	NA	21	<LD	NA	NA
(Yang <i>et al.</i> , 2006)	China	Rio	SPME	CG-MS	(4,7 a 5,0) ×10 ³	1,0 a 1,1)x10 ²	NA	NA	NA
(Ying <i>et al.</i> , 2009)	Austrália	Rio	SPE	CG-MS e ELISA	287–2058	0,39 a 3,77	0,04 a 0,52	15 a 59	NA
(Zafra-Gomez <i>et al.</i> , 2008)	Espanha	Esgoto bruto	SPE	LC-MS	(1,2 a 1,5)x10 ²	NA	NA	<LD	(1,5 a 9,8)x10 ²

NA: não analisado <LD: menor que o limite de detecção NP: nonilfenol E2:estradiol EE2:etinilestradiol BPA:bisfenol DEP: dietilftalato

3.10- Remoção de Perturbadores Endócrinos

Os tratamentos convencionais de coagulação, sedimentação e filtração não são muito eficazes na remoção de perturbadores endócrinos em águas e esgotos (USEPA, 2001). Um estudo realizado por Choi *et al.* (2006) mostrou que a remoção de PE em águas contaminadas apresenta uma eficiência de 0 a 7%, com exceção do DEP onde a remoção é de 46%. Assim novas alternativas para tratamento destes compostos foram pesquisadas

Inúmeras são as alternativas buscadas para o tratamento eficiente de PE, entretanto, algumas possuem considerável destaque. O uso de carvão granular ativado foi testado em diversos estudos alcançando elevadas taxas de eficiência. O uso de ozonização e POAs é também foi avaliado em diversos estudos. Essas tecnologias e outros diversos tratamentos utilizados na remoção de perturbadores endócrinos são apresentados na Tabela 3.7.

Tabela 3. 7: Tratamentos utilizados na remoção de perturbadores endócrinos

Referência	Compostos	Tratamento	Remoção
(Alum <i>et al.</i> , 2004)	E2, EE2, BPA	Cloração e ozonização (1.5 mg/L de O ₃ e 0,25–2,0 mg Cl ₂ /L)	75% a >99%
(Bila <i>et al.</i> , 2005)	E2	Ozonização (1,0 mg/L e 10 mg/L de O ₃)	80% e 99,6%
(Bodzek <i>et al.</i> , 2004)	DEP e BEHP	Osmose reversa, nanofiltração, ultrafiltração	97,6 a 99,9%
Choi <i>et al.</i> (2006)	NP	Ozonização 4mg/L de O ₃ Tempo de contato: 7 min	100%
(Cui <i>et al.</i> , 2009)	BPA	Degradação eletroquímica (Ti/Sb–SnO ₂ : 10mA/cm ²)	90%
Gallenkemper <i>et al.</i> 2003	NP e BPA	Nanofiltração	70 a 100%
(Gomez e Sarria, 2009)	BPA	UV/TiO ₂ (100 mg/L de TiO ₂) Tempo de contato: 240 min	83,2
(Jiang <i>et al.</i> , 2009)	E2	Oxidação com MnO ₂ Tempo de contato: 8 hs	>90%
(Rudder <i>et al.</i> , 2004)	EE2	Filtro biológico com MnO ₂ (Vazão: 1,2 L/h)	81,7%
(Yoon <i>et al.</i> , 2003)	BPA, E2 e EE2	CAP Tempo de contato: 1 e 4h	31 a 99%

Muitos estudos estão sendo realizados para que se tenha um tratamento eficiente destes microcontaminantes em águas e efluentes, contudo, a relação custo/benefício destes tratamentos os tornam pouco viáveis para implementação em tratamentos de efluentes de grandes vazões. Para efluentes, uma alternativa a estes tratamentos é a utilização de tratamentos biológicos com bactérias, fungos e/ou enzimas selecionados acoplados ou não com os tratamentos citados na Tabela 3.7. A Tabela 3.8 apresenta alguns estudos realizados utilizando fungos ou bactérias selecionados para remoção de perturbadores endócrinos.

Tabela 3. 8: Tratamentos biológicos utilizados na remoção de perturbadores endócrinos

Referência	Compostos	Tratamento	Remoção
(Auriol <i>et al.</i> , 2008)	E2 e EE2	Enzima lacase (produzida por <i>Trametes versicolor</i>) Tempo de contato: 1h	97%
(Cabana <i>et al.</i> , 2007)	NP e BPA	Enzima lacase produzida por <i>Coriolopsis polyzona</i> Tempo de contato: 4h	>95%
(Kang <i>et al.</i> , 2004)	BPA	Cultura de <i>Streptomyces sp</i> Tempo de contato: 10dias	>90%
(Sakurai <i>et al.</i> , 2001)	BPA	Enzima peroxidase produzida por <i>Coprinus cinereus</i> Tempo de contato: 40min	>99%
(Soares <i>et al.</i> , 2006)	NP	Lacase produzida por <i>Trametes versicolor</i> e lignina peroxidase produzida por <i>Bjerkandera sp</i> Tempo de contato: 5 dias	95%

Outros tratamentos biológicos de degradação aeróbica e anaeróbica otimizados garantem uma boa eficiência de remoção de tais compostos (Fernandez *et al.*, 2009, Lee *et al.*, 2005, Gonzalez *et al.*, 2004, Johnson *et al.*, 2000).

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Padrões e Solventes

As soluções de padrões utilizadas neste estudo foram preparadas em metanol a partir dos padrões apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4. 1: Características dos padrões utilizados

Composto	Fórmula Molecular	Massa Molar (g/mol)	CAS ¹	Marca	Pureza	Nome IUPAC ²
Estrogênio Natural						
17β-estradiol	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272,1776	50-28-2	Sigma-Aldrich	97%	estra-1,3,5(10)-trieno-3,17β-diol
Estrogênio Sintético						
17α-etinilestradiol	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296,1776	57-63-6	Sigma-Aldrich	98%	19-norpregna-1,3,5(10)-trien-20-ino-3-17
Xenoestrogênio						
Nonilfenol mistura	C ₁₅ H ₂₄ O	220,1827	84852-15-13	Pestanal	94%	n-nonilfenol
Bisfenol A	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	228,1151	80-05-7	Sigma-Aldrich	98%	4,4'-dihidroxi-2,2-difenilpropano
Dietilfitalato	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	222,0893	84-66-2	Sigma-Aldrich	97%	dietil benzeno-1,2-dicarboxilato

¹CAS: Chemical Abstract Service, ²IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC adquiridos da J. T. Baker. A água ultra-pura utilizada foi obtida em um sistema de purificação de troca iônica (TKA Wasseraufbereitungssysteme, Alemanha).

4.2- Limpeza de vidraria

A técnica utilizada é extremamente sensível e a presença de contaminantes pode interferir no resultado final das análises. Por isso uma adequada limpeza das vidrarias é essencial para um resultado confiável.

Todas as vidrarias utilizadas foram inicialmente lavadas com Extram® (2,5%), um detergente especial para retirada de compostos orgânicos com baixa concentração de lauril alquil sulfonados (LAS). As vidrarias foram enxaguadas com água deionizada e posteriormente foram colocadas em um recipiente contendo ácido nítrico (2,5%) o qual foi levado em banho ultrassônico durante uma hora. Em seguida foi realizado um enxágüe com água ultra-pura até a completa remoção do ácido nítrico.

4.3- Amostragem

A amostragem foi realizada em pontos estratégicos, nos mesmos pontos de coleta utilizados pelo IGAM (Instituto Mineiro de Gestão das Águas) no monitoramento do Programa águas de Minas Gerais, onde foram consideradas as condições naturais das águas e as principais interferências antrópicas, tais como ocupação urbana e atividades industriais (PNMAII, 2004). A Tabela 4.2 apresenta os pontos de coleta de amostras no rio e suas respectivas nomenclaturas.

Tabela 4. 2: Pontos de amostragem no Rio das Velhas

Estação	Localização	Descrição	Observação
AV005	Ouro Preto (43W 34' 32", 20S 18' 50")	Rio das Velhas a montante de São Bartolomeu	-
AV010	Ouro Preto (43W 36' 54", 20S 18' 16")	Rio das Velhas a jusante do ribeirão do Funil	-
AV040	Itabirito (43W 44' 48", 20S 12' 27")	Rio das Velhas a montante do rio Itabirito	Recebe contribuições provindas de Ouro Preto
AV130	Rio Acima (43W 47' 33", 20S 08' 16")	Rio das Velhas a jusante do rio Itabirito	Recebe contribuições provindas de Itabirito
AV210	Rio Acima (43W 47' 22", 20S 05' 17")	Rio das Velhas a jusante de rio Acima	Recebe contribuições provindas de Itabirito
AV260	Bela Fama (43W 49' 44", 20S 01' 09")	Rio das Velhas em Bela Fama, alça direita	Recebe contribuições provindas de Rio Acima
AV330	Raposos (43W 49' 03", 19S 59' 02")	Rio das Velhas a jusante do córrego da Mina e ribeirão Água Suja	Recebe contribuições provindas de Bela Fama

A localização destas estações no percurso do rio está identificada na Figura 4.1. As campanhas foram realizadas no período de maio a dezembro de 2009.

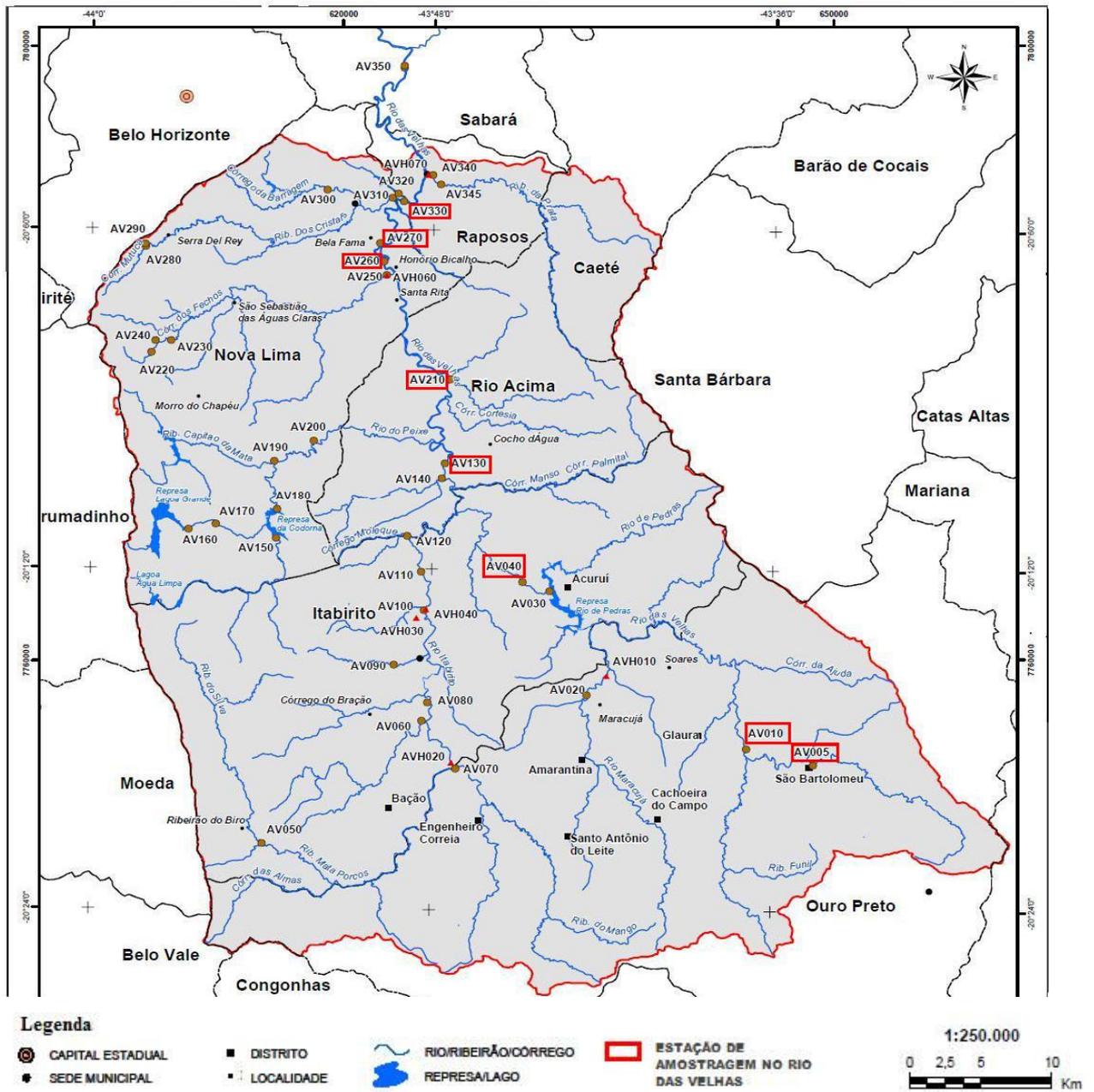


Figura 4. 1: Mapa de localização das estações na bacia do alto curso do Rio das Velhas (Fonte: PNMAII –Programa Nacional do Meio Ambiente)

As amostragens foram realizadas de forma pontual. As amostras coletadas são do tipo simples, de superfície, tomadas preferencialmente na calha principal do curso de água, tendo em vista que a grande maioria dos pontos de coleta localizam-se em pontes. As amostras foram coletadas usando frascos de amostragem de vidros âmbar. O uso

deste tipo de material minimiza a adsorção dos analitos no frasco. O armazenamento também foi feito em frascos de vidro, com 10 ml de metanol, para se evitar a degradação microbiológica dos compostos de interesse. Os frascos foram mantidos sob refrigeração até a chegada ao laboratório. O preparo da amostra foi feito em período máximo de 48 horas para evitar possíveis perdas do analito de interesse.

4.4- Preparo da amostra

Após a amostragem vários procedimentos são necessários para que a análise cromatográfica seja possível. A Figura 4.2 apresenta um fluxograma com a simplificação do procedimento realizado. Uma descrição detalhada é apresentada posteriormente.

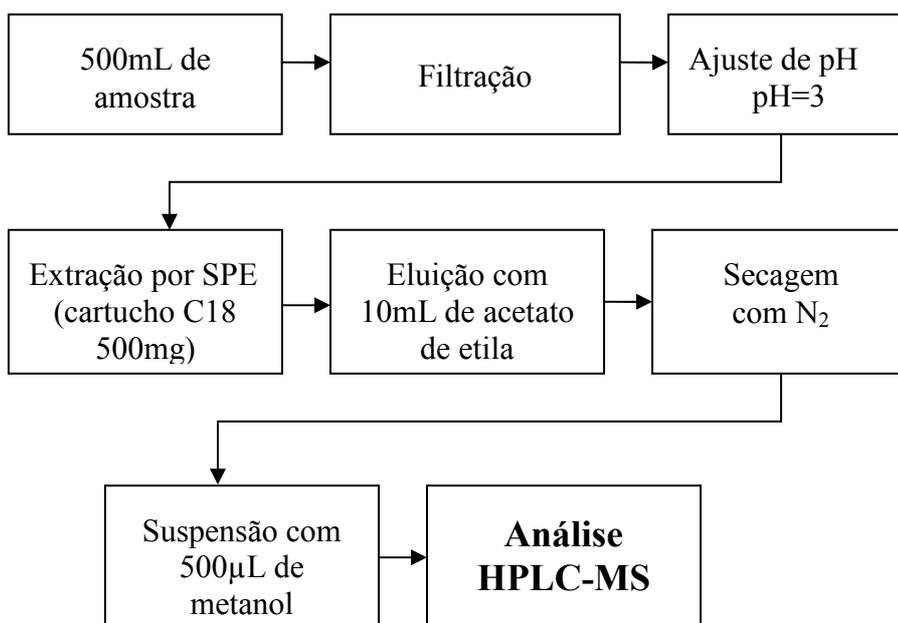


Figura 4. 2: Fluxograma das etapas de preparo da amostra

4.4.1- Filtração e Ajuste de pH

A amostra foi filtrada para retirada de sólidos suspensos. Para tal, foram utilizados no procedimento filtros de 24µm e 8µm de acetato de celulose e 1,2µm de fibra de vidro. Em seguida uma fração de 500mL foi transferida para um béquer onde o pH da amostra foi ajustado para 3 com ácido sulfúrico 50%(v/v). A amostra foi homogeneizada durante aproximadamente três minutos.

4.4.2- Extração e Concentração

O procedimento de extração em fase sólida (SPE) foi realizado para separar os analitos de interesse de outros componentes da amostra e concentrá-los para possibilitar a quantificação. Para o procedimento de extração em fase sólida foram utilizados cartuchos C18 (Phenomenex) com 500mg de fase sólida apresentados na Figura 4.3.



Figura 4. 3: Cartucho C18 Strata (Phenomenex) com 500mg de fase sólida

Uma etapa de preparação do cartucho foi necessária para ativar os sítios ligantes. Para tal fez-se o condicionamento do cartucho inicialmente com 5mL de acetato de etila. Em seguida 5mL de metanol foi passado e posteriormente 5mL de água ultra-pura. Após o condicionamento, 500mL da amostra com o pH ajustado foi passado pelo cartucho em uma vazão de aproximadamente 5mL/min. As amostras foram extraídas utilizando-se uma bomba de vácuo e um *manifold* (Figura 4.4). Em seguida foi aplicado um vácuo nos cartuchos para completa retirada da fase aquosa.



Figura 4. 4: *Manifold* utilizado para extração em fase sólida

4.4.3- Eluição e Secagem

A eluição consiste na retirada dos analitos de interesse que ficaram retidos no cartucho C18 através da passagem de um solvente com maior afinidade pelos analitos. Neste estudo foi utilizado acetato de etila. A escolha do solvente foi pautada nas propriedades físico-químicas que este apresenta e também na comprovada eficiência apresentada em outros estudos para eluição de perturbadores endócrinos (Moreira, 2008). A eluição foi realizada utilizando-se duas frações de 5mL de acetato de etila. A amostra gerada nesta etapa foi recolhida em frascos âmbar. A Figura 4.5 exemplifica esta etapa.



Figura 4. 5: Eluição das amostras

Após a eluição uma etapa de secagem foi necessária, pois o solvente utilizado na eluição é incompatível com a análise cromatográfica (HPLC). A secagem foi realizada utilizando-se um fluxo de nitrogênio gasoso. As amostras foram totalmente secas e posteriormente ressuspendidas em 500 μ L de metanol. O extrato obtido foi armazenado em freezer (-20°C) até o instante da análise cromatográfica. O tempo de armazenamento foi no máximo de uma semana.

4.5- Análise Cromatográfica

A análise dos perturbadores endócrinos neste estudo foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas. O cromatógrafo líquido é

equipado com um sistema binário de bombas (modelo LC-20AD Shimadzu) e um amostrador automático (modelo SIL 20AC - Shimadzu). No desenvolvimento metodológico foram testadas como fases móveis água/metanol, água acidificada/metanol acidificado e água/metanol com uma concentração de 5mmol/L de formiato de amônia. A fase móvel definida para análise foi água/metanol em um fluxo de 0,2mL/min. A rampa cromatográfica foi feita no modo gradiente onde as razões entre os solventes (água/metanol) foram modificadas de acordo com a Tabela 4.3.

Tabela 4. 3: Tempo de análise e porcentagem de fase móvel

Tempo	Fase Móvel
0 – 6 min	30 a 80% de metanol
6 – 10 min	80% de metanol
10 – 20 min	80 a 100% de metanol
20 – 28 min	100% de metanol
28 – 35 min	80 a 30% de metanol

O tempo total de corrida foi de 35 minutos e o volume de amostra injetado foi de 5µL. A separação cromatográfica foi realizada em duas colunas acopladas (C18 Shimadzu - 100 mm x 3mm x 3,2 µm de diâmetro de partícula) em fase reversa. A Figura 4.6 apresenta as colunas utilizadas.



Figura 4. 6: Colunas C18 (Shimadzu) acopladas

O espectrômetro de massas (Shimadzu LC-IT-TOF) utilizado neste estudo é equipado com fonte de ionização *electrospray* (modo negativo: -3,5 kV; modo positivo: +4,5kV). O aparelho possui dois analisadores de massa em série um “*ion trap* (IT)” seguido de um “TOF – *time of flight*”, que confere alta sensibilidade e resolução na obtenção de espectros. O CDL (*Curved Dessolvation Line*) foi mantido a 200°C. A

dissociação por colisão induzida, quando necessária, foi realizada com gás argônio. A Figura 4.7 representa a esquematização do espectrômetro de massas utilizado.

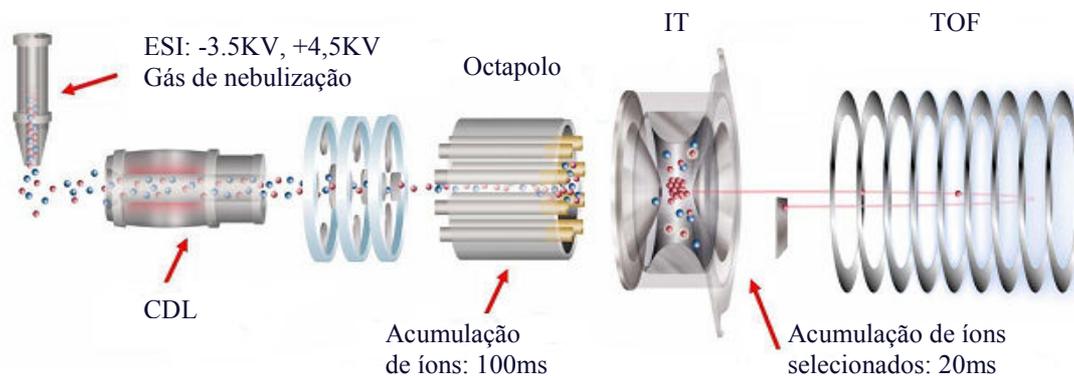


Figura 4. 7: Esquematização do LCMS-IT-TOF

O equipamento é composto por um cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas (Figura 4.9). Após a separação cromatográfica, a amostra chega a interface - electrospray onde ocorre a nebulização através da aplicação de gás nitrogênio em um fluxo de 1,5L/min. Nessa etapa também é aplicada uma diferença de potencial para geração de cargas nos compostos presentes na amostra. Posteriormente a amostra é secada através da aplicação de gás nitrogênio aquecido com uma pressão de 100KPa. Algumas teorias para explicação da formação de íons por este tipo de ionização, conhecido como electrospray (ESI), foram propostas, contudo, os modelos da carga residual e o modelo da evaporação de íons são os mais citados (Figura 4.8).

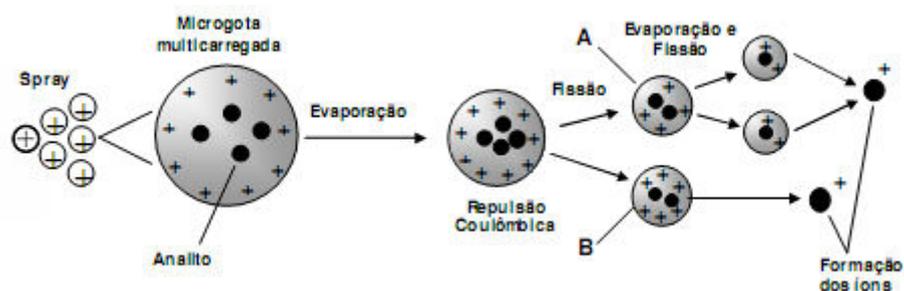


Figura 4. 8: Modelo de ionização por *electrospray*: (A) modelo da carga residual, e (B) modelo da evaporação de íons.

Nestes modelos, gotículas carregadas são formadas na nebulização. Durante a evaporação, ocorre uma diminuição do tamanho da gotícula, o qual é acompanhada por um aumento no campo elétrico da superfície. Em um certo estágio, a repulsão coulômbica entre as cargas superficiais excede as forças coesivas da tensão superficial e a gotícula explode formando gotas menores ainda. A partir desta etapa os modelos se diferem. O modelo da carga residual assume que as últimas gotículas formadas continuam a sofrer evaporação até uma total dessolvatação e assim ocorreria a transferência de carga do solvente para o analito. O segundo modelo, da evaporação de íons, sugere que os íons são emitidos (evaporados) quando as gotículas estão suficientemente pequenas e carregadas e seria neste momento que a carga seria transferida do solvente para o analito (Niessen, 1999).

Após a ionização, os íons são introduzidos no espectrômetro de massas por um tubo metálico aquecido (CDL) e passam por lentes colimadoras o qual são enviados para o octapolo. No octapolo, através de uma variação nas razões entre radiofrequência/voltagem e inversão nas voltagens em dois segmentos distintos, estes íons são acumulados e enviados para o primeiro analisador de massas, o íon-trap. No IT, os íons de interesse, em um determinado intervalo de tempo, ficam orbitando devido a uma variação nas razões entre radiofrequência/voltagem. Nesse primeiro analisador de massas também poderá ocorrer a fragmentação dos íons, o qual são dissociados através de uma colisão induzida com gás argônio. Posteriormente, os íons são enviados para um segundo analisador de massas, o TOF. No TOF, a separação dos íons é feita por mecanismos cinéticos onde os íons são acelerados através de um campo elétrico. A separação ocorre pela diferença entre a razão m/z de cada analito e confere alta resolução à técnica. A detecção é feita por um cintilador onde os íons que chegam ao detector geram uma deformação em uma superfície o qual fótons são liberados gerando um sinal amplificado.



Figura 4. 9: Cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas - *HPLC-MS-IT-TOF* (Shimadzu)

A análise dos compostos foi testada de forma simultânea (modo positivo e negativo) e de forma separada (uma corrida para o modo positivo e uma para modo negativo), contudo uma melhor resposta de área do pico/tempo de análise foi obtida na forma simultânea de análise. O instrumento utilizado permite a segmentação no tempo de corrida para melhorar a resposta obtida. Assim, a análise dos íons foi feita no modo SIM (*Selected Ion Monitoring*) e no modo SCAN simultaneamente, no qual a corrida foi subdividida em 5 segmentos mostrados na Tabela 4.4. O tempo de acumulação para cada íon foi de 100 milisegundos. A análise no modo SCAN foi feita em todos os segmentos para possível identificação de outros compostos que poderiam estar presentes nas amostras.

Tabela 4. 4: Segmentos e íons monitorados

Segmento	Tempo	Íon Monitorado	Modo de Ionização
1	0 – 11 min	SCAN	[M-H] e [M+H]
2	11– 12,50 min	227,1070	[M-H]
		245,0790	[M+H]
		SCAN	[M-H] e [M+H]
3	12,50 – 13,80 min	295,1704	[M-H]
		271,1704	[M-H]
		SCAN	[M-H] e [M+H]
4	13,80 – 23,00 min	219,1754	[M-H]
		SCAN	[M-H] e [M+H]
5	23,00 – 35,00 min	SCAN	[M-H] e [M+H]

A escolha do modo de ionização para cada íon foi baseada em suas propriedades químicas, sendo o dietilfitalato analisado no modo positivo de ionização e os demais compostos no modo negativo de ionização. A obtenção dos dados foi realizada através do software *LabSolutions/LCMS Real Time Analysis* (versão 3.41, Shimadzu Corporation).

4.6- Ensaio de supressão

Durante a ionização, na etapa de análise instrumental, pode ocorrer a supressão do sinal dos analitos de interesse devido à presença de outros compostos na matriz. Por isso foi necessário, após a análise das amostras, uma fortificação com uma concentração conhecida de padrões dos analitos de interesse para se avaliar os efeitos da matriz nas respostas. Neste estudo, as amostras contendo os analitos de interesse foram fortificadas com uma mistura de padrões, sendo cada composto presente na concentração final de 10 µg/L. A comparação entre a amostra fortificada e a amostra não fortificada permite avaliar o efeito supressivo e calcular a concentração real dos analitos na amostra. A porcentagem de supressão foi calculada de acordo com a Equação 4.1.

$$\text{Porcentagem de supressão} = \{ 1 - [(A_f - A_m) / A_t] \} \times 100 \quad (4.1)$$

onde

A_f = Área da amostra fortificada com padrão

A_m = Área da amostra sem fortificação

A_t = Área teórica do padrão utilizado na fortificação

4.7- Validação da metodologia

Segundo o Eurochem Working Group (1998) a validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer. No Brasil, duas agências são responsáveis pela verificação e competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam

procedimentos de validação de metodologias. Neste estudo, a validação foi pautada na resolução da ANVISA (2003) e nos documentos do INMETRO (2003) e EUROCHEM (1998). Os critérios utilizados pela ANVISA e INMETRO são apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4. 5: Parâmetros de validação do INMETRO e ANVISA

INMETRO	ANVISA
Especificidade/ Seletividade	Especificidade/ Seletividade
Faixa de trabalho e Faixa linear de trabalho	Intervalos da curva de calibração
Linearidade	Linearidade
Limite de Detecção (LD)	Limite de Detecção (LD)
Limite de Quantificação (LQ)	Limite de Quantificação (LQ)
Sensibilidade (inclinação da curva)	-
Exatidão e tendência (bias)	Exatidão
Precisão Repetitividade Precisão Intermediária Reprodutibilidade	Precisão Repetitividade (intra-corrída) Precisão Intermediária (inter-corrída) Reprodutibilidade (inter-laboratorial)
Robustez	Robustez
Incerteza de medição	-

Fonte: Ribani, 2004

Os procedimentos analisados neste estudo são descritos de forma detalhadas a seguir.

4.7.1- Seletividade

Um importante critério de qualidade de um método analítico é sua capacidade de fornecer sinais livres de interferentes e com resultados reais. A capacidade de discriminar entre um analito e os componentes interferentes de uma amostra é expressa como a seletividade de um método ou sistema de medição (Vessman, 2001)

A análise de perturbadores endócrinos neste estudo foi realizada monitorando-se íons selecionados (SIM- *Selected Ion Monitoring*) em alta resolução (< 10.000). A seletividade é obtida pelos tempos de retenção na cromatografia líquida e pelos cromatogramas de íons das espécies protonadas e deprotonadas em alta resolução. Assim tem-se uma metodologia altamente seletiva, visto que apenas os íons de interesse numa faixa muito restrita (± 10 ppm) são monitorados e detectados pelo analisador de massas.

4.7.2- Linearidade

A linearidade de um método analítico é a capacidade de obter resultados diretamente proporcionais as concentrações dos analitos nas amostras (ICH, 2005). Para quantificação de um determinado analito é necessário que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. Esta dependência é formulada como uma expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (INMETRO, 2003).

Neste trabalho a linearidade foi definida por padronização externa, onde foi realizada uma avaliação no intervalo de concentração (10 a 200 μ g/L para NP e DEP e 5 a 200 μ g/L para E2, EE2 e BPA) em que a curva analítica foi obtida. Um coeficiente de regressão linear maior ou igual a 0,90 é aceitável pelos órgãos normalizadores. Foram realizadas injeções em sete replicatas dos padrões de 5, 10, 20, 50, 90, 130 e 200 μ g/L de E2, EE2 e BPA e 10, 20, 50, 90, 130 e 200 μ g/L de NP e DEP utilizados para obter a curva analítica.

4.7.3- Detectabilidade

Limite de Detecção

Segundo a ANVISA (2003) o limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído e o método baseado em parâmetros da curva analítica (Ribani *et al*, 2004). Neste estudo para determinação do LD foi utilizado o método de relação sinal/ruído. Para tal, foi feita a análise dos padrões em baixas concentrações. Foram considerados como limite de detecção as concentrações de padrão cuja relação sinal/ruído fosse maior que 3.

Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) é definido como a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003). O LQ também pode ser estabelecido por diferentes métodos, contudo, em análises instrumentais o método da relação sinal/ruído é comumente utilizado. O procedimento experimental adotado para determinação do LQ foi idêntico ao citado anteriormente para o LD, entretanto, foram considerados como limite de quantificação as concentrações de padrão cuja relação sinal/ruído fosse maior que 10.

4.7.4- Precisão

O teste de precisão é utilizado para avaliar, de uma forma geral, a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Normalmente esta medida é expressa pelo desvio-padrão (INMETRO, 2003).

No estudo realizado a precisão foi estabelecida avaliando-se a repetibilidade na análise de padrões analíticos através do cálculo do desvio-padrão relativo. Foram realizadas sete replicatas de uma solução padrão de 50µg/L de cada composto estudado. Os valores de precisão foram calculados de acordo com a Equação 4.2. Segundo o INMETRO (2003) valores com até 20% de desvio relativo são aceitáveis.

$$\sigma_r = \sigma / C_{\text{média}} \times 100 \quad (4.2)$$

onde:

σ_r – desvio-padrão relativo

σ – desvio-padrão

$C_{\text{média}}$ – concentração média

4.7.5- Exatidão

A exatidão expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro ou aceito como referência (Lanças, 2004). Segundo Ribani *et al* (2004) os processos mais utilizados para avaliar a exatidão são materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão.

Neste estudo a exatidão foi avaliada através de um ensaio de recuperação. Para tal, foram utilizadas amostras reais, de 500mL cada, fortificadas em três concentrações diferentes (5, 90 e 200ng/L para E2, EE2 e BPA e 10, 90 e 200ng/L para NP e DEP). As amostras fortificadas foram posteriormente extraídas de acordo com o procedimento citado no item 4.4. Os testes e as análises foram feitos em triplicata. A recuperação foi calculada de acordo com a Equação 4.3.

$$\text{Porcentagem de recuperação} = [(C1 - C2) / C3] \times 100 \quad (4.3)$$

onde:

C1 = concentração determinada na amostra fortificada;

C2 = concentração determinada na amostra não fortificada;

C3 = concentração adicionada.

5- OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA

Para o desenvolvimento da metodologia, diversos parâmetros foram avaliados a fim de se obter uma metodologia otimizada. Os resultados obtidos são apresentados a seguir.

5.1- Solventes

A escolha do solvente a ser utilizado como fase móvel na análise cromatográfica depende de alguns fatores. A afinidade que este apresenta com os analitos de interesse e a compatibilidade da coluna com o solvente escolhido são determinantes para uma boa resposta cromatográfica. Outro fator que deve ser considerado é o comportamento do solvente frente aos modos de ionização para ESI. Solventes acidificados, por exemplo, melhoram, de forma geral as respostas de analitos que se ionizam com maior facilidade no modo positivo. Para o desenvolvimento do método analítico instrumental inicialmente foram testadas metanol e água como fase móvel devido a boa resposta que estes apresentaram na análise de alguns destes compostos (Moreira, 2008). Em seguida metanol e água acidificados (pH da fase próximo a 2,0) e metanol e água, ambos com formiato de amônio (pH da fase próximo a 4,5) foram testados para realizar uma comparação entre as fases, visto que fases com pH ácidos apresentam boas respostas no modo positivo de ionização. A Tabela 5.1 apresenta as fases analisadas e as respectivas respostas frente a cada analito estudado. Todas as análises foram feitas em triplicata.

Tabela 5. 1: Resposta (em área) obtida para os PE estudados para as fases móveis testadas

Composto \ Fase Móvel	Metanol e Água	Metanol acidificado/Água acidificada ⁽¹⁾	Metanol com formiato/Água com formiato ⁽²⁾
DEP	7.686.008 ± 502.376	10.748.299± 490.541	2.545.744± 565.349
BPA	12.723.421 ± 564.722	NQ	NQ
EE2	21.189.617± 490.385	NQ	NQ
E2	19.360.778± 546.453	NQ	NQ
NP	56.579.556± 2.570.147	NQ	NQ

(1) a fase foi acidificada com 0,1% de ácido fórmico

(2) foi utilizado formiato de amônia em uma concentração de 5mmol/L

NQ: não foi possível a quantificação do pico obtido

A melhor resposta para o dietilftalato foi obtida quando metanol e água acidificados foram utilizados como fase móvel, contudo, a resposta para os demais compostos inviabiliza a quantificação destes devido à baixa abundância de sinal das outras substâncias. Este resultado era esperado para o dietilfataato, pois este é analisado no modo positivo de ionização e um pH ácido facilita sua protonação. Para os demais compostos, analisados no modo negativo de ionização, a acidificação das fases dificultou a desprotonação das moléculas estudadas. Desta forma, a fase móvel constituída por metanol e água foi escolhida para análise dos compostos.

5.2- Colunas

A complexidade da matriz interfere diretamente na análise química dos compostos de interesse. Inicialmente foi testada durante o projeto a utilização de uma única coluna para separação dos compostos, contudo, a presença de outros compostos como LAS que possuíam o mesmo tempo de retenção dos analitos interferiram na quantificação dos compostos devido à supressão ocorrida na ionização. Uma modificação na porcentagem das fases da rampa cromatográfica foi feita na tentativa de modificar o tempo de retenção dos interferentes, contudo, a alteração realizada não foi suficiente para melhorar a separação entre os analitos e os interferentes. Uma alternativa testada foi a utilização de duas colunas. O uso de duas colunas aumenta o número de pratos teóricos e, conseqüentemente, uma melhora na separação dos compostos foi observada. Assim alguns dos interferentes presentes na matriz tiveram seus tempos de retenção alterados e o efeito supressivo da matriz foi minimizado.

5.3- Modos de Ionização

A espectrometria de massas é uma técnica baseada na análise de compostos em sua forma iônica, sendo assim, a produção de íons é necessária para que seja possível a identificação dos compostos de interesse. O tipo de ionização realizado para cada composto foi baseado em suas propriedades químicas. Compostos como nonilfenol, estradiol, etinilestradiol e bisfenol possuem facilidade de perderem um hidrogênio devido ao caráter ácido que este possui, portanto, uma melhor resposta foi obtida quando estes são ionizados negativamente. Entretanto, compostos como dietilftalato não possuem

hidrogênio ácido e por isso foram ionizados para sua forma catiônica. O dietilftalato, assim como outros compostos desta classe, forma um aduto com sódio e uma melhor resposta é obtida na análise do íon $[M + Na]^+$. A Figura 5.1 apresenta os íons analisados.

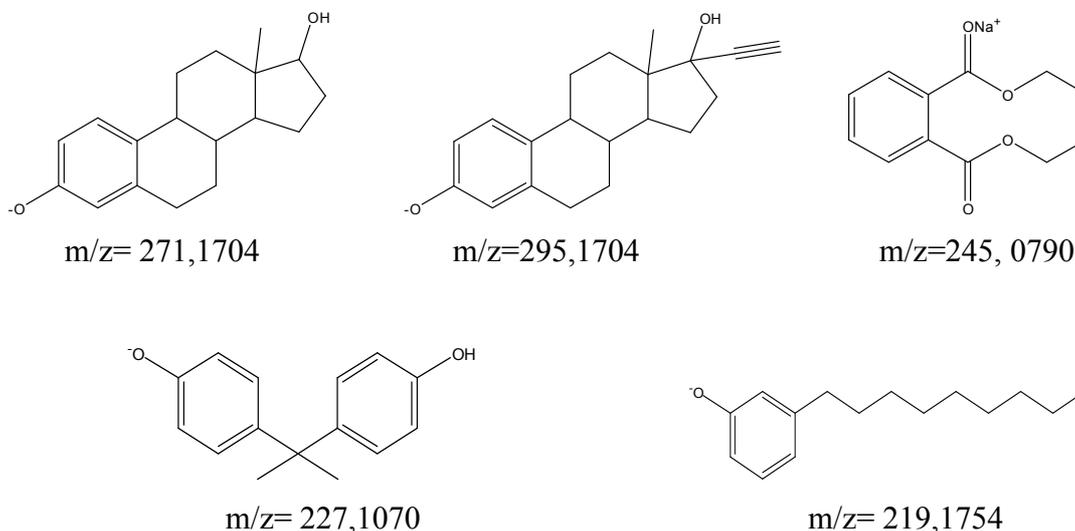


Figura 5. 1: Estruturas químicas dos compostos analisados na forma iônica.

O equipamento utilizado permite uma programação de análise de forma simultânea, ou seja, a diferença de potencial aplicada é constantemente alterada possibilitando uma ionização positiva e uma ionização negativa em tempos de até 100 milissegundos. Com este tipo de análise uma pequena perda na resposta dos analitos é observada, contudo, esta perda é relativamente insignificante, visto que a quantificação nos dois modos de ionização de forma separada exige o dobro do tempo de análise.

5.4- Análise de nonilfenol

A análise do nonilfenol foi limitada pela quantidade de isômeros que este composto possui. Uma total separação destes compostos é inviável, visto que o nonilfenol apresenta 550 isômeros os quais muitos são isômeros de posição (Guenther *et al*, 2006). Assim a quantificação do nonilfenol foi feita para um determinado intervalo de tempo do cromatograma. O intervalo escolhido para quantificação foi o mesmo intervalo apresentado para o pico do padrão utilizado que também é uma mistura de alguns isômeros de nonilfenol. Assim a quantidade de nonilfenol encontrada é uma estimativa da quantidade real deste composto em cada amostra.

5.5- Efeito supressivo

Em matrizes complexas, como água de rio, a análise de compostos de interesse pode sofrer interferência de outras substâncias. Essa interferência acontece basicamente no momento da ionização o qual ocorre uma competição no processo de ionização, fazendo com que o sinal do analito em questão seja intensificado ou suprimido. Este tipo de efeito foi observado na análise de fármacos e alguns perturbadores endócrinos em um estudo realizado por Kasprzyk-Hordern *et al* (2007) em águas superficiais do rio Taff no Reino Unido.

Na tentativa de minimizar este efeito uma adição de uma quantidade conhecida de padrão do analito foi feita em cada amostra onde foi observada a presença dos compostos em estudo. A quantidade adicionada de padrão foi de 20 μ L para uma concentração final de 10 μ g/L de cada composto para evitar grandes alterações na matriz. Assim a porcentagem de supressão foi calculada de acordo com a Equação 4.1 e corrigida para cada composto. A intensidade do efeito matriz ocorrido na análise sofre certa variação, visto que os constituintes da matriz são diferentes nas amostras.

O efeito supressivo não é muito bem explicado pela teoria da carga residual, visto que por este modelo a ionização dos analitos se daria de forma homogênea e portanto, a resposta no detector seria a mesma. A teoria da evaporação de íons é mais plausível na explicação deste efeito, pois os compostos contidos na superfície poderiam ter maior facilidade no momento da formação do íon e assim moléculas do interior da gota poderiam não sofrer ionização. A exemplificação deste modelo pode ser aplicada ao nonilfenol, que possui vários isômeros, o que dificulta o cálculo da supressão. Essa dificuldade ocorre porque o padrão adicionado utilizado, uma mistura técnica, possui somente alguns dos possíveis isômeros e estes não necessariamente são os mesmos isômeros presentes na amostra. O tipo de estrutura apresentado para cada isômero pode influenciar no momento da ionização, pois a disponibilidade para ionização na gotícula formada na pulverização pode ser alterada pela lipofilicidade do composto. Esta lipofilicidade também explica o motivo de compostos tensoativos como LAS apresentarem uma maior facilidade no momento da ionização frente a outros compostos com mesmo tempo de retenção na rampa cromatográfica. A Tabela 5.2 apresenta as porcentagens de supressão obtida para a análise de nonilfenol em algumas amostras estudadas. O cálculo da porcentagem foi feito de acordo com a Equação 4.1

Tabela 5. 2: Porcentagem de supressão obtida para o nonilfenol em algumas amostras estudadas

Identificação da amostra	Área da amostra	Área da amostra após adição de padrão	Área do padrão	Porcentagem de supressão obtida
av040 maio	86.094.224	114.792.298	37.547.740	36,5
av210 junho	86.684.138	112.087.137	45.330.401	32,3
av005 outubro	194.576.381	218.557.304	51.615.656	1,5
av330 novembro	135.191.494	179.174.138	30.134.199	- 45,9 ⁽¹⁾

(1) O sinal negativo foi usado para indicar que houve uma intensificação do sinal

O cálculo de supressão realizado para o nonilfenol mostrou que em algumas amostras foi observado uma intensificação do sinal e em outras amostras foi observada uma diminuição do sinal. A explicação para este tipo de fenômeno ainda não é totalmente elucidado, contudo, as respostas obtidas mostraram que a porcentagem supressão é influenciada pela diluição da amostra.

Outra possibilidade de correção do efeito supressivo ocasionado pela complexidade da amostra é a adição de compostos deuterados dos analitos estudados, contudo, neste trabalho esta opção de análise não foi estudada.

5.6- Validação

Para permitir a confiabilidade da metodologia desenvolvida foi realizada uma validação de acordo com os parâmetros exigidos pelo INMETRO, ANVISA e EUROCHEM.

5.6.1- Seletividade

A técnica utilizada para quantificação de perturbadores endócrinos utilizado neste trabalho é altamente seletiva, pois os compostos são analisados no modo SIM, onde a massa é previamente especificada. Para exemplificar a seletividade do método os cromatogramas e espectros de massas MS^d obtidos de algumas amostras são apresentados nas Figuras 5.2, 5.3 e 5.4.

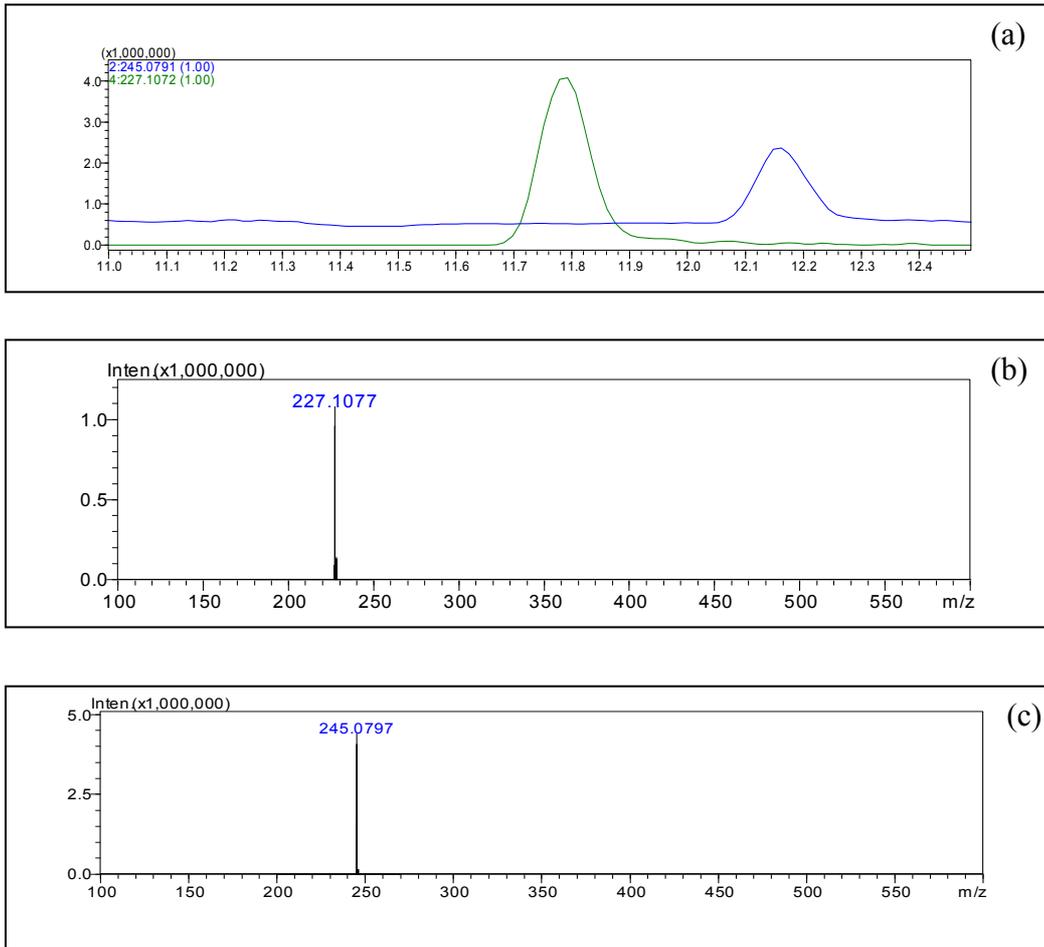


Figura 5. 2: (a) Cromatograma da amostra av130nov para o bisfenol A e dietilfталato; (b) Espectro de massas MS^I para o bisfenol A presente na amostra av130nov; (c) Espectro de massas MS^I para o dietilfталato presente na amostra av130nov

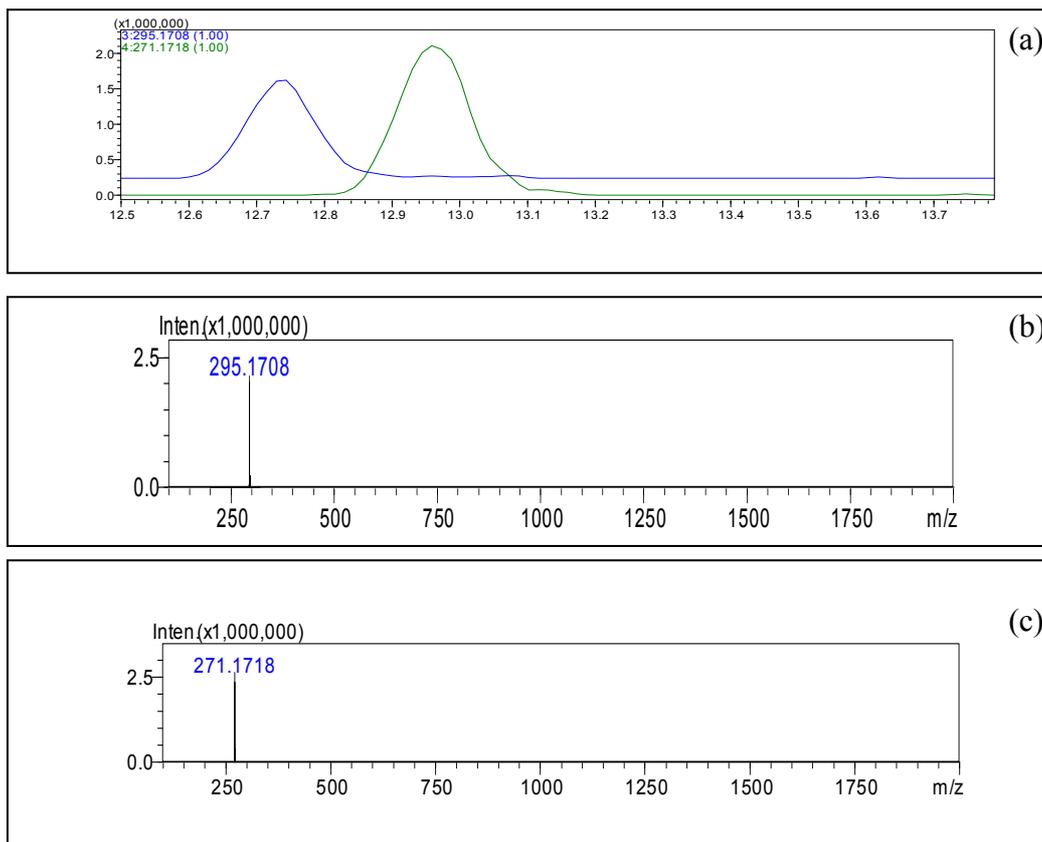


Figura 5. 3: (a) Cromatograma da amostra av005maio para o estradiol e etinilestradiol; (b) Espectro de massas MS^I para o etinilestradiol presente na amostra av005maio; (c) Espectro de massas MS^I para o estradiol presente na amostra av005maio

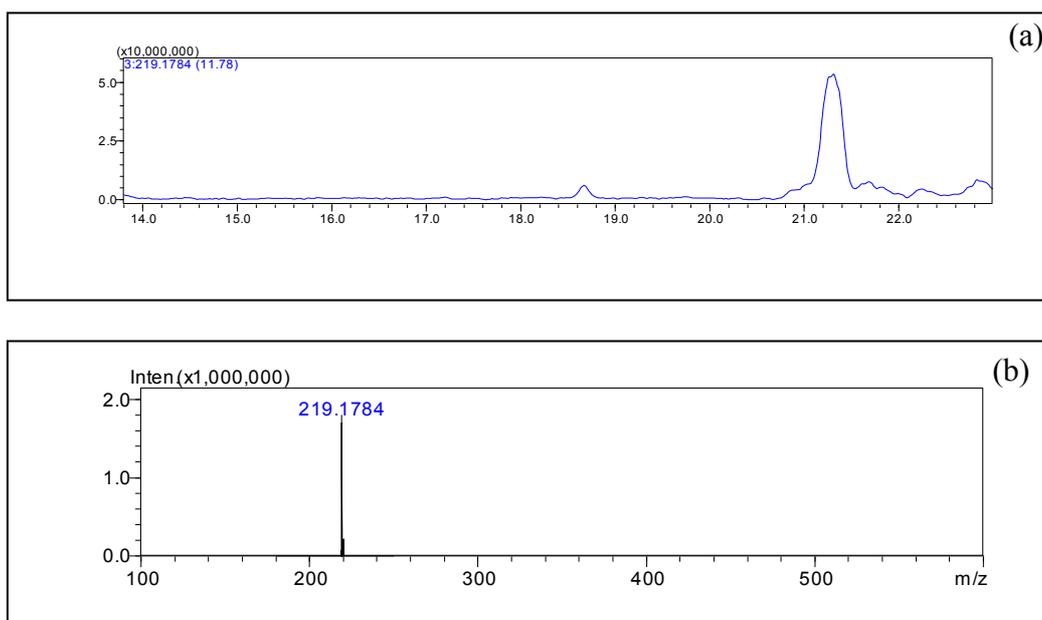


Figura 5. 4: (a) Cromatograma da amostra av005maio para o nonilfenol ; (b) Espectro de massas MS^I para o nonilfenol presente na amostra av005set

Nos cromatogramas apresentados é possível observar a distinção entre os picos de bisfenol A e dietilftalato. O estradiol e etilestradiol sofrem coeluição, contudo, a distinção entre as massas permite a quantificação destes compostos. O nonilfenol possui um perfil de pico diferente dos outros compostos devido a presença de vários isômeros que dificultam sua quantificação.

5.6.2- Linearidade

No estudo da linearidade da metodologia empregada para os perturbadores endócrinos foram empregados para construção da curva de calibração 6 pontos para o dietilftalato e nonilfenol e 7 pontos para o estradiol, etinilestradiol e bisfenol. A média obtida para cada composto e o respectivo desvio-padrão é apresentado na Tabela 5.3.

Tabela 5. 3: Média e desvio padrão dos compostos para cada concentração usada na construção da curva de calibração

Conc. Teórica (µg/L)	Estradiol		Etinilestradiol		Bisfenol	
	Conc. Obtida ⁽¹⁾	Desvio Padrão	Conc. Obtida ⁽¹⁾	Desvio Padrão	Conc. Obtida ⁽¹⁾	Desvio Padrão
5,0	5,9	0,4	5,4	0,3	7,2	0,4
10,0	10,7	0,4	10,7	1,1	8,9	1,9
20,0	22,1	2,2	22,7	1,3	22,6	3,6
50,0	49,4	1,4	50,5	2,5	55,1	7,2
90,0	94,0	1,2	96,6	4,4	100,0	6,0
130,0	131,8	3,3	132,1	2,6	122,9	3,8
200,0	199,1	1,6	205,6	8,0	216,3	13,9
	Nonilfenol		Dietilftalato			
	Conc. Obtida ⁽¹⁾	Desvio Padrão	Conc. Obtida ⁽¹⁾	Desvio Padrão		
10,0	10,6	0,8	8,2	2,6		
20,0	18,1	1,7	15,9	4,1		
50,0	43,1	6,4	50,3	3,2		
90,0	89,6	5,2	86,9	5,0		
130,0	126,1	3,5	124,1	1,5		
200,0	190,3	13,2	208,3	11,4		

Os valores obtidos mostram uma pequena variação da concentração na análise de sete replicatas de padrões dos compostos estudados. O desvio-padrão em todas as concentrações está abaixo de 20%, sendo portanto, aceitável.

As curvas analíticas foram obtidas relacionando as concentrações dos compostos estudados com as áreas dos picos obtidos através de uma equação quadrática. A Figura 5.5 exemplifica as curvas analíticas obtidas.

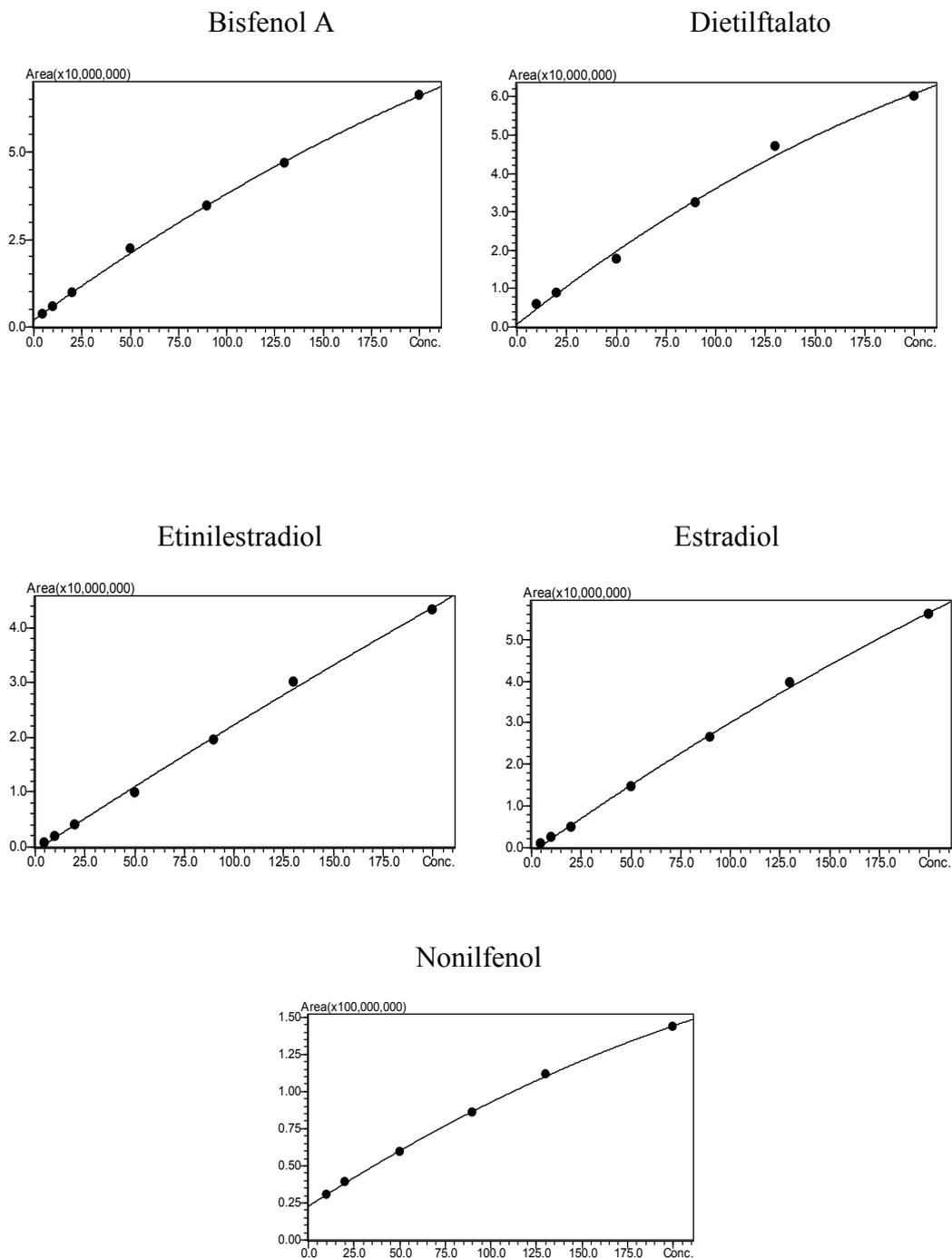


Figura 5. 5: Curvas analíticas dos compostos estudados

Um tratamento estatístico foi feito através do software Excel (Microsoft) para obtenção do coeficiente de linearidade. Os parâmetros das equações quadráticas e os respectivos coeficientes de linearidade são apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5. 4: Parâmetros das equações das curvas analíticas dos compostos estudados e seus respectivos coeficientes de linearidade

Parâmetros da equação	BPA	DEP	EE2	E2	NP
a	-403,0151	-527,1935	-78,06952	-241,6172	-928,4474
b	401.398,1	406.256,4	237.395,10	336.478,7	792.808,5
c	1.933.453	716.600,10	-694.667,7	-1.223.636	22.741.417,0
r ²	0,9994	0,9947	0,9978	0,9989	0,9995

O r² obtido demonstra a variação dos dados obtidos, ou seja, quanto mais próxima de 1 menor a variação obtida. Assim pode-se afirmar que os dados obtidos apresentaram pouca variação. Segundo o INMETRO, valores maiores que 0,90 são aceitáveis, portanto, pode-se dizer que os valores obtidos atendem aos critérios exigidos.

5.6.3- Detectabilidade

Os limites de detecção e quantificação da metodologia foram analisados através das razões entre sinal/ruído e são apresentados na Tabela 5.5. Os dados foram obtidos através da análise de padrões com baixas concentrações conhecidas.

Tabela 5. 5: Limite de detecção e quantificação do método desenvolvido para os compostos estudados

Composto	Limite de Detecção (ng/L) ⁽¹⁾	Limite de Quantificação (ng/L) ⁽¹⁾
Bisfenol	0,7	2,5
Dietilftalato	1,3	4,3
Estradiol	1,1	3,6
Etinilestradiol	1,4	4,7
Nonilfenol	1,2	3,9

(1) Considerando a recuperação e supressão para cada composto e um fator de diluição de 1000vezes

Os limites de detecção e quantificação obtidos mostraram-se superiores a outros estudos desenvolvidos. Em um estudo realizado por de Alda e Barceló (2000) em águas de rios, utilizando cromatografia líquida acoplada com arranjo de diodos e acetonitrila e água como fases móveis, o limite de detecção obtido foi de 50ng/L para estradiol e etinilestradiol.

5.6.4- Precisão

A precisão pode ser obtida em condições de reprodutibilidade ou em condições de repetibilidade. Neste estudo, foram utilizados testes de repetibilidade para verificar a precisão do método. As amostras foram injetadas por um mesmo operador, em uma mesma máquina em um curto intervalo de tempo. A precisão dos compostos foi avaliada pelo software Excel 2003 (Microsoft) e calculada a partir da Equação 4.2. A Tabela 5.6 mostra os valores obtidos para o desvio-padrão relativo referentes às injeções de sete replicadas de um padrão de 50µg/L.

Tabela 5. 6: Desvio padrão relativo do padrão de 50µg/L

Composto	Concentração Média	Desvio Padrão	Desvio-Padrão relativo
Bisfenol A	52,22	1,87	3,59
Dietilftalato	50,30	3,13	6,36
Etinilestradiol	50,17	2,40	6,22
Estradiol	49,16	1,40	4,78
Nonilfenol	47,06	6,25	2,85

Segundo o INMETRO valores abaixo de 20% de desvio-padrão relativo são aceitáveis. Assim, de acordo com os valores determinados, o método utilizado é preciso, pois todos os compostos estudados apresentam desvio-padrão relativo menor que 7%.

5.6.5- Exatidão

A exatidão da metodologia foi avaliada através de um teste de recuperação feito em triplicata nas concentrações de 5, 90 e 200ng/L para o bisfenol, estradiol e etinilestradiol, 10, 90 e 200ng/L para o dietilftalato e 90 e 200ng/L para o nonilfenol. O cálculo da porcentagem de recuperação para o nonilfenol em uma baixa concentração não foi possível,

pois este estava presente em elevadas concentrações na amostra utilizada. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 5.7.

Tabela 5. 7: Índices de recuperação obtidos

Composto	Concentração esperada (ng/L)	Concentração observada (ng/L)	Porcentagem de recuperação (%)	Recuperação média (%)
Bisfenol A	5	4,80	96	92,2
	90	77,89	86,5	
	200	188,60	94	
Dietilftalato	10	8,61	86,1	93,0
	90	96,87	107,6	
	200	170,66	85,3	
Etinilestradiol	5	5,27	105,3	92,1
	90	69,52	76,6	
	200	189,29	94,5	
Estradiol	5	5,07	101,5	94,7
	90	74,72	83,02	
	200	199,16	99,5	
Nonilfenol	90	64,30	71,4	91,7
	200	224,03	112	

Os resultados obtidos mostram que a recuperação destes compostos, quando cartuchos C18 são utilizados é eficiente. Portanto, a metodologia utilizada através das correções pelos índices de recuperação pode ser considerada exata.

6- MONITORAMENTO

Após o desenvolvimento da metodologia os compostos foram monitorados durante oito meses em diferentes pontos no percurso do Rio das Velhas. O monitoramento realizado abrangeu períodos de chuva e estiagem para possibilitar uma comparação entre os dados obtidos e as concentrações encontradas de cada composto. A Figura 6.1 apresenta a distribuição da precipitação ocorrida na região metropolitana de Belo Horizonte. Os outros municípios estudados não possuem estações de monitoramento e por isso, somente os dados da região metropolitana de Belo Horizonte são apresentados neste estudo.

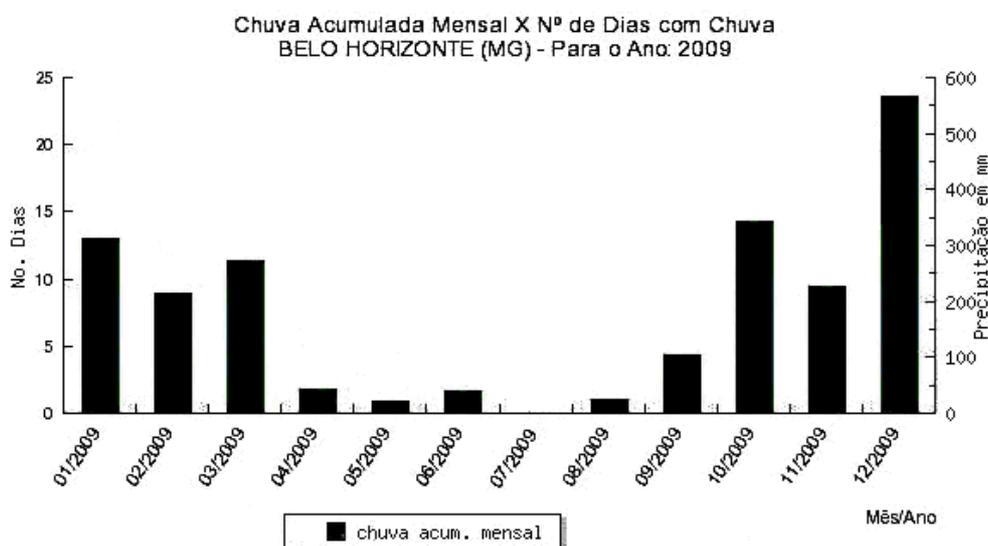


Figura 6. 1: Precipitação ocorrida na região metropolitana de Belo Horizonte no ano de 2009 (Fonte: INMET)

Uma comparação da precipitação na região metropolitana de Belo Horizonte no ano de 2009 e medições em anos anteriores foi realizada. Foi observado que a Figura 6.1 mostra a mesma tendência de precipitação dos anos anteriores para a região estudada. A sazonalidade apresentada mostra que das 8 campanhas realizadas, 5 foram feitas no período de estiagem (maio a setembro) e 3 no período chuvoso (outubro a dezembro). Estes dados serão utilizados para tentar explicar o perfil de concentração dos compostos estudados. As concentrações obtidas nas diferentes campanhas amostrais são apresentadas a seguir. Para o cálculo das concentrações finais foram feitos em cada mês analisado o estudo de um branco, no qual água destilada foi tratada com os mesmos procedimentos de

extração e análises das amostras. O valor obtido do branco foi descontado para cada composto estudo para obtenção da concentração final.

6.1- Estradiol e Etinilestradiol

As Tabelas 6.1 e 6.2 apresentam as concentrações de estradiol e etinilestradiol determinadas nas amostras coletadas no período de maio a dezembro de 2009.

Tabela 6. 1: Concentrações de etinilestradiol nas amostras

Etinilestradiol (ng/L)								
Ponto	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
av005	63,8	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
av010	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
av040	<LD	<LD	<LD	<LD	15,2	<LD	<LD	<LD
av130	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	10,2
av210	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
av260	<LD	17,4	13,0	<LD	<LD	<LD	9,4	<LD
av330	<LD	16,2	5,6	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

Tabela 6. 2: Concentrações de estradiol nas amostras

Estradiol (ng/L)								
Ponto	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
av005	62,6	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
av010	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
av040	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
av130	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
av210	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
av260	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
av330	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

Os dados apresentados acima mostram que etinilestradiol e estradiol foram encontrados ocasionalmente. O etinilestradiol foi encontrado em apenas oito das 56 amostras analisadas, e em quantidades que variam de 5,6 a 63,8ng/L, ao passo que, estradiol foi encontrado em apenas uma amostra. Os valores encontrados são semelhantes a outros monitoramentos realizados onde estes compostos foram analisados. No estudo

realizado por Lei *et al* (2009) em rios da China foram encontrados concentrações semelhantes que variam de 0,93 a 32,4 ng/L para estradiol e 1,64 a 35,6 ng/L para etinilestradiol. Em outros estudos, como o realizado por Ghiselli (2006) em águas de rios em Campinas, estradiol foi encontrado eventualmente em concentrações muito superiores, de 1,68 à 6µg/L, aos estudos reportados anteriormente. Um estudo realizado por Moreira (2008), mostrou que na entrada da ETA de Nova Lima, no Rio das Velhas, os compostos estradiol e etinilestradiol foram encontrados ocasionalmente em concentrações de 1,5 à 36,8ng/L e 3,0 à 15,58ng/L respectivamente.

Os hormônios como estradiol e etinilestradiol, encontrados nos corpos d'água, provêm basicamente do lançamento de esgoto não tratado nestes mananciais. Estes compostos já foram monitorados em esgoto bruto e tratado em vários estudos realizados (Nie *et al*, 2009, Farre *et al.*, 2007, Bruchet *et al.*, 2002) e os resultados obtidos mostraram que nestas matrizes estradiol e etinilestradiol também foram eventualmente encontrados. Estes resultados sugerem que estes compostos, presentes no meio ambiente, provavelmente são metabolizados ou ainda estão na forma dos seus ácidos conjugados, visto que hormônios são excretados diariamente por seres humanos principalmente como conjugados de ácidos sulfúrico e glucorônico (Baronti *et al.*, 2000). De fato, um estudo realizado por D'Ascenzo *et al* (2003) mostrou que estrogênios sulfatados são recalcitrantes à biotransformação. No presente estudo, a comprovação dessa hipótese não foi feita, pois a determinação de estrogênios conjugados e seus metabólitos não foi realizada.

Outra possível explicação para as quantidades observadas pode estar relacionada as propriedades físico-químicas destes compostos, visto que estradiol e etinilestradiol possuem baixa solubilidade em água, 12,96 e 4,83 mg/L, respectivamente. (Lintelmann *et al*, 2003). Esta possibilidade, contudo, é pouco provável, pois estas substâncias foram encontradas em baixa quantidade até mesmo em outras matrizes como sedimentos de rios (0,34 a 1,20ng/g para E2) (Labadie e Hill,2007) e lodo proveniente de estações de tratamento de efluentes (<LD para E2 e EE2) (Nie *et al*, 2009).

6.2– Bisfenol

A Tabela 6.3 apresenta as concentrações de bisfenol A determinada nas diferentes campanhas amostrais.

Tabela 6. 3: Concentrações de bisfenol A encontradas nas campanhas amostrais

Bisfenol (ng/L)								
Ponto	Mai	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
av005	168,3	39,0	12,2	73,2	<LQ	91,0	8,6	32,8
av010	23,5	17,1	13,6	46,7	23,2	49,1	116,9	27,3
av040	37,2	66,8	27,4	44,1	155,1	23,6	99,1	24,2
av130	21,8	21,9	<LQ	66,4	<LQ	113,3	85,5	32,6
av210	<LQ	16,12	<LQ	35,07	<LQ	78,54	10,2	21,4
av260	25,0	29,0	23,1	29,4	9,4	32,9	8,8	84,2
av330	19,5	87,9	49,9	53,9	<LQ	44,6	30,7	120,1

<LQ: menor que o limite de quantificação (5,0ng/L)

As concentrações de bisfenol A nos diferentes pontos de amostragem variaram de 8,6 a 168,3 ng/L. Em alguns pontos a quantidade encontrada foi abaixo do limite de quantificação da técnica. Em meses como junho e dezembro a concentração em pontos mais distantes da nascente foi maior quando comparada aos demais pontos, contudo, em outros meses este perfil de concentração não foi observado. A Figura 6.2 mostra que a concentração mediana de bisfenol A no ponto av005 é semelhante à concentração observada nos pontos av040, av130 e av330.

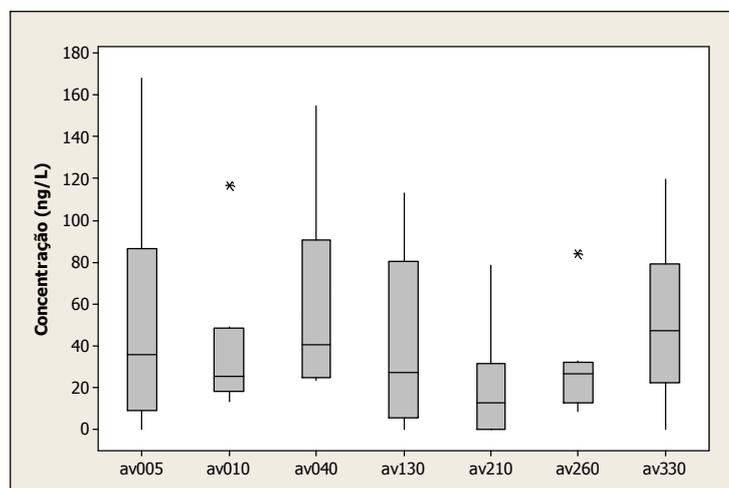


Figura 6. 2: Boxplot da variação das concentrações de bisfenol nas diferentes pontos amostrais

O bisfenol foi encontrado em todas as amostras analisadas e sua concentração em rios, em estudos como o de Azevedo *et al* (2001), Fromme *et al* (2002) e Peng *et al* (2008), é superior às concentrações reportada no rio das Velhas. Como exemplo cita-se o estudo

realizado por Ribeiro *et al* (2009) o qual bisfenol foi encontrado em concentrações de 880 ng/L em águas do rio Mondego, que tem o seu percurso em áreas urbanas, industriais e rurais de Portugal. A presença deste composto em amostras ambientais é basicamente devido à lixiviação de plásticos presentes em esgotos e aterros sanitários. Através do perfil de concentração apresentado não é possível estabelecer qual destas fontes contribui para uma maior contaminação do rio, contudo, a presença deste composto na maioria das amostras pode estar relacionada a sua alta persistência no meio ambiente. Estudos mostram que o tempo de meia-vida de biodegradação deste composto varia de 1 a 150 dias em águas superficiais (Lintelmann *et al*, 2003).

6.3- Dietilftalato

As concentrações de dietilftalato nas diferentes campanhas amostrais são apresentadas na Tabela 6.4.

Tabela 6. 4: Concentração de dietilftalato encontrada nas campanhas amostrais

Dietilftalato (ng/L)								
Ponto	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
av005	27,5	50,1	41,5	67,3	45,8	71,5	12,9	48,6
av010	14,6	54,8	6,0	118,2	48,8	288,5	26,6	105,0
av040	76,0	108,7	32,5	157,8	59,0	99,4	20,1	130,4
av130	25,7	74,7	31,7	98,45	98,7	35,7	34,2	118,0
av210	40,6	63,4	51,4	105,7	68,1	410,9	35,1	130,45
av260	5,0	15,3	23,5	104,2	80,6	154,3	28,6	131,7
av330	6,3	152,6	31,8	173,2	85,4	74,9	13,3	140,8

As concentrações de dietilftalato nas amostras variaram de 5,0 a 410,9 ng/L, sendo os maiores valores encontrados no mês de outubro. Nos meses de agosto, setembro e dezembro o perfil das concentrações variou, de forma geral, proporcionalmente à localização de coleta, sendo o ponto av005 o que apresentou menor concentração do composto como mostrado na Figura 6.3.

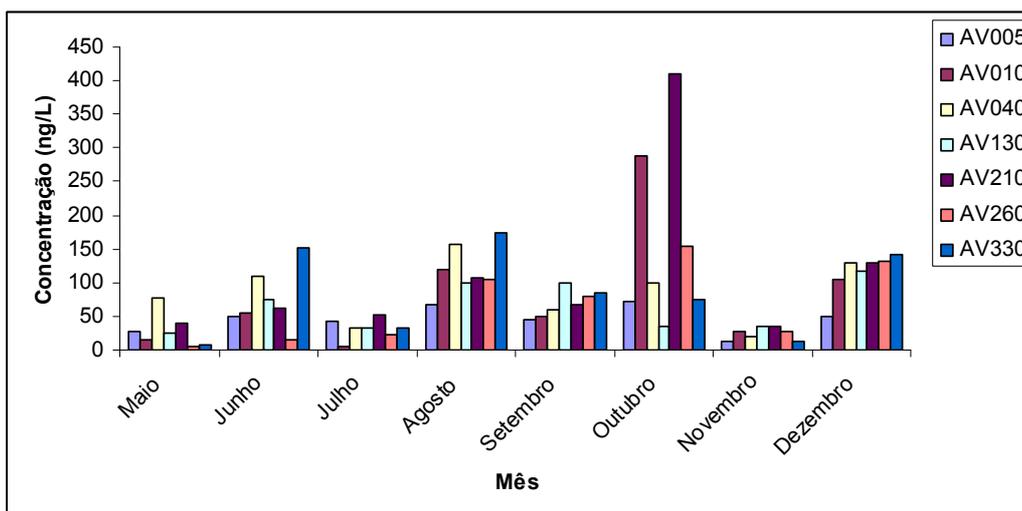


Figura 6. 3: Distribuição de dietilftalato nas campanhas amostrais

O dietilftalato presente na água pode ser proveniente do esgoto doméstico e industrial lançados nos corpos d'água. Outra possível fonte de contaminação é a lixiviação deste composto, pela água da chuva, de aterros sanitários ou lixões, visto que em muitos destes depósitos de lixo não há impermeabilização do solo. Este composto é utilizado como plastificantes em alguns produtos e também está presente na formulação de diversos cosméticos (USEPA, 2001). Assim, uma possível explicação para a proporcionalidade observada é a ocupação urbana destes pontos. O ponto av005 está localizado em uma área com uma população local relativamente pequena, ao passo que os demais pontos estão localizados em cidades com uma população relativamente maior. A Figura 6.4 apresenta a distribuição deste composto nos diversos pontos de amostragem.

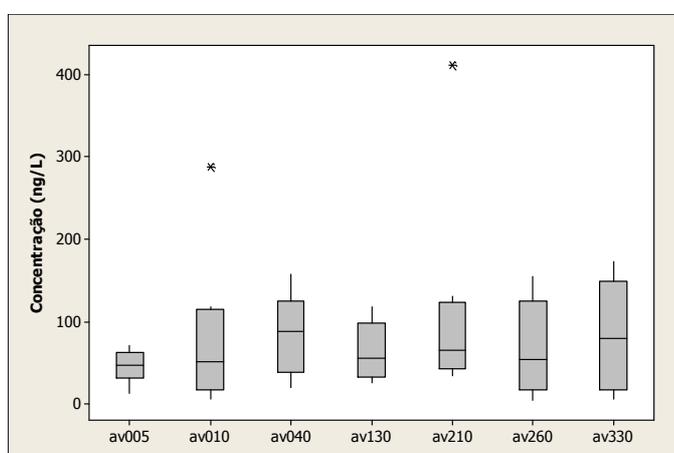


Figura 6. 4: Boxplot da concentração de dietilftalato nos diferentes pontos de amostragem

A Figura 6.4 mostra que a concentração mediana de dietilftlatato determinada no ponto av005 é relativamente menor que as concentrações medianas determinadas nos demais pontos. Um histórico do IQA (índice de qualidade da água) destes pontos foi levantado na tentativa de correlacionar a ocupação urbana dos municípios e a poluição das águas. O IQA é um parâmetro genérico calculado a partir de diversos outros parâmetros. Os parâmetros utilizados, bem como seus respectivos pesos no cálculo, são apresentados na Tabela 6.5.

Tabela 6. 5: Parâmetros utilizados no cálculo do IQA

Parâmetro	Peso
Oxigênio dissolvido – OD (%OD Saturado)	0,17
Coliformes fecais (NMP/100mL)	0,15
pH	0,12
Demanda bioquímica de oxigênio – DBO (mg/L)	0,10
Nitratos (mg/L NO ₃)	0,10
Fosfatos (mg/L PO ₄)	0,10
Variação na temperatura (°C)	0,10
Turbidez (UNT)	0,08
Resíduos totais (mg/L)	0,08

Segundo a CETESB (2008), o IQA pode indicar o lançamento de efluentes sanitários nos corpos d'água e este parâmetro é inversamente proporcional a poluição ocasionada. Assim um IQA elevado indica uma baixa contaminação por esgoto doméstico. A Figura 6.5 apresenta os níveis de IQA medidos nos diversos pontos de amostragem em anos anteriores.

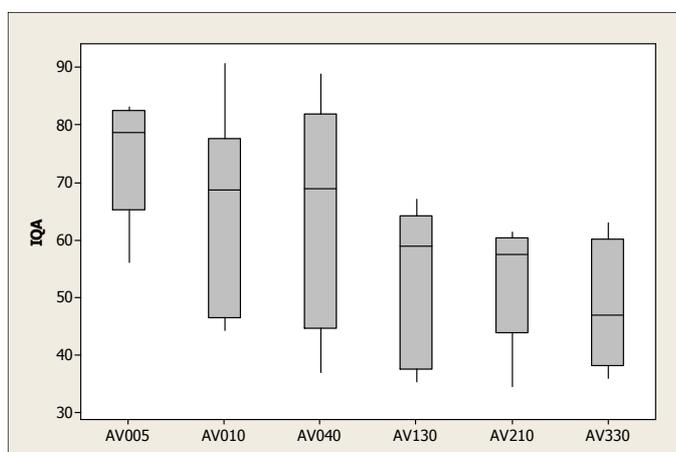


Figura 6. 5: Boxplot dos valores de IQA medido nos pontos estudados em anos anteriores (2003 a 2008) (IGAM, 2009)

De acordo com o gráfico apresentado, é possível observar uma tendência de diminuição nos valores de IQA a medida que os pontos se afastam da nascente. O ponto av005 apresentou, de maneira geral, uma melhor qualidade da água. Os pontos av010 e av040 apresentaram IQA médios semelhantes e com valores menores ao determinado para o ponto av005. Esta observação também pode ser feita para os pontos av130 e av210. Os resultados apresentados indicam que a contaminação observada nas águas do Rio das Velhas por dietilftalato provavelmente é provinda da contaminação deste por efluentes domésticos e industriais.

6.4- Nonilfenol

A variação na concentração de nonilfenol nos pontos monitorados (Tabela 6.6) mostra que este composto foi encontrado em todas as amostras analisadas, sendo as maiores concentrações encontradas no mês de dezembro. As variações apresentadas neste estudo mostram perfis semelhantes a outros estudos, como o realizado por Cespedes *et al.* (2006) onde nonilfenol foi encontrado em grandes concentrações em todas as amostras analisadas em rios da Espanha. Os estudos feitos por Azevedo *et al.* (2001), Lagana *et al.* (2004) e Peng *et al.* (2008) também relatam altas concentrações de nonilfenol em águas de rios de Portugal, Itália e China, respectivamente.

Tabela 6. 6: Concentração de nonilfenol encontrada nas campanhas amostrais

Nonilfenol (ng/L)								
Ponto	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
av005	328,3	500,02	242,1	50,1	205,2	310,2	145,3	149,7
av010	49,2	256,22	71,7	52,2	71,7	1023,9	211,0	240,0
av040	134,9	578,38	78,81	121,7	189,4	149,9	80,8	759,6
av130	97,3	652,36	187,81	168,5	247,7	395,4	361,9	1435,3
av210	77,12	69,24	226,2	25,9	529,5	87,8	77,0	1290,0
av260	27,08	73,8	197,1	211,1	385,8	650,6	471,2	904,6
av330	95,99	358,7	59,3	270,1	375,0	152,4	132,9	1081,8

O nonilfenol, assim como os outros perturbadores, foi analisado em períodos chuvosos e períodos de estiagem. Os valores encontrados indicaram que as menores concentrações deste composto foram observadas no período de estiagem (maio, julho e agosto), ao passo que, em meses chuvosos (outubro e dezembro) foram observadas maiores

concentrações. O mês de novembro apresentou uma concentração relativamente baixa de nonilfenol quando comparados a outubro e dezembro. Isto provavelmente ocorreu devido ao menor índice pluviométrico (Figura 6.1) do mês em questão. A Figura 6.6 exemplifica essa observação.

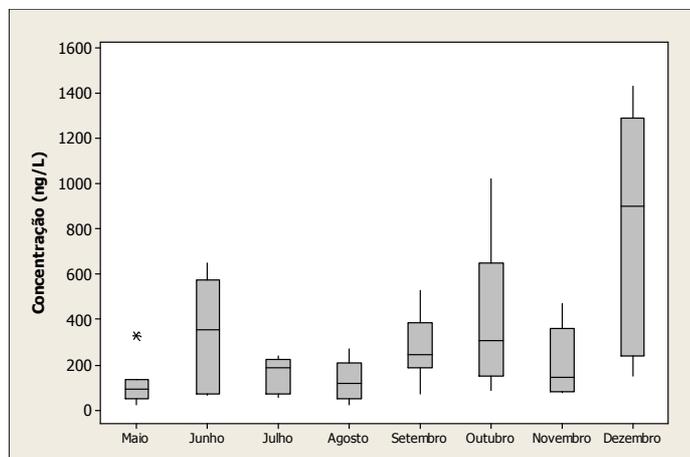


Figura 6. 6: Boxplot da distribuição de nonilfenol nas campanhas amostrais

O nonilfenol não apresenta um perfil de aumento ou decréscimo constante nas concentrações entre os diferentes pontos de amostragem como mostrado na Figura 6.7.

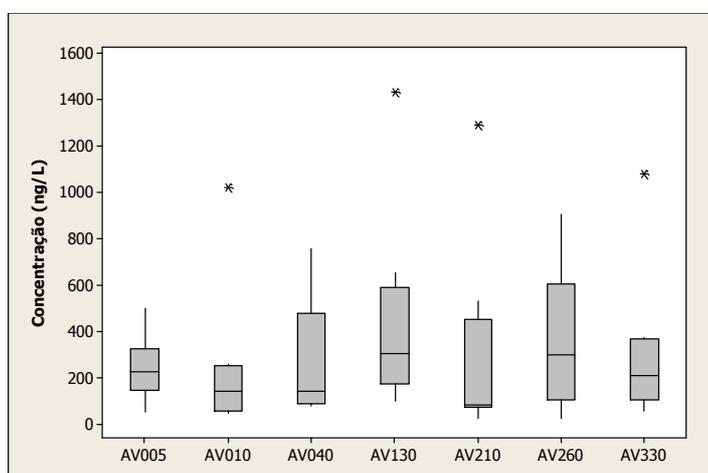


Figura 6. 7: Boxplot da concentração de nonilfenol nos diferentes pontos de amostragem

Os dados encontrados neste estudo mostram um perfil de concentração de nonilfenol diferente do perfil esperado nos diferentes períodos de precipitação, o qual nonilfenol, se provindo em sua maioria do esgoto doméstico, apresentaria uma concentração maior no período de seca. Segundo Scroder *et al* (2001) esta observação é esperada porque este composto é originado da degradação de agentes surfactantes, tal qual o nonilfenol etoxilado, presentes em grandes quantidades no esgoto doméstico. Assim, em

períodos de estiagem uma menor vazão de água é observada, ocorrendo, conseqüentemente, um aumento na concentração deste perturbador endócrino, visto que a quantidade de esgoto lançada é aproximadamente constante ao longo do ano.

Uma possível explicação para os valores observados é a diferente origem do nonilfenol presente nas águas desta região. A ocupação de alguns pontos da região estudada é predominantemente agrária com uma ocupação urbana relativamente menor comparada a outras cidades. Assim o nonilfenol presente na água, pode ser predominantemente originário da lixiviação de nonilfenol ou de alquilfenóis etoxilados do solo de culturas agrícolas, visto que este composto também é encontrado na formulação de diversos pesticidas (CEPA, 2001).

Um histórico dos pontos em estudo foi levantado na tentativa de correlacionar a concentração encontrada de nonilfenol com outras características das amostras, como turbidez, quantidade de coliformes e quantidade de estreptococos determinada nas águas do Rio das Velhas. É importante ressaltar que os dados do histórico levantado seguem uma tendência e por isso esta correlação pode ser feita. Uma análise direta entre a concentração de nonilfenol e os parâmetros correlacionados não pode ser feita para um mesmo ano, pois não se tem a concentração deste composto nos anos anteriores e os dados destes parâmetros em 2009 não foram disponibilizados pelo IGAM.

Um dos parâmetros levantados foi a presença de estreptococos fecais na água, o que indica a poluição fecal ocasionada por animais de sangue quente (Slanetz e Bartley, 1964). Os níveis de estreptococos fecais encontrados em anos anteriores, em um mês crítico de seca (julho) e um mês crítico de chuva (janeiro) são apresentados na Figura 6.8. Os outros meses não foram analisados devido à indisponibilidade de dados.

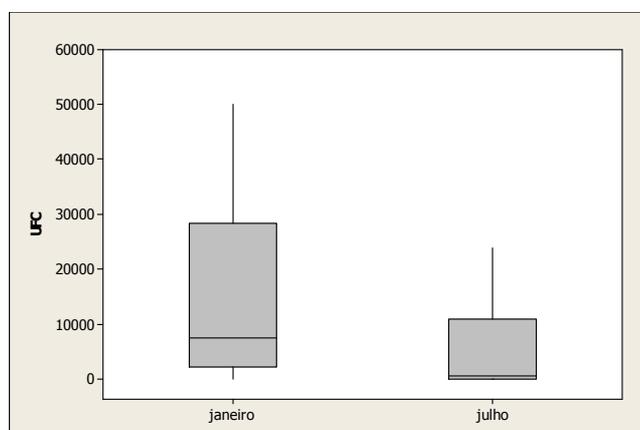


Figura 6. 8: Boxplot da distribuição de estreptococos fecais nos meses de janeiro e julho de anos anteriores (2003, 2004, 2007 e 2008) (IGAM, 2009)

Através da distribuição apresentada foi observado que a quantidade de estreptococos fecais no período chuvoso nos anos analisados foi relativamente alta comparada ao período de estiagem. O mesmo ocorre com a concentração de nonilfenol nas amostras analisadas (Figura 6.6), no entanto, a fonte da contaminação, animal ou humana, não pode ser feita através apenas deste parâmetro. Assim, para determinação da origem desta contaminação uma relação entre coliformes termotolerantes (CT) e estreptococos fecais (EF) foi realizada. Segundo o IGAM uma razão de CT/EF menor que 1,0 indica que os despejos são preponderantemente provenientes de animais, enquanto que para a predominância de despejos humanos a relação deve ser maior que 4,0. Os valores intermediários são considerados de interpretação duvidosa. A correlação entre coliformes termotolerantes e estreptococos fecais dos meses de julho e janeiro, representando períodos críticos de seca e chuva de anos anteriores, é apresentada na Figura 6.9.

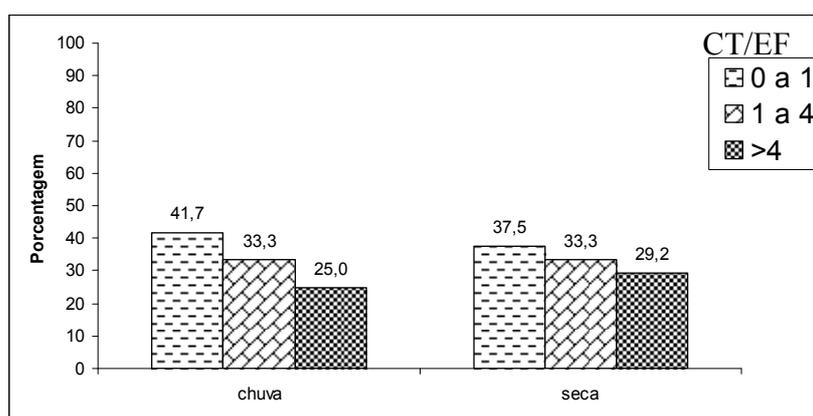


Figura 6. 9: Distribuição da razão CT/EF em amostras passadas

A Figura 6.9 mostra que em muitos pontos a origem da contaminação não pode ser determinada, contudo, quando os valores determinados na faixa de intervalo de razão entre 0 e 1 são comparados com intervalos na faixa acima de 4, pode ser observado uma maior porcentagem de dados na faixa onde a origem fecal é provinda de animais domésticos e silvestres. Portanto, possivelmente, o nonilfenol presente nas amostras da região analisada é, em sua maioria, proveniente da lixiviação e escoamento de solos contendo produtos com compostos que originam nonilfenol na sua degradação, visto que a contaminação das águas por fezes de animais não ocorre devido ao lançamento de esgoto doméstico nos corpos d'água e sim através da lixiviação e escoamentos destas para as águas. Este aumento da concentração de nonilfenol nos meses chuvosos também foi observado em um monitoramento realizado na região de Nova Lima em 2008, o qual este composto foi

monitorado na ETA-Rio das Velhas (Moreira, 2008). Neste estudo, as concentrações de nonilfenol reportadas foram de 263,1 e 294,4ng/L nos meses de junho e julho respectivamente, e 649,0 e 387,5ng/L nos meses de dezembro e janeiro respectivamente.

Outro fator que colabora para o aumento de nonilfenol no período chuvoso é o arraste de sedimento das margens e do fundo do rio devido ao aumento da vazão da água. Estudos mostraram que nonilfenol possui um moderado K_{ow} (coeficiente de partição octanol-água) e por isso possui uma maior afinidade por sedimentos (Nie *et al.* (2009). Assim, em períodos chuvosos estes sedimentos são revolvidos do fundo possibilitando uma maior desorção deste composto na água. O aumento da presença de material particulado pode ser mostrado através da análise dos sólidos em suspensão e da turbidez da água. As Figuras 6.10 e 6.11 mostram que em períodos chuvosos estes parâmetros são elevados, ao passo que, em períodos de estiagem estes se apresentam relativamente menores.

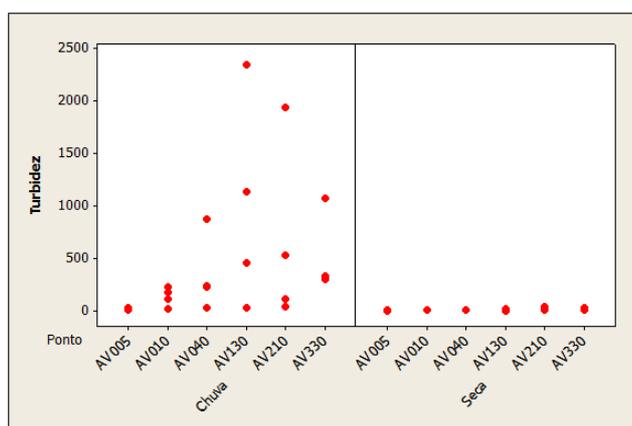


Figura 6. 10: Distribuição da turbidez no período de chuva e seca nos de 2003, 2004, 2007 e 2008 (Fonte: IGAM, 2009)

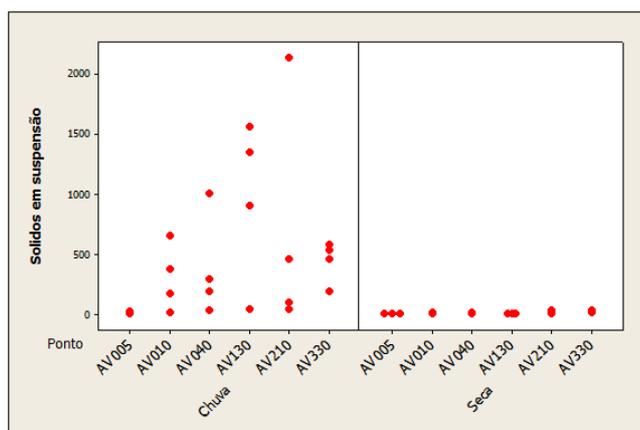


Figura 6. 11: Distribuição de sólidos totais em suspensão no período de chuva e seca nos de 2003, 2004, 2007 e 2008 (Fonte: IGAM, 2009)

A análise estatística das características físico-químicas mais relevantes obtidas nos pontos de amostragem foi feita para obter uma relação entre os parâmetros estudados, conforme apresentado na Figura 6.12.

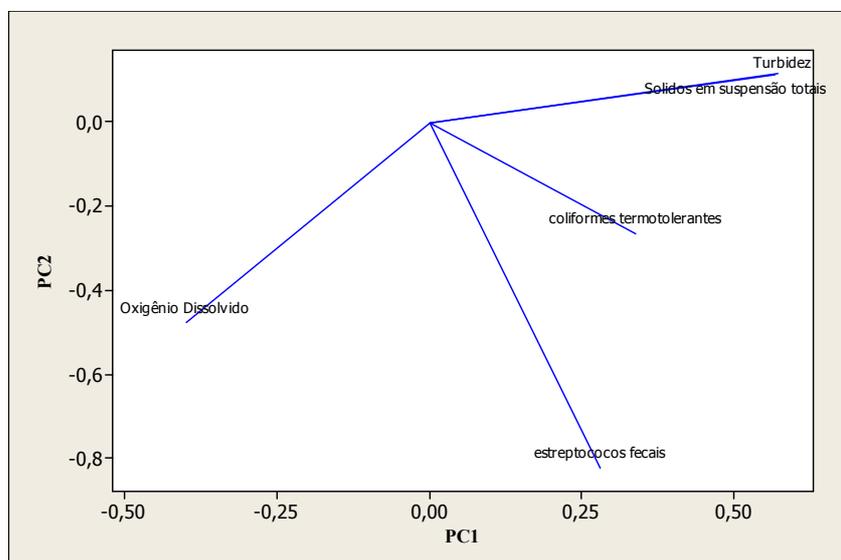


Figura 6. 12: Análise das componentes principais dos parâmetros avaliados

Através da relação entre a primeira e a segunda componente principal foi possível mostrar que turbidez e sólidos em suspensão totais se correlacionam diretamente, ao passo que a quantidade de oxigênio dissolvido se mostra inversa a estes parâmetros. Isto sugere que em amostras onde a turbidez e a quantidade de sólidos em suspensão foi elevada obteve-se uma baixa quantidade de oxigênio dissolvido. O aumento da presença de estreptococos fecais e coliformes termotolerantes também se mostra de certa forma susceptível ao aumento da turbidez e de sólidos presentes nas águas. Esta análise sugere que os parâmetros aqui estudados estão relacionados entre si e podem ser relacionados com os níveis de nonilfenol presentes na água.

6.5- Toxicidade dos perturbadores endócrinos estudados

Os riscos causados pelos perturbadores endócrinos e a real dose que estes são tóxicos ainda são discutidos pela comunidade acadêmica. No entanto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reuniu alguns estudos realizados para apresentar a toxicidade destes compostos em cobaias. A Tabela 6.7 apresenta os estudos considerados.

Tabela 6. 7: Exemplos de efeitos endócrinos observados em animais machos expostos à perturbadores endócrinos no período pré-natal

Composto	Espécie e Período de Exposição	Dose e Rotina	Efeitos
Estradiol	Rato (uma geração)	0,05 a 50 ppm na dieta (0,003 a 4,12 mg/kg/d))	De 10 a 50ppm: redução e atrofia dos testículos e epidídimo; degeneração dos túbulo seminal; redução na mobilidade e número dos espermatozoides
	Camundongo (13 a 19 dias)	25 a 300 µg/camundongo subcutaneamente	De 25 a 100µg: aumento da próstata
Etinilestradiol	Camundongo (0 a 17 dias)	0,002 a 200 µg/kg/d Oralmente	De 0,02 a 2µg/kg/d: aumento na próstata
Bisfenol A	Camundongo (11 a 17 dias)	2 a 20µg/kg/d oralmente	De 2 a 20µg/kg/d: aumento na próstata
Nonilfenol	Rato (1 a 18 dias)	0,08 a 8 mg/kg/d intraperitoneal	De 0,8mg/kg/d: redução dos testículos, epidídimos, vesícula seminal e próstata. De 8mg/kg/d: redução da distância anogenital, criptoquidismo, redução da quantidade e mobilidade de espermatozoides, redução da fertilidade.

Fonte: Damstra *et al*, 2002

O documento da OMS (Damstra *et al*, 2002) não cita estudos específicos que estimem a toxicidade do dietilftalato, contudo, um estudo realizado por Pereira *et al* (2008) observou aumento dos testículos e epidídimo quando 10, 25 e 50mg/kg/d de DEP foram administrados na dieta de ratos por 150 dias.

A OMS, bem como as demais organizações de saúde de países como Estados Unidos, Canadá e Austrália, não estabelecem um valor máximo permitido ou um valor guia (*guideline*) destes compostos em águas destinadas ao consumo humano. Da mesma forma não há, na legislação brasileira, nenhum valor limite para tal composto na portaria de potabilidade de água do Ministério da Saúde ou dos estados. Ainda assim uma análise de risco da exposição a tais contaminantes pela ingestão de água foi realizada neste trabalho como exercício para se estimar a toxicidade destes perturbadores para humanos.

Os cálculos foram feitos considerando os parâmetros adotados pela OMS para outros compostos no seu guia de potabilidade para água (WHO, 2008). Para cálculo da ingestão diária tolerável (IDT) foram considerados os menores valores de dose que causam efeito adverso nos animais (LOAEL), citados na Tabela 6.7, ou seja, 800µg/Kg/d para NP, 824µg/Kg/d para o E2, 0,02µg/Kg/d para EE2 e 2µg/Kg/d para o BPA. Um fator de incerteza (FI) igual a 100 foi utilizado, pois assim são consideradas as variações interespecies e as variações intraespecies. A Equação 6.1 foi aplicada para obtenção dos valores.

$$IDT = LOAEL / FI \quad (6.1)$$

Os valores de IDT obtidos foram de 8,2µg/Kg/d para estradiol, $2,0 \times 10^{-4}$ µg/Kg/d para etinilestradiol, 8µg/Kg/d para nonilfenol e 0,02µg/Kg/d para bisfenol. Para o dietilftalato foi considerado o estudo feito por Pereira *et al* (2008) sendo o IDT encontrado igual a 100µg/Kg/d. Para o cálculo da estimativa de concentrações tóxicos para o ser humano foi considerado que o peso de um adulto (PC) é de 60Kg e que o consumo diário de água (C) é de 2 litros. Uma variável considerada no cálculo refere-se a fração de IDT atribuída ao consumo de água (F_n) que, segundo a OMS, varia de 0,1 a 0,8 (WHO, 2008). Para o cálculo da estimativa de toxicidade para lactentes com alimentação artificial são adotados outros valores, pois este grupo é considerado particularmente vulnerável às substâncias. Neste caso, adota-se que o peso médio é de 5Kgs e a ingestão diária de água assumida é de 0,75 litros. A Equação 6.2 foi utilizada no cálculo.

$$VM = (IDT \times PC \times F_n) / C \quad (6.2)$$

onde,

VM: valor abaixo do qual estima-se não haver toxicidade em seres humanos

IDT: índice diário tolerável

PC: peso corporal

F_n : Fração de IDT alocada à ingestão da substância em estudo pelo consumo de água

C: consumo diário de água

Os valores encontrados para os perturbadores endócrinos estudados com diferentes variações de fração de IDT atribuída ao consumo de água são apresentados na Tabela 6.8.

Tabela 6. 8: Valores estimados de toxicidade (VM) para os perturbadores endócrinos estudados

Fn	E2 (ng/L)		EE2 (ng/L)		BPA (ng/L)		NP (ng/L)		DPA (ng/L)	
	Adulto	Lactente	Adulto	Lactente	Adulto	Lactente	Adulto	Lactente	Adulto	Lactente
0,1	24600	5466,7	0,6	0,1	60	13,3	24000	5333,3	300000	66666,7
0,2	49200	10933,3	1,2	0,3	120	26,7	48000	10666,7	600000	133333,3
0,3	73800	16400,0	1,8	0,4	180	40,0	72000	16000,0	900000	200000,0
0,4	98400	21866,7	2,4	0,5	240	53,3	96000	21333,3	1200000	266666,7
0,5	123000	27333,3	3,0	0,7	300	66,7	120000	26666,7	1500000	333333,3
0,6	147600	32800,0	3,6	0,8	360	80,0	144000	32000,0	1800000	400000,0
0,7	172200	38266,7	4,2	0,9	420	93,3	168000	37333,3	2100000	466666,7
0,8	196800	43733,3	4,8	1,1	480	106,7	192000	42666,7	2400000	533333,3

Com base nos valores estimados de toxicidade é possível dizer que as concentrações de nonilfenol (25,9 a 1435,3ng/L), dietilftalato (5,0 a 410,9 ng/L) e estradiol (62,6ng/L) encontradas no Rio das Velhas estão na faixa de valores onde os compostos não são considerados prejudiciais a saúde humana. Os valores de toxicidade estimados para o bisfenol são relativamente menores (comparados ao nonilfenol), contudo, as quantidades encontradas (8,6 a 168,3 ng/L) no Rio das Velhas são da mesma ordem de grandeza dos valores supostamente tóxicos. Para o etinilestradiol, os valores encontrados (5,6 a 63,8ng/L) também estão acima das concentrações limite de toxicidade, contudo, este composto foi encontrado ocasionalmente nas amostras analisadas. Vale salientar, entretanto, que as análises foram feitas em água bruta e pouco se sabe a respeito da remoção da estrogenicidade destes compostos nos tratamentos convencionais de água. Por isso são necessários estudos que avaliem a eficiência de remoção destes compostos nos tratamentos utilizados nas ETAs brasileiras.

7- ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE OUTROS MICROCONTAMINANTES ORGÂNICOS PRESENTES NA ÁGUA DO RIO DAS VELHAS

A análise das amostras estudadas também foi realizada no modo SCAN em uma faixa de m/z de 100 a 600 para uma possível qualificação de outros compostos. Assim alguns microcontaminantes orgânicos observados em outros estudos realizados foram procurados nas amostras de água estudadas.

A elucidação estrutural foi realizada através do software *Formula Predictor*, que através da relação isotópica observada para cada MS^l , sugere possíveis fórmulas moleculares para os íons pesquisados. Para tal, foram fornecidos ao programa os possíveis átomos presentes de cada íon suposto. Os íons observados, bem como suas elucidações estruturais são apresentados a seguir.

7.1- Dietil(hexil) ftalato (DEHP)

O DEHP é um plastificante largamente utilizado na indústria de polímeros e sua presença foi observada em diversos trabalhos realizados (Zafra-Gómez *et al.* 2008, Gibson *et al.* 2007, Fatoki e Noma 2002). Inicialmente este composto seria monitorado neste estudo, contudo, dificuldades encontradas no desenvolvimento metodológico como sua separação através da coluna cromatográfica utilizada, tornaram sua quantificação inviável. A massa referente a este íon foi calculada através do software *Accurate Mass Calculator* (versão 1.12, Shimadzu Corporation). A estrutura deste composto, bem como suas propriedades químicas, indica que sua ionização ocorre no modo positivo e, por ser um ftalato, seu íon provavelmente se apresenta na forma de um aduto de sódio. A Figura 7.1 apresenta o cromatograma e o espectro de massas obtido para o íon calculado de $m/z=413,2667$.

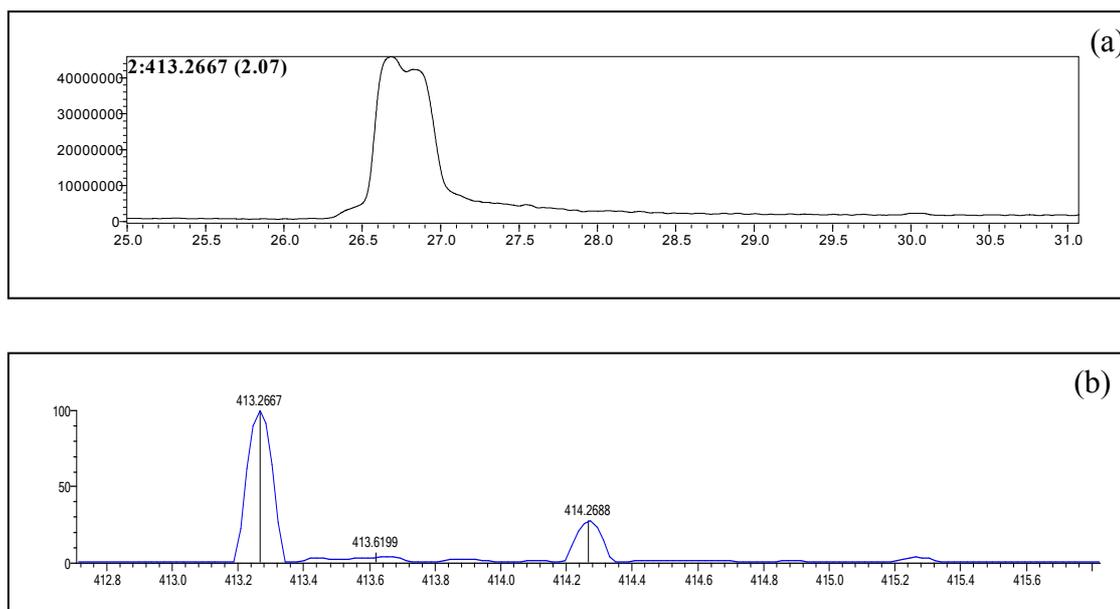


Figura 7. 1: a) Cromatograma do íon medido $m/z=413,2667$; b) Espectro de massas obtido do íon $m/z=413,2667$

Através do software *Formula Predictor* que avalia a razão isotópica do íon obtido foi possível conhecer as possíveis fórmulas moleculares para o espectro de massa MS^1 apresentado. A Tabela 7.1 apresenta o resultado obtido.

Tabela 7. 1: Resultados gerados pelo programa *Formula Predictor* na busca por fórmulas correspondentes ao íon $m/z=413,2667$

Íon Deprotonado $m/z=413,2667$				
Fórmula Proposta (M)	Íon	m/z medido	m/z calculado	Diferença (mDa)
$C_{24}H_{38}O_4$	$[M+Na]^+$	413,2667	413,2662	0,5
$C_{26}H_{36}O_4$	$[M+H]^+$	413,2667	413,2686	-1,9
$C_{17}H_{42}O_9$	$[M+Na]^+$	413,2667	413,2721	-5,4
$C_{15}H_{40}O_{12}$	$[M+H]^+$	413,2667	413,2593	7,4
$C_{19}H_{40}O_9$	$[M+H]^+$	413,2667	413,2745	-7,8

A fragmentação deste íon foi realizada para uma possível elucidação estrutural. O cromatograma e espectro de massa MS^2 obtidos na fragmentação são apresentados na Figura 7.2.

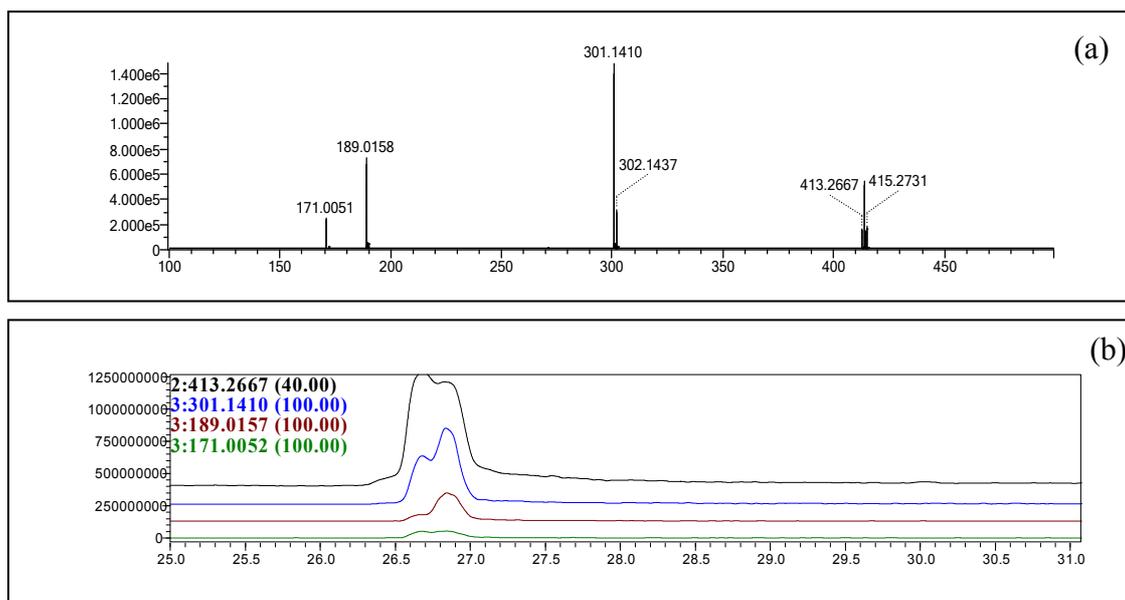


Figura 7. 2: (a) espectro de massas MS^2 obtido para fragmentação do íon $m/z=413,2667$; (b) cromatograma obtido para fragmentação do íon $m/z=413,2667$

A fragmentação ocorrida (Figura 7.3) confirma que o composto de $m/z= 413,2667$ encontrado em muitas amostras se refere ao bis etil(hexil) ftalato.

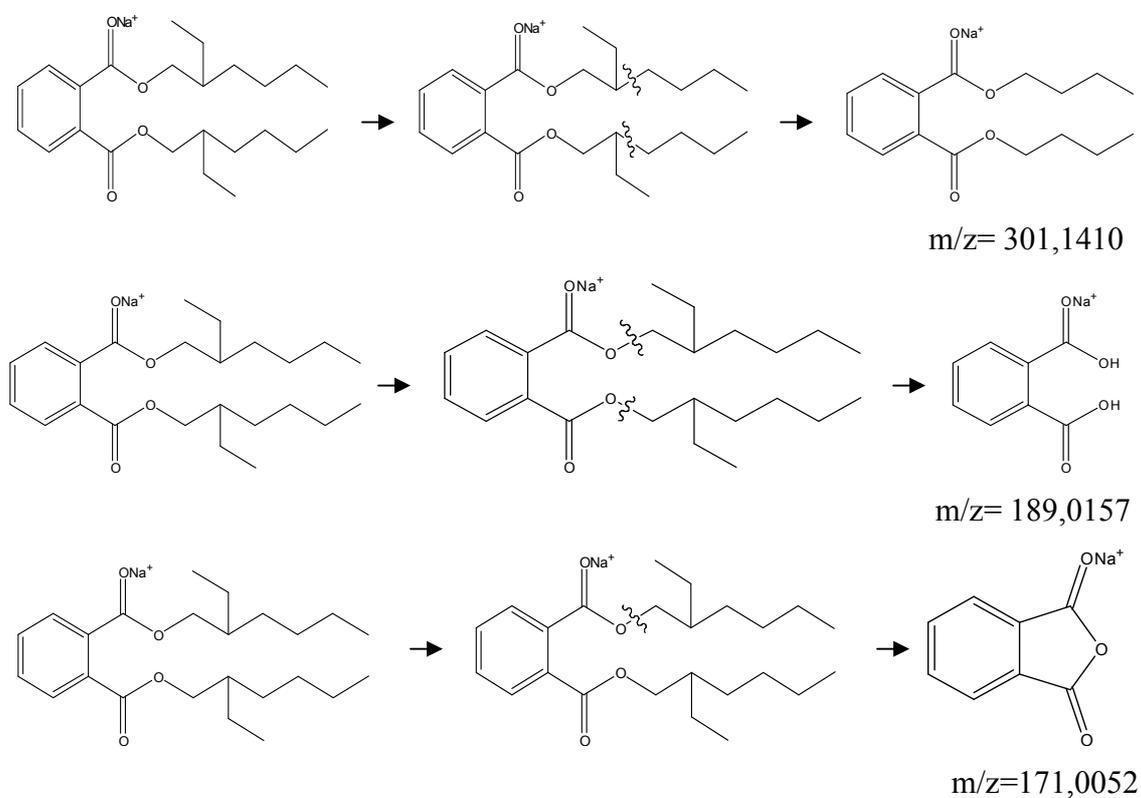


Figura 7. 3: Mecanismo de fragmentação propostos para o bis etil(hexil)ftalato

7.2- Cafeína

A cafeína é um composto utilizado como estimulante na formulação de vários medicamentos (Kolpin *et al* 2002). Seu aparecimento foi reportado em vários estudos realizados em amostras ambientais (Yoon *et al* 2006, Stuart *et al* 2005). As propriedades químicas deste composto indicam que sua ionização ocorre com maior facilidade no modo positivo. O íon calculado para cafeína, $m/z=195,0877$, foi observado em várias amostras e o espectro de massas obtido é apresentado na Figura 7.4.

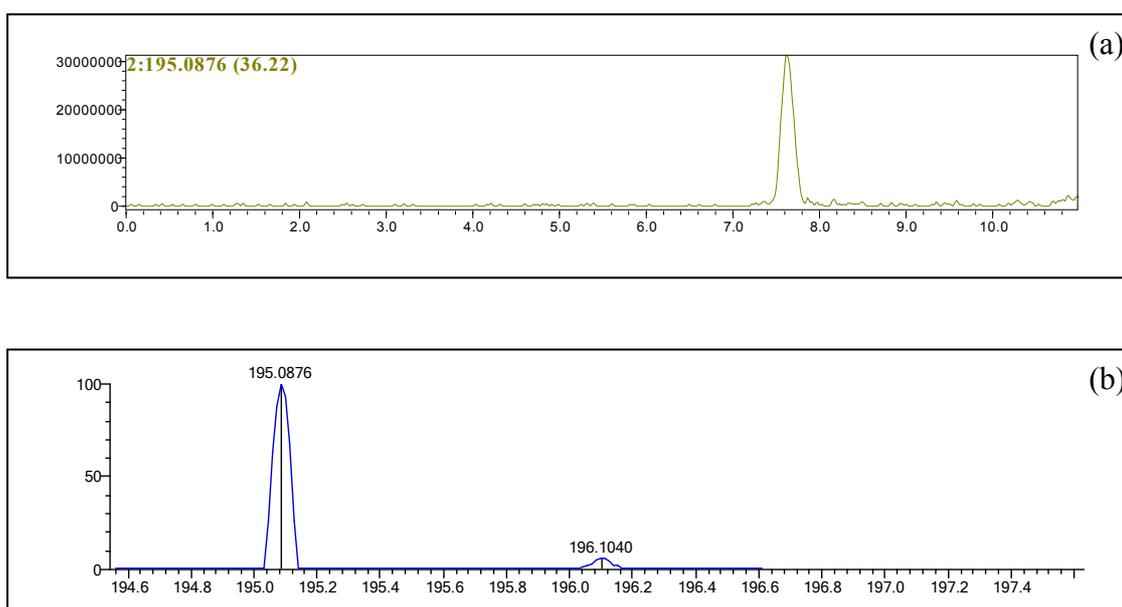


Figura 7. 4: a) Cromatograma do íon medido $m/z=195,0876$; b) Espectro de massas obtido do íon $m/z=195,0876$

O software *Formula Predictor*, através da relação isotópica apresentada, indicou as possíveis fórmulas moleculares para o íon medido representadas na Tabela 7.2.

Tabela 7. 2: Resultado gerado pelo programa *Formula Predictor*, na busca por fórmula correspondente ao íon $m/z=195,0876$

Íon Deprotonado $m/z=195,0876$				
Fórmula Proposta (M)	Íon	m/z medido	m/z calculado	Diferença (mDa)
$C_8H_{10}N_4O_2$	$[M+H]^+$	195,0876	195,0877	-0,1
$C_7H_{14}O_6$	$[M+H]^+$	195,0876	195,0863	1,3
$C_4H_6N_{10}$	$[M+H]^+$	195,0876	195,0850	2,6
$C_{13}H_{10}N_2$	$[M+H]^+$	195,0876	195,0917	-4,1
$H_{18}O_{11}$	$[M+H]^+$	195,0876	195,0922	-4,6
$C_4H_{10}N_4O_5$	$[M+H]^+$	195,0876	195,0724	15,2
$C_5H_6N_8O$	$[M+H]^+$	195,0876	195,0737	13,9
$C_9H_{10}N_2O_3$	$[M+H]^+$	195,0876	195,0764	11,2
$C_{14}H_{10}O$	$[M+H]^+$	195,0876	195,0804	7,2
$H_{14}N_6O_6$	$[M+H]^+$	195,0876	195,1048	-17,2

A fragmentação do íon observado foi realizada para confirmação da estrutura molecular deste composto. O cromatograma e espectro de massas obtido são representados na Figura 7.5.

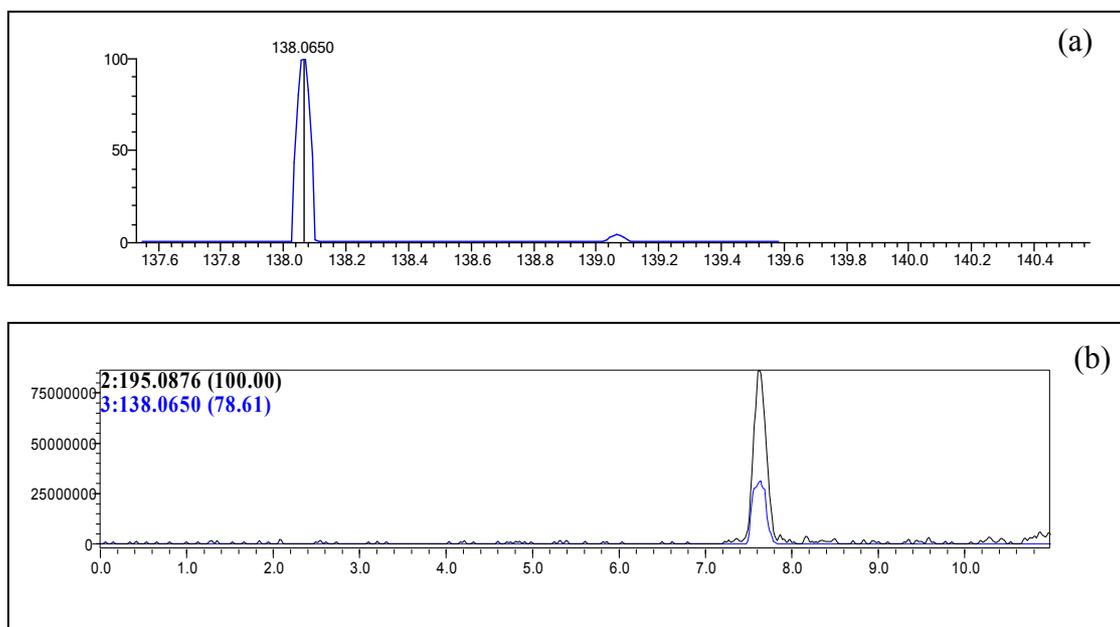


Figura 7. 5: (a) espectro de massas MS^2 obtido para fragmentação do íon $m/z=195,0876$; (b) cromatograma obtido para fragmentação do íon $m/z=195,0876$

A fragmentação ocorrida (Figura 7.6) possibilita a confirmação que o íon observado é relativo à cafeína.

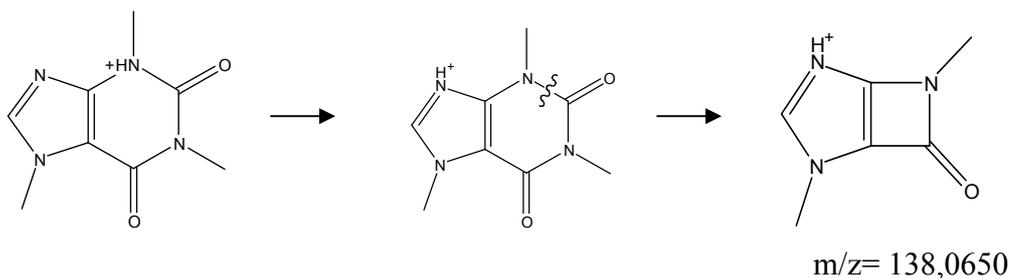


Figura 7. 6: Mecanismo de fragmentação proposto para a cafeína

7.3- Octilfenol

O octilfenol é um produto da degradação do octilfenol etoxilado, um surfactante presente na formulação de detergentes, tintas e pesticidas (Ballesteros *et al.* 2006). Este composto apresenta uma tendência de sofrer ionização no modo negativo devido as suas propriedades químicas. A razão m/z calculada para este composto é igual a 205,1598. A Figura 7.7 apresenta o cromatograma e o espectro de massas observado.

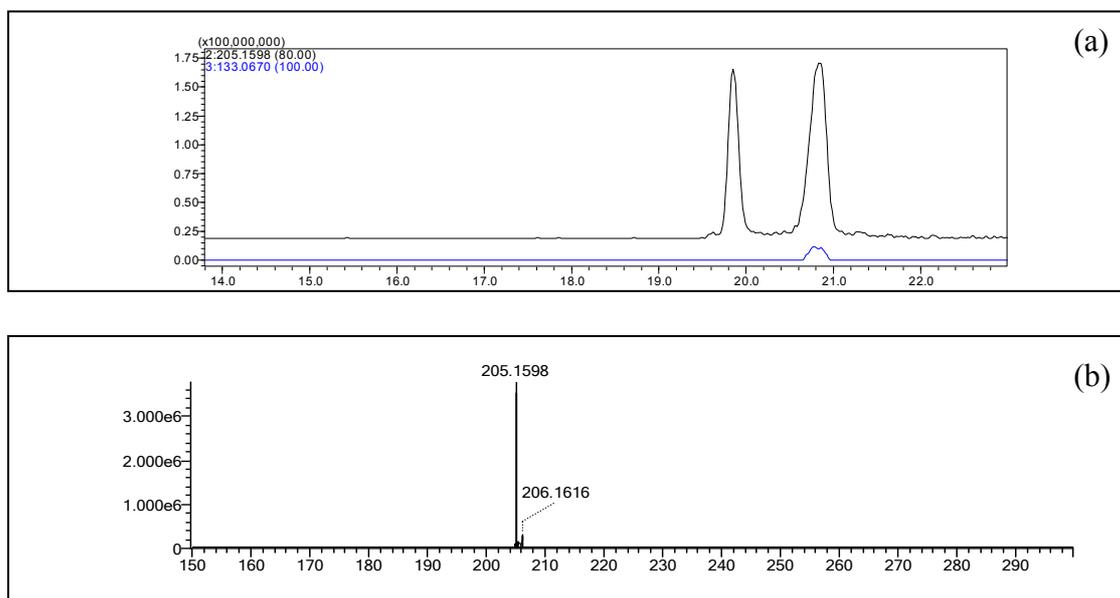


Figura 7. 7: (a) Cromatograma do íon medido $m/z=205,1598$; (b) Espectro de massas obtido do íon $m/z=205,1598$

O cromatograma mostra dois picos para o íon analisado indicando uma isomeria do composto. O software *Formula Predictor* apresentou apenas uma possível fórmula molecular (Tabela 7.3) referente ao íon destacado.

Tabela 7. 3: Resultado gerado pelo programa *Formula Predictor*, na busca por fórmula correspondente ao $m/z=205,1598$

Íon Deprotonado $m/z=205,1598$				
Fórmula Proposta (M)	Íon	m/z medido	m/z calculado	Diferença (mDa)
$C_{14}H_{22}O$	[M-H] -	205,1598	205,1598	0,0

A fragmentação do composto foi realizada para identificação do íon destacado. Os picos observados apresentaram fragmentos diferentes comprovando a distinção entre as estruturas químicas (Figura 7.8)

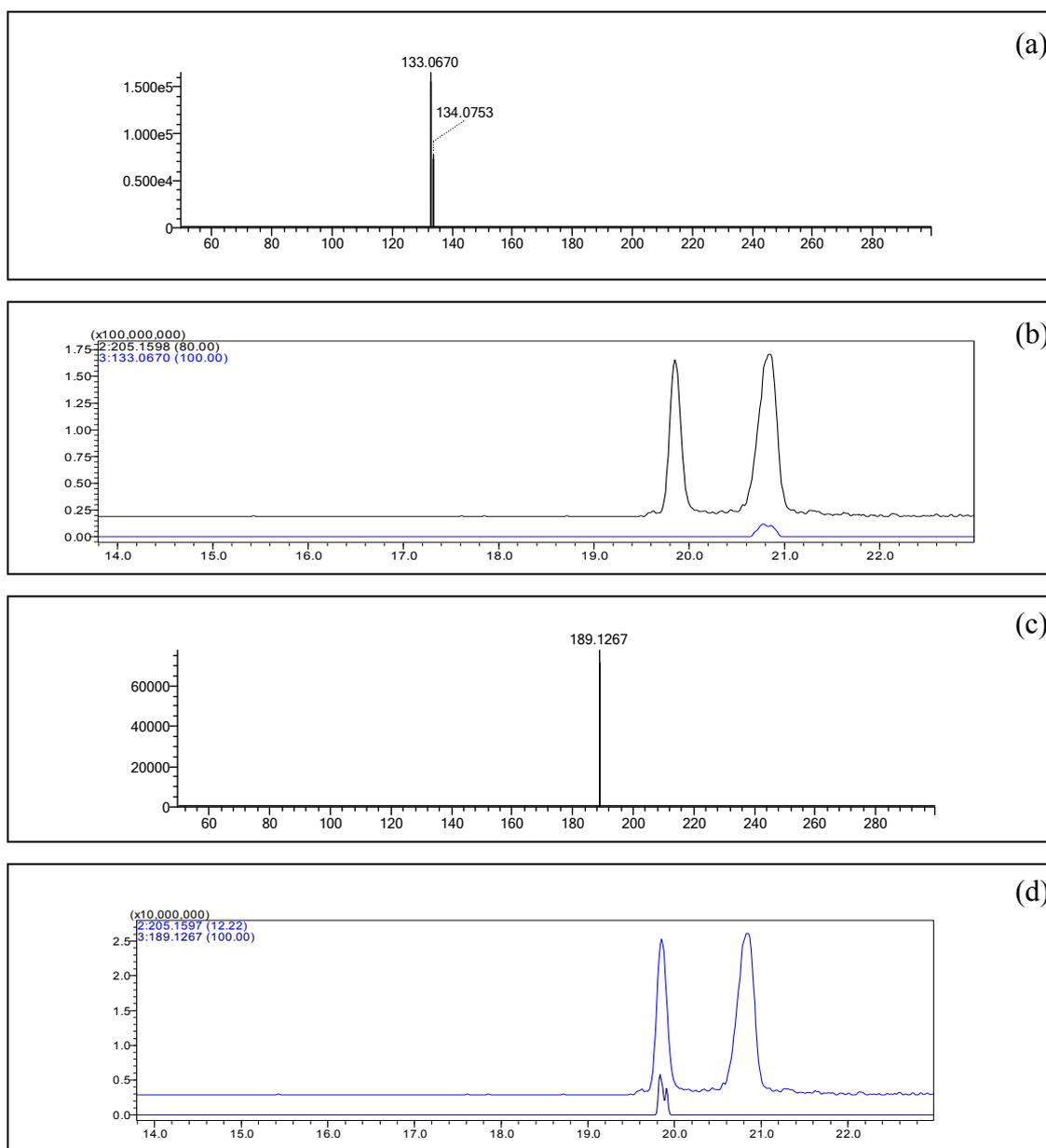


Figura 7. 8: (a) e (c) espectro de massas MS^2 obtido para fragmentação do íon $m/z=205,1598$; (b) e (d) cromatograma obtido para fragmentação do íon $m/z=205,1598$

O octilfenol possui vários isômeros e o mecanismo de fragmentação apresentado na Figura 7.9 mostra duas das possíveis fórmulas estruturais para este composto. Os isômeros representados foram escolhidos baseados no íon observado na fragmentação.

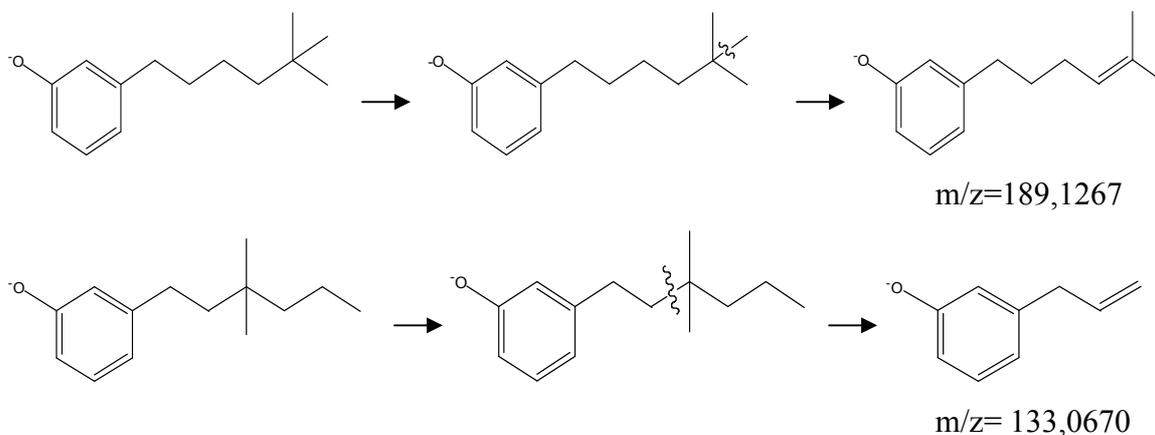


Figura 7. 9: Mecanismo de fragmentação propostos para dois isômeros do octilfenol

7.4- Alquilbenzeno Sulfonato Linear (LAS)

O alquilbenzeno sulfonato linear (LAS) é um tensoativo orgânico mundialmente utilizado como detergente. Este composto é formado por uma mistura de homólogos e isômeros que variam de 10 a 16 carbonos, sendo os compostos que apresentam de 10 a 13 carbonos os mais predominantes (Penteado *et al*, 2006). As massas referentes aos LAS, comumente encontrados em águas e efluentes, foram calculadas e pesquisadas nas amostras estudadas. Os íons obtidos, $m/z=297,1515$, $m/z=311,1684$, $m/z=325,1840$ e $m/z=339,1999$ foram encontradas em todas as amostras. Os cromatogramas e espectros de massas obtidos são apresentados na Figura 7.10 e na Figura 7.11 respectivamente.

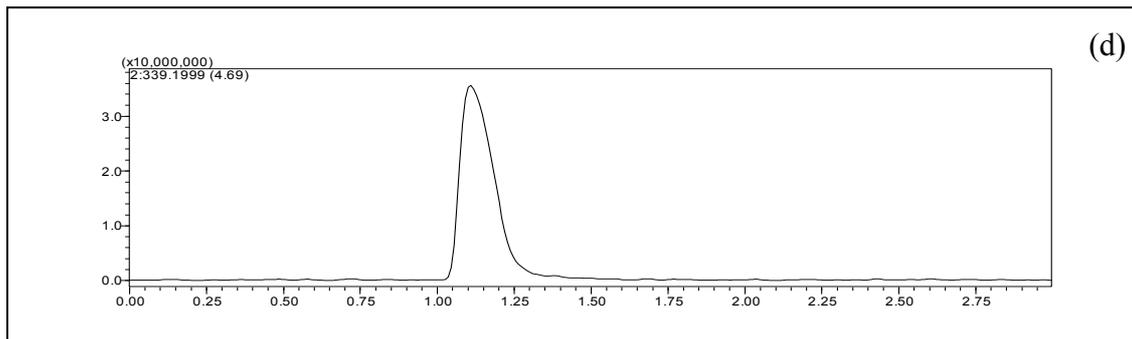
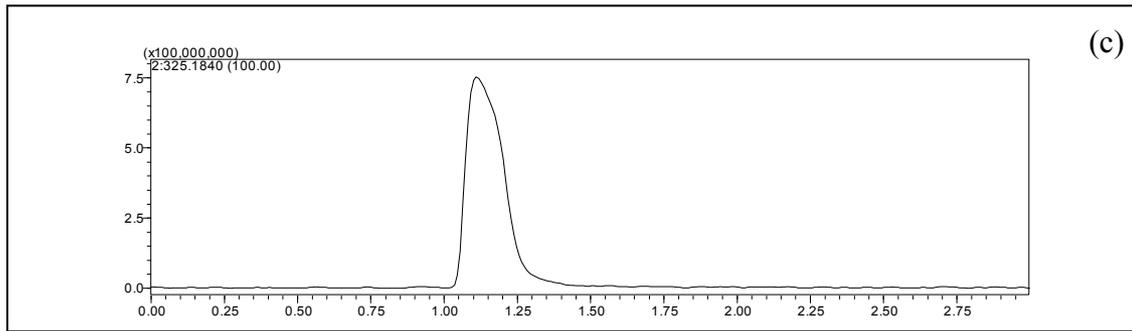
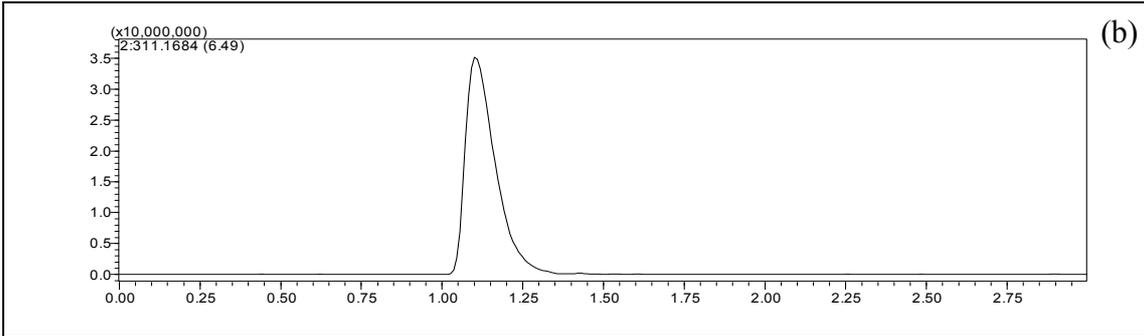
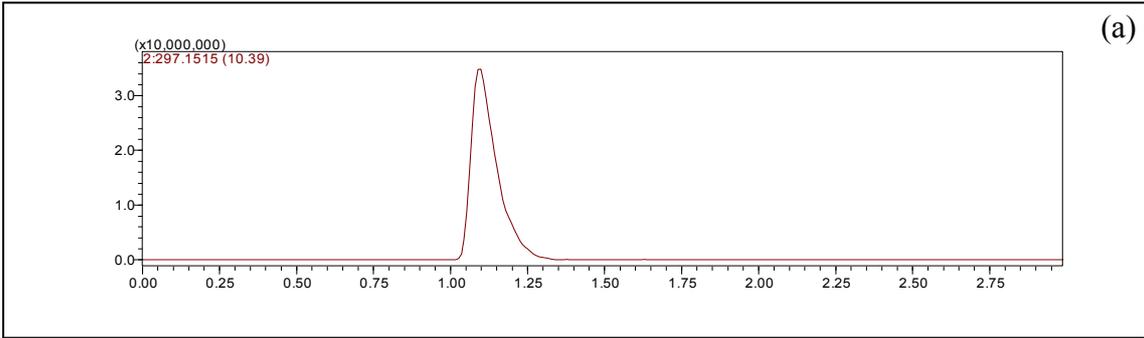


Figura 7. 10: (a),(b), (c) e (d) Cromatograma obtido para os íons $m/z=297,1515$, $m/z=311,1684$, $m/z=325,1840$ e $m/z=339,1999$

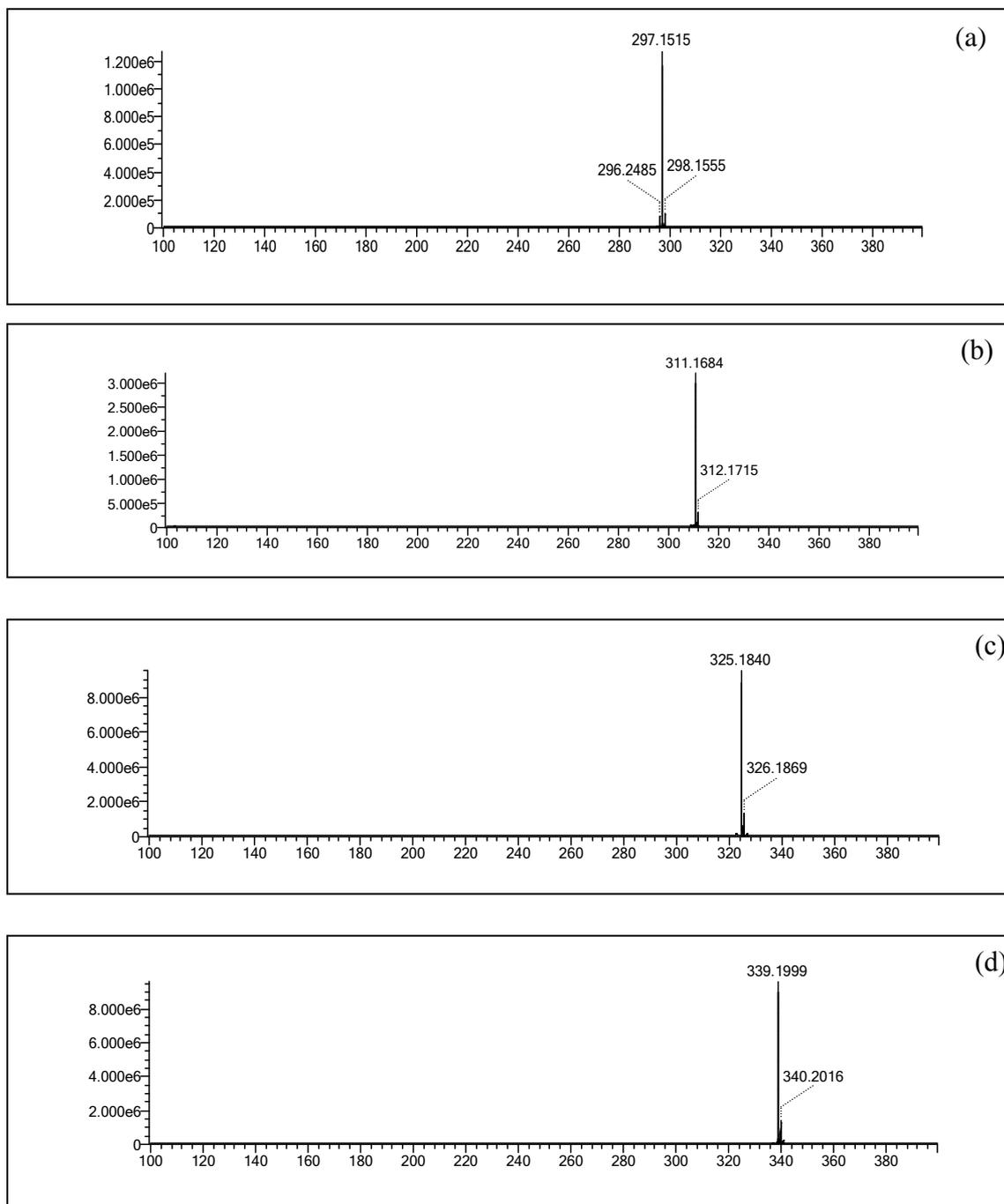


Figura 7. 11: (a), (b), (c) e (d) Espectros de massas obtidos para os íons $m/z = 297,1515$, $m/z = 311,1684$, $m/z = 325,1840$ e $m/z = 339,1999$

A relação isotópica referente a cada íon foi utilizada para apresentar as possíveis fórmulas moleculares dos compostos, as quais estão apresentadas na Tabela 7.4.

Tabela 7. 4: Resultado gerado pelo programa *Formula Predictor*, na busca por fórmula correspondente aos íons $m/z=297,1515$, $m/z=311,1684$, $m/z=325,1840$ e $m/z=339,1999$

Íon Deprotonado $m/z=297,1515$				
Fórmula Proposta (M)	Íon	m/z medido	m/z calculado	Diferença (mDa)
$C_{19}H_{22}O_3$	[M-H] -	297,1515	297,1496	1,9
$C_{16}H_{26}O_3S$	[M-H] -	297,1515	297,1530	-1,5
Íon Deprotonado $m/z=311,1684$				
Fórmula Proposta (M)	Íon	m/z medido	m/z calculado	Diferença (mDa)
$C_{17}H_{28}O_3S$	[M-H] -	311,1684	311,1686	-0,2
$C_{13}H_{28}O_8$	[M-H] -	311,1684	311,1711	-2,7
Íon Deprotonado $m/z=325,1840$				
Fórmula Proposta (M)	Íon	m/z medido	m/z calculado	Diferença (mDa)
$C_{18}H_{30}O_3S$	[M-H] -	325,1840	325,1843	-0,3
$C_{14}H_{30}O_8$	[M-H] -	325,1840	325,1868	-2,8
$C_{21}H_{26}O_3$	[M-H] -	325,1840	325,1809	3,1
Íon Deprotonado $m/z=339,1999$				
Fórmula Proposta (M)	Íon	m/z medido	m/z calculado	Diferença (mDa)
$C_{19}H_{32}O_3S$	[M-H] -	339,1999	339,1999	-0,0
$C_{15}H_{32}O_8$	[M-H] -	339,1999	339,2024	-2,5
$C_{22}H_{28}O_3$	[M-H] -	339,1999	339,1966	3,3

A MS^2 dos compostos foi realizada para comprovação de suas fórmulas estruturais. Os espectros de massas MS^2 obtidos apresentaram dois íons comuns de massa igual a 183,0125 e 197,0274 referentes a fragmentação dos compostos. Os cromatogramas e espectros de massas obtidos são apresentados na Figura 7.12 e Figura 7.13 respectivamente.

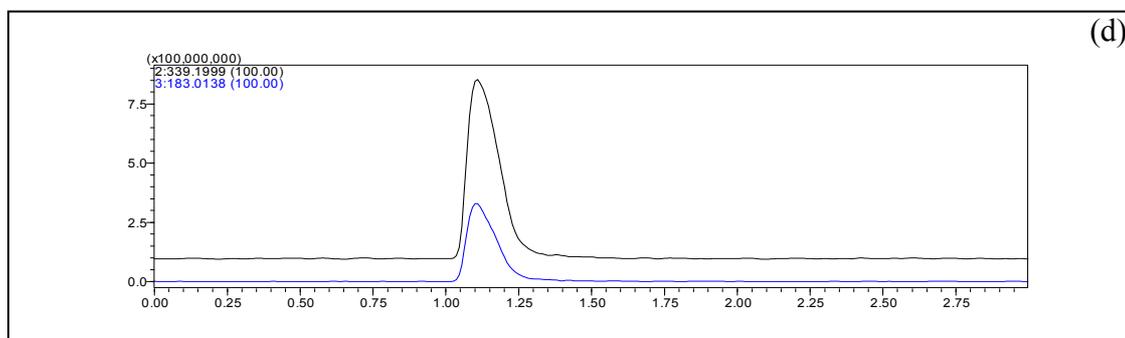
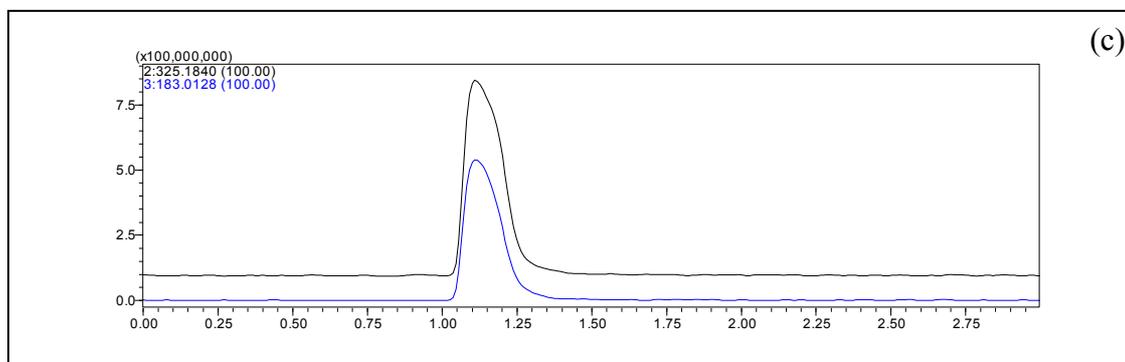
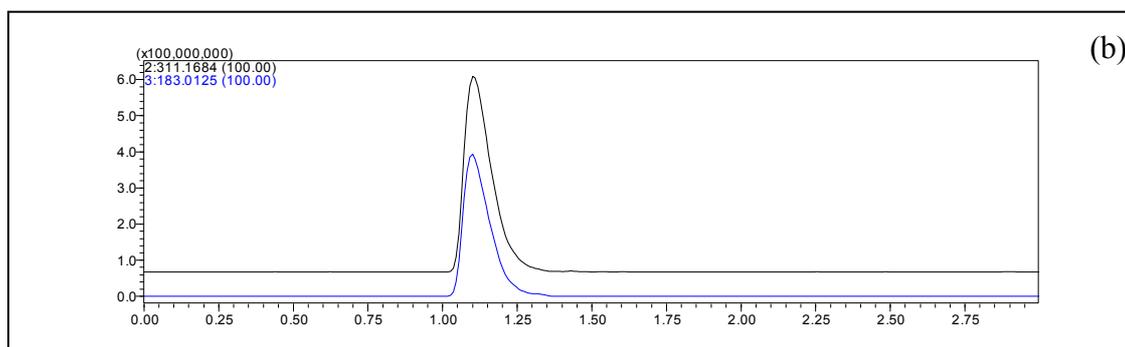
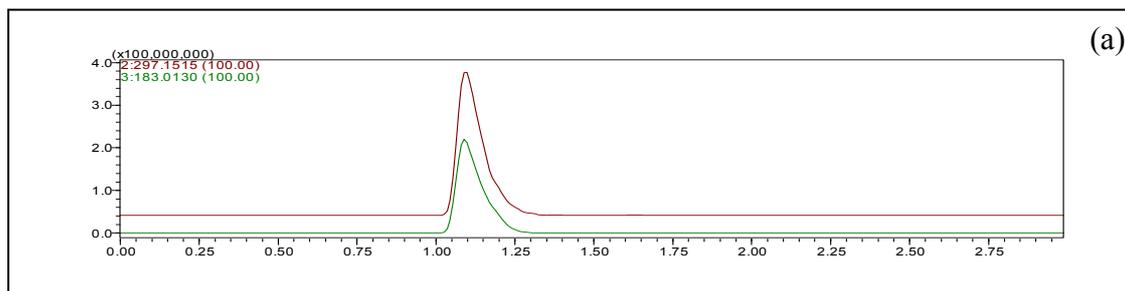


Figura 7. 12: (a), (b), (c) e (d): Cromatogramas obtidos na fragmentação dos íons $m/z=$ 297,1515, $m/z=311,1684$, $m/z= 325,1840$ e $m/z=339,1999$

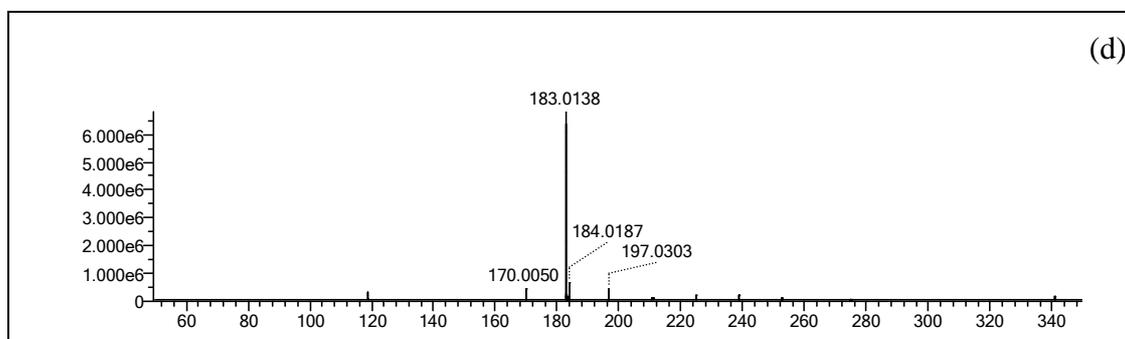
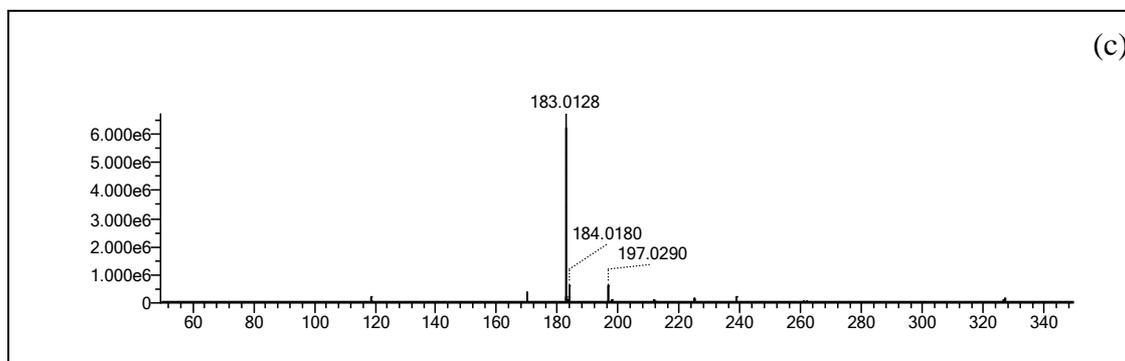
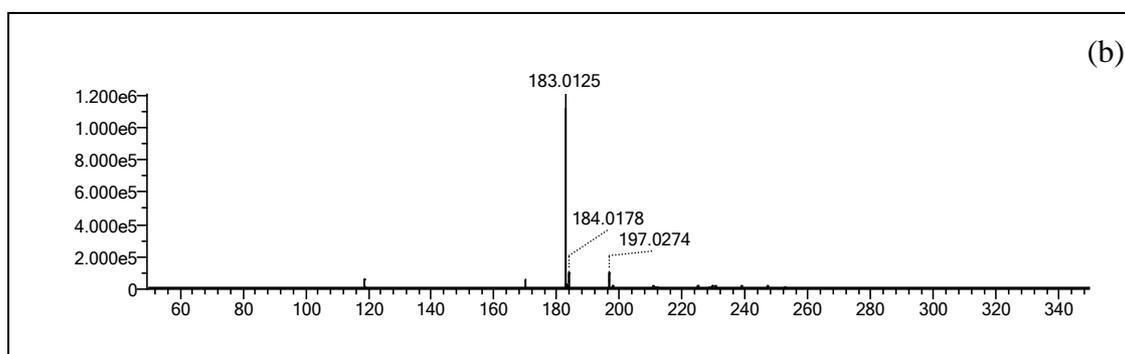
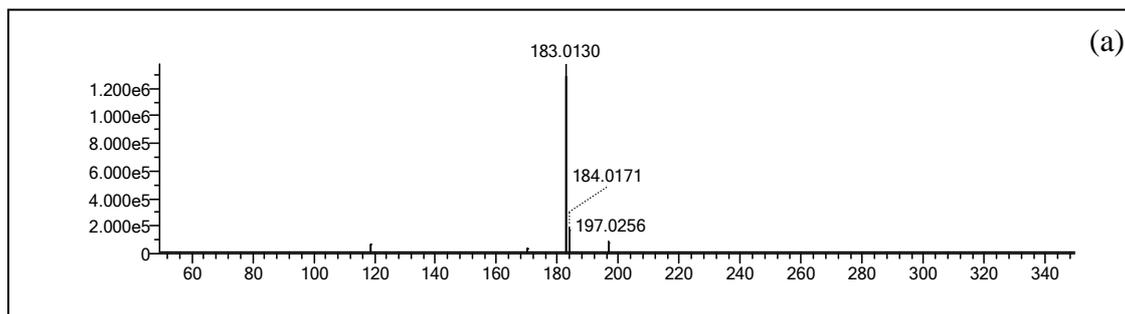


Figura 7. 13: (a), (b), (c) e (d): Espectros de massas MS^2 obtidos na fragmentação dos íons $m/z=297,1515$, $m/z=311,1684$, $m/z=325,1840$ e $m/z=339,1999$

O íon $m/z=183,0125$ possivelmente é referente a formula $C_8H_7SO_3^-$ comum aos LAS pesquisados, ao passo que, o íon $m/z=197,0274$ é referente ao fragmento $C_9H_9SO_3^-$. Os possíveis mecanismos de fragmentação para os LAS pesquisados são apresentados na Figura 7.14.

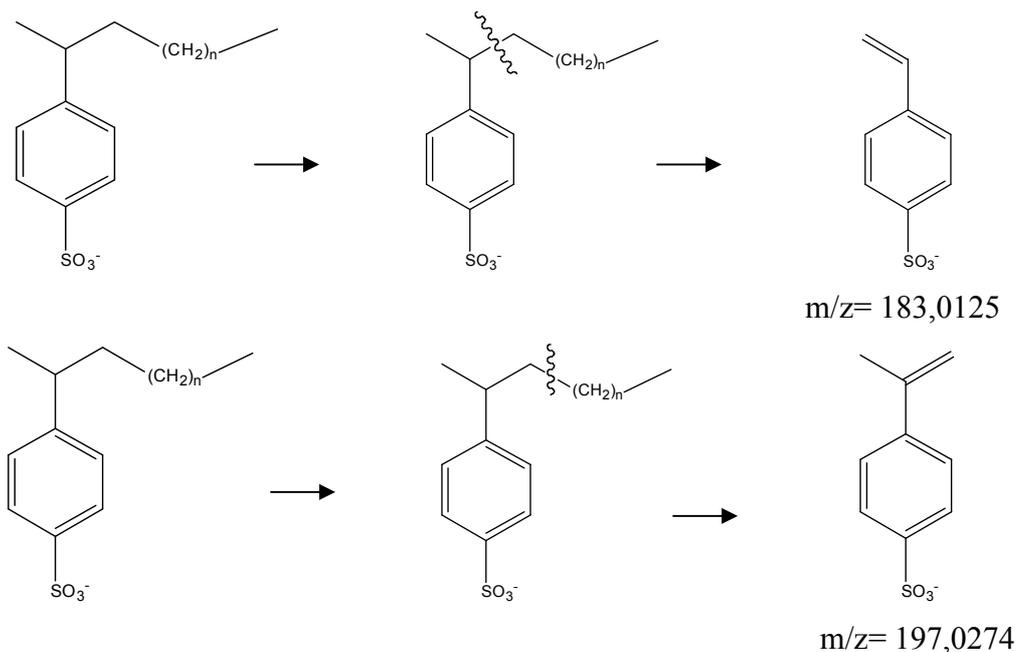


Figura 7. 14: Mecanismos de fragmentação proposto para os LAS pesquisados

7.6- Triclosan

O triclosan é um microbicida utilizado na formulação de xampus, dentifrícios e outros produtos de higiene pessoal. (Aguera *et al*, 2003). O íon de $m/z=286,9439$ referente a este composto foi pesquisado e observado em diversas amostras analisadas. A estrutura química deste composto indica uma ionização no modo negativo. O triclosan possui cloro em sua estrutura e a relação isotópica para este elemento foi observada no espectro de massas MS^l apresentado, juntamente com o cromatograma obtido, na Figura 7.15.

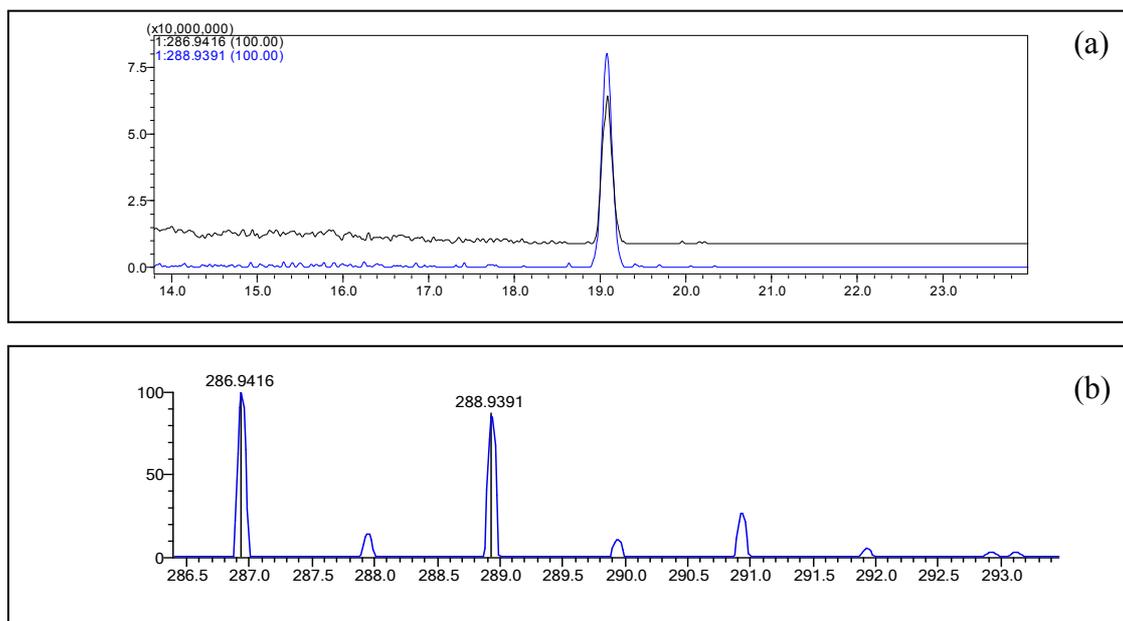


Figura 7. 15: (a) Cromatograma obtido para fragmentação do íon $m/z=286,9416$; (b) Espectro de massas MS^2 obtido para fragmentação do íon $m/z=286,9416$.

O íon medido foi inserido no programa *Formula Predictor* e duas possibilidades de fórmulas moleculares foram apresentadas (Tabela 7.5).

Tabela 7. 5: Resultado gerado pelo programa *Formula Predictor*, na busca por fórmula correspondente ao $m/z= 286,9416$

Fórmula Proposta (M)	Íon	m/z medido	m/z calculado	Diferença (mDa)
$C_{12}H_7O_2Cl_3$	[M-H] -	286,9416	286,9439	-2,3
$C_{13}HO_6Cl$	[M-H] -	286,9416	286,9389	2,7

A fragmentação do composto foi realizada para que uma confirmação da fórmula estrutural fosse possível, contudo, a intensidade do composto nas amostras analisadas não possibilitou a geração de um espectro de massa MS^2 . Entretanto, a relação isotópica obtida é muito característica e uma comparação entre o íon medido de $m/z= 286,9416$ e íon sugerido de $m/z=286,9439$ foi realizada e está apresentada na Figura 7.16.

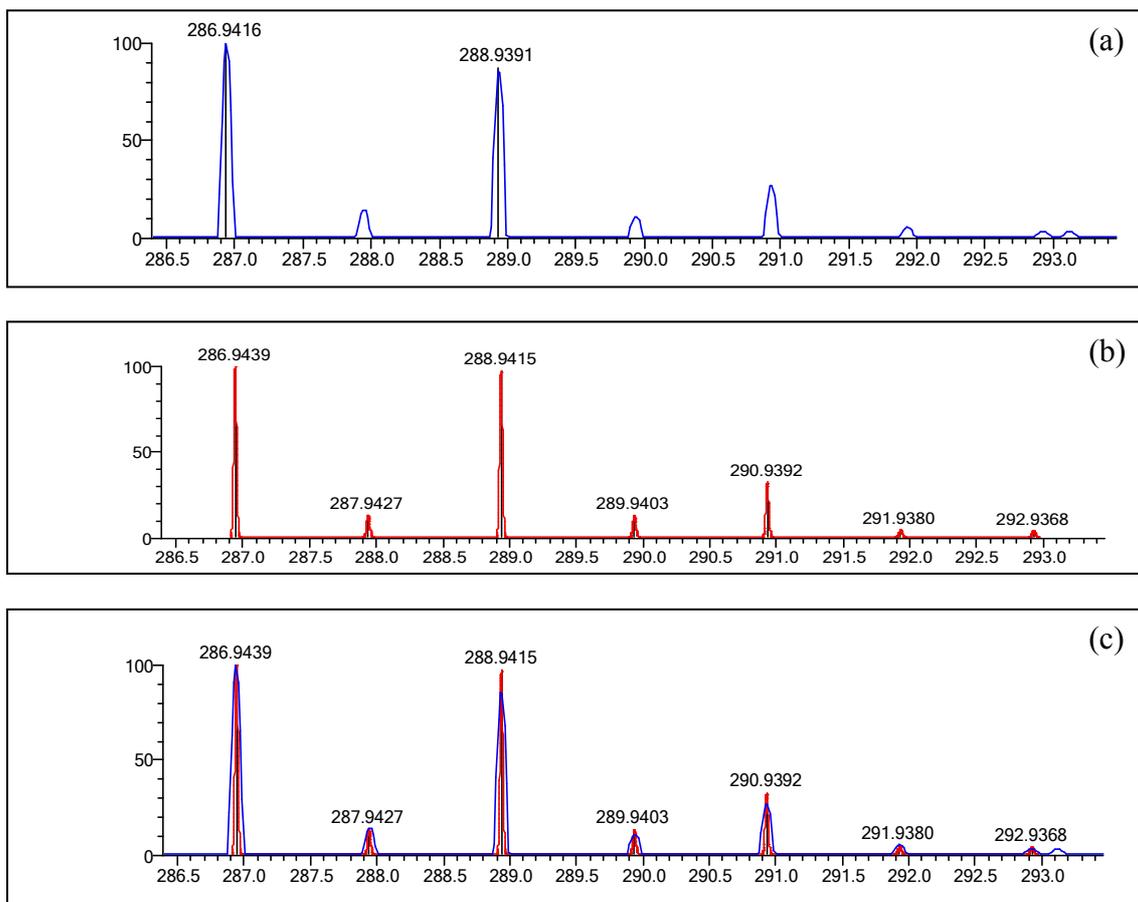


Figura 7. 16: (a) Espectro de massas MS^l observado para o íon de $m/z= 286,9416$; (b) Espectro de massas MS^l apresentado para o íon de $m/z= 286,9439$; (c) Sobreposição dos espectros de massas MS^l referentes ao íon medido de $m/z= 286,9416$ e íon calculado de $m/z= 286,9439$.

A sobreposição realizada indica uma grande semelhança entre o íon medido e o íon observado e, portanto, a fórmula molecular apresentada possivelmente se refere ao $C_{12}H_7O_2Cl_3$.

8- CONCLUSÃO

A metodologia desenvolvida permitiu a análise de perturbadores endócrinos em níveis traços nas águas do rio das Velhas. A quantificação destas substâncias só foi possível devido a sensibilidade e acurácia do instrumento utilizado. O cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas, que possui IT e TOF como analisadores de massas apresenta uma ótima resposta para os compostos estudados, contudo, dificuldades como a supressão dos analitos de interesse durante a ionização ainda não foram totalmente superadas. Soma-se a estas ainda a dificuldade, em especial, na análise do nonilfenol devido a quantidade de isômeros que este possui.

O Brasil, assim como em outros países, não possui nenhum parâmetro de regulação dos perturbadores endócrinos estudados em águas utilizadas para consumo, contudo, os riscos ocasionados por estes à saúde humana devem ser considerados. Os hormônios como o etinilestradiol possuem elevada estrogenicidade e ocasionam efeitos adversos à saúde em menores doses, contudo, a eventualidade em que estes foram encontrados, indicam que os riscos que estes apresentam à saúde do homem são menos significativos quando comparados ao bisfenol. Os valores encontrados para o bisfenol na água bruta são expressivos (de 8,6 a 168,3ng/L), pois esta substância foi encontrada em todas as amostras analisadas, contudo, para verificar o real risco que este apresenta a saúde deve-se fazer um estudo em águas tratadas. Assim estudos mais detalhados da degradação deste composto nas ETAs são necessários.

9- PERSPECTIVAS

Para trabalhos futuros sugere-se a quantificação de outros microcontaminantes encontrados, tais como o di(etil)hexil ftalato, octilfenol, cafeína, entre outros, para avaliar os níveis em que estes estão presentes no rio das Velhas e em outros corpos d' água brasileiros, uma vez que este estudo mostrou que diversos outros compostos foram encontrados no rio das Velhas.

Também é importante avaliar a presença destes perturbadores nas estações de tratamento de água e a eficiência que estes possuem na remoção destes compostos da água para consumo, visto que ainda são poucos os estudos publicados de remoção de microcontaminantes orgânicos em águas brasileiras.

10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÜERA A., FERNÁNDEZ-ALBA A. R., PIEDRA L., MÉZCUA M., GÓMEZ M. J., Evaluation of triclosan and biphenylol in marine sediments and urban wastewaters by pressurized liquid extraction and solid phase extraction followed by gas chromatography mass spectrometry and liquid chromatography mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v.480, p. 193–205, 2003.
- AHEL, M., MCEVOY, J. & GIGER, W. Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in fresh-water organisms. *Environmental Pollution*, 79, 243-248, 1993.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, https://anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm, acessado em 14/01/2010
- ALUM, A., YOON, Y., WESTERHOFF, P. & ABBASZADEGAN, M., Oxidation of bisphenol A, 17 beta-estradiol, and 17 alpha-ethynyl estradiol and byproduct estrogenicity. *Environmental Toxicology*, v.19, p.257-264, 2004
- AURIOL, M., FILALI-MEKNASSI, Y., ADAMS, C. D., TYAGI, R. D., NOGUEROL, T. N. & PINA, B., Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater: Efficiency of horseradish peroxidase and laccase from *Trametes versicolor*. *Chemosphere*, v.70, p.445-452, 2008
- AZEVEDO, D. D., LACORTE, S., BARCELO, P. V. & BARCELO, D., Occurrence of nonylphenol and bisphenol-A in surface waters from Portugal. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.12, p.532-537, 2001
- BALLESTEROS-GOMEZ, A., RUBIO, S. & PEREZ-BENDITO, D., Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. *Journal of Chromatography A*, v.1216, p.449-469, 2009
- BALLESTEROS, O., ZAFRA, A., NAVALÓN, A., VÍLCHEZ, J. L., Sensitive gas chromatographic–mass spectrometric method for the determination of phthalate esters, alkylphenols, bisphenol A and their chlorinated derivatives in wastewater samples. *Journal of Chromatography A*, v.1121, p.154–162, 2006

- BARONTI, C., CURINI, R., D'ASCENZO, G., DI CORCIA, A., GENTILI, A. & SAMPERI, R., Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environmental Science & Technology*, v.34, p.5059-5066, 2000.
- BARREDA, M., LOPEZ, F. J., VILLARROYA, M., BELTRAN, J., GARCIA-BAUDIN, J. M. & HERNANDEZ, F., Residue determination of captan and folpet in vegetable samples by gas chromatography/negative chemical ionization-mass spectrometry. *Journal of Aoac International*, v.89, p.1080-1087, 2006.
- BECK, I. C., BRUHN, R., GANDRASS, J. & RUCK, W., Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea. *Journal of Chromatography A*, v.1090, p.98-106, 2005.
- BENOTTI, M. J., TRENHOLM, R. A., VANDERFORD, B. J., HOLADY, J. C., STANFORD, B. D. & SNYDER, S. A., Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Compounds in US Drinking Water. *Environmental Science & Technology*, v.43, p.597-603, 2009.
- BILA, D.M., MONTALVÃO, A.F., DEZOTTI, M. Ozonização do perturbador endócrino 17 β -estradiol. In: 23º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005, Campo Grande-MS, 2005, 5 páginas.
- BILA, D. M. & DEZOTTI, M., Endocrine disrupters in the environment: Part 1 - Effects and consequences. *Quimica Nova*, v.30, p.651-666, 2007.
- BODZEK, M., DUDZIAK, M. & LUKS-BETLEJ, K., Application of membrane techniques to water purification. Removal of phthalates. *Desalination*, v.162, p.121-128, 2004
- BOYD, G. R., PALMERI, J. M., ZHANG, S. Y. & GRIMM, D. A., Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine disrupting chemicals (EDCs) in stormwater canals and Bayou St. John in New Orleans, Louisiana, USA. *Science of the Total Environment*, v.333, p.137-148, 2004.
- BRIX, R., HVIDT, S. & CARLSEN, L., Solubility of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates. On the possible role of micelles. *Chemosphere*, v.44, p.759-763, 2001.

- BRUCHET, A., PROMPSY, C., FILIPPI, G. & SOUALI, A., A broad spectrum analytical scheme for the screening of endocrine disruptors (EDs), pharmaceuticals and personal care products in wastewaters and natural waters. *Water Science and Technology*, v.46, p.97-104, 2002.
- CABANA, H., JIWAN, J. L. H., ROZENBERG, R., ELISASHVILI, V., PENNINCKX, M., AGATHOS, S. N. & JONES, J. P., Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona*. *Chemosphere*, v.67, p.770-778, 2007.
- CAMPBELL, C. G., BORGLIN, S. E., GREEN, F. B., GRAYSON, A., WOZEI, E. & STRINGFELLOW, W. T., Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. *Chemosphere*, v.65, p.1265-1280, 2006.
- CEPA, 2001 Priority Substances List Assessment Report. Nonylphenol and its Ethoxylates. Canadian Environmental Protection Act, 1999. Environment Canada, Health Canada.
- CARGOUET, M., PERDIZ, D. & LEVI, Y., Evaluation of the estrogenic potential of river and treated waters in the Paris area (France) using in vivo and in vitro assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.67, p.149-156, 2007.
- CESPEDES, R., LACORTE, S., GINEBREDA, A. & BARCELO, D., Chemical monitoring and occurrence of alkylphenols, alkylphenol ethoxylates, alcohol ethoxylates, phthalates and benzothiazoles in sewage treatment plants and receiving waters along the Ter River basin (Catalonia, N. E. Spain). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.385, p.992-1000, 2006.
- CHEN, H. C., KUO, H. W. & DING, W. H., Determination of estrogenic compounds in wastewater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure photoionization following desalting extraction. *Chemosphere*, v.74, p.508-514, 2009.
- CHIU, T. Y., KOH, Y. K. K., PATERAKIS, N., BOOBIS, A. R., CARTMELL, E., RICHARDS, K. H., LESTER, J. N. & SCRIMSHAW, M. D., The significance of sample mass in the analysis of steroid estrogens in sewage sludges and the

- derivation of partition coefficients in wastewaters. *Journal of Chromatography A*, v.1216, p.4923-4926, 2009.
- CETESB 2008 “Relatório de Qualidade das Águas Interiores no Estado de São Paulo.”
Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - São Paulo
- DAMSTRA, T., BARLOW, S., BERGMAN, A., KAVLOCK, R., KRAAK, G.V.D.,
"Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disrupters." World
Health Organization - International Programme on Chemical Safety, 180. 2002.
- D'ASCENZO, G., DI CORCIA, A., GENTILI, A., MANCINI, R., MASTROPASQUA,
R., NAZZARI, M., SAMPERI, R., Fate of natural estrogen conjugates in municipal
sewage transport and treatment facilities. *The Science of the Total Environment*, v.
302, p.199–209, 2003.
- CHOI, K. J., KIM, S. G., KIM, C. W. & KIM, S. H., Effects of activated carbon types and
service life on removal of endocrine disrupting chemicals: amitrol, nonylphenol,
and bisphenol-A. *Chemosphere*, v.58, p.1535-1545, 2005.
- CHOI, K. J., KIM, S. G., KIM, C. W. & PARK, J. K., Removal efficiencies of endocrine
disrupting chemicals by coagulation/flocculation, ozonation, powdered/granular
activated carbon adsorption, and chlorination. *Korean Journal of Chemical
Engineering*, v.23, p.399-408, 2006.
- CICAD 2003 “Concise International Chemical Assessment Document 52 - diethyl
phthalate” World Health Organization, Geneva.
- COM. (1999) “Community strategy for endocrine disrupters: a range of substances
suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife.
Communication from the commission to the council and the European parliament.”
Commission of the European Communities, Bruxelas, Bélgica, 706.
- COM (2001) “Communication from the commission to the council and the European
parliament on the implementation of the Community strategy for endocrine
disrupters – a range of substances suspected of interfering with the hormone
systems of humans and wildlife (COM(1999)706).” Commission of the European
Communities, Bruxelas, Bélgica, 262.
- CUI, Y. H., LI, X. Y. & CHEN, G., Electrochemical degradation of bisphenol A on
different anodes. *Water Research*, v.43, p.1968-1976, 2009.

- DE ALDA, M. J. L., DIAZ-CRUZ, S., PETROVIC, M. & BARCELO, D., Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *Journal of Chromatography A*, v.1000, p.503-526, 2003.
- DE ALDA, M. J. L., BARCELO, D., Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.892, p.391- 406, 2000.
- EUROCHEM WORKING GROUP, 1998. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*.
- FARRE, M., KUSTER, M., BRIX, R., RUBIO, F., DE ALDA, M. J. L. & BARCELO, D., Comparative study of an estradiol enzyme-linked immunosorbent assay kit, liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and ultra performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry for part-per-trillion analysis of estrogens in water samples. *Journal of Chromatography A*, v.1160, p.166-175, 2007.
- FATOKI, O. S. & NOMA, A., Solid phase extraction method for selective determination of phthalate esters in the aquatic environment. *Water Air and Soil Pollution*, v.140, p.85-98, 2002.
- FERNANDEZ, M. P., NOGUEROL, T. N., LACORTE, S., BUCHANAN, I. & PINA, B., Toxicity identification fractionation of environmental estrogens in waste water and sludge using gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry and recombinant yeast assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.393, p.957-968, 2009.
- FERREIRA, F., SANTOS, M. M., CASTRO, L. F. C., REIS-HENRIQUES, M. A., LIMA, D., VIEIRA, M. N. & MONTEIRO, N. M., Vitellogenin gene expression in the intertidal blenny *Lipophrys pholis*: A new sentinel species for estrogenic chemical pollution monitoring in the European Atlantic coast? *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, v.149, p.58-64, 2009.
- FINE, D. D., BREIDENBACH, G. P., PRICE, T. L. & HUTCHINS, S. R., Quantitation of estrogens in ground water and swine lagoon samples using solid-phase extraction, pentafluorobenzyl/trimethylsilyl derivatizations and gas chromatography-negative

- ion chemical ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1017, p.167-185, 2003.
- FONTANALS, N., MARCE, R. M. & BORRULL, F., New materials in sorptive extraction techniques for polar compounds. *Journal of Chromatography A*, v.1152, p.14-31, 2007.
- FROMME, H., KUCHLER, T., OTTO, T., PILZ, K., MULLER, J. & WENZEL, A., Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research*, v.36, p.1429-1438, 2002.
- GALLENKEMPER, M., WINTGENS, T., MELIN, T., Nanofiltration of endocrine disrupting compounds. *Water Science and Technology: Water Supply*, v.3, p.321–327, 2003.
- GATIDOU, G., THOMAIDIS, N. S., STASINAKIS, A. S. & LEKKAS, T. D., Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1138, p.32-41, 2007.
- GHISELLI, G. & JARDIM, W. F., Endocrine disruptors in the environment. *Quimica Nova*, v.30, p.695-706, 2007.
- GHISELLI, G. 2006 Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: Ocorrência da determinação dos Interferentes Endócrinos (IE) e Produtos Farmacêuticos e de Higiene Pessoal (PFHP), 2006, 190 páginas, Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
- GIBSON, R., BECERRIL-BRAVO, E., SILVA-CASTRO, V. & JIMENEZ, B., Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine, disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1169, p.31-39, 2007.
- GIESE, R. W., Measurement of endogenous estrogens: analytical challenges and recent advances. *Journal of Chromatography A*, v.1000, p.401-412, 2003.
- GIROTTI, G.; NOGUEIRA, K. L.; MOURA, J. A.; SOUZA, J. B.; GIACOMETTI, L. L.; MARCHI, M. R. R.; TOGNOLLI, J. O.; “Estrógenos em água: otimização da

- extração em fase sólida utilizando ferramentas quimiométricas.” *Eclética Química*, v.32, p.61-67, 2007.
- GOMEZ, L. F. & SARRIA, V. M., Heterogeneous photodegradation of bisphenol a in water with titanium dioxide. *Quimica Nova*, v.32, p.1164-1169, 2009.
- GONZALEZ, S., PETROVIC, M. & BARCELO, D., Simultaneous extraction and fate of linear alkylbenzene sulfonates, coconut diethanol amides, nonylphenol ethoxylates and their degradation products in wastewater treatment plants, receiving coastal waters and sediments in the Catalanian area (NE Spain). *Journal of Chromatography A*, v.1052, p.111-120, 2004.
- GROVER, D. P., ZHANG, Z. L., READMAN, J. W. & ZHOU, J. L., A comparison of three analytical techniques for the measurement of steroidal estrogens in environmental water samples. *Talanta*, v.78, p.1204-1210, 2009.
- GUENTHER, K., KLEIST, E., e THIELE, B., Estrogen-active nonylphenols from an isomer-specific viewpoint: a systematic numbering system and future trends. *Anal Bioanal Chem*, v.384, p.542–546, 2006.
- HANKINSON, S. E., MANSON, J. E., LONDON, S. J., WILLETT, W. C. & SPEIZER, F. E., Laboratory reproducibility of endogenous hormone levels in postmenopausal women. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v.3, p.51-56, 1994.
- HARRISON, P. T. C., HOLMES, P. & HUMFREY, C. D. N., Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure? *Science of the Total Environment*, v.205, p.97-106, 1997.
- HERBST, A. L., ULFELDER, H. & POSKANZE, D. C., Adenocarcinoma of vagina - association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *New England Journal of Medicine*, v.284, p.878, 1971.
- HIBBERD, A., MASKAOUI, K., ZHANG, Z. & ZHOU, J. L., An improved method for the simultaneous analysis of phenolic and steroidal estrogens in water and sediment. *Talanta*, v.77, p.1315-1321, 2009.
- HU, J. Y., ZHANG, H. F. & CHANG, H., Improved method for analyzing estrogens in water by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1070, p.221-224, 2005.

- ICH 2005 International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use; Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1), 2005
- IGAM - Instituto Mineiro de Gestão das Águas – acessado em 29 de janeiro de 2010. http://aguas.igam.mg.gov.br/aguas/htmls/aminas_nwindow/param_micro.htm)
- INMETRO 2003 Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008
- JAHNKE, A., GANDRASS, J. & RUCK, W., Simultaneous determination of alkylphenol ethoxylates and their biotransformation products by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1035, p.115-122, 2004.
- JENKINS, S., RAGHURAMAN, N., ELTOUM, I., CARPENTER, M., RUSSO, J. & LAMARTINIERE, C. A., Oral Exposure to Bisphenol A Increases Dimethylbenzanthracene-Induced Mammary Cancer in Rats. *Environmental Health Perspectives*, v.117, p.910-915, 2009.
- JIANG, L. Y., HUANG, C., CHEN, J. M. & CHEN, X., Oxidative Transformation of 17 beta-estradiol by MnO₂ in Aqueous Solution. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v.57, p.221-229, 2009.
- JOHNSON, A. C., BELFROID, A. & DI CORCIA, A., Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Science of the Total Environment*, v.256, p.163-173, 2000.
- KANG, J. H., RI, N. & KONDO, F., *Streptomyces* sp strain isolated from river water has high bisphenol A degradability. *Letters in Applied Microbiology*, v.39, p.178-180, 2004.
- KASPRZYK-HORDERN, B., DINSDALE, R. M. & GUWY, A. J., The effect of signal suppression and mobile phase composition on the simultaneous analysis of multiple classes of acidic/neutral pharmaceuticals and personal care products in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-negative electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta*, v.74, p.1299-1312, 2008a.

- KASPRZYK-HORDERN, B., DINSDALE, R. M. & GUWY, A. J., The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Research*, v.42, p.3498-3518, 2008b.
- KAYALI, N., TAMAYO, F. G. & POLO-DIEZ, L. M., Determination of diethylhexyl phthalate in water by solid phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography. *Talanta*, v.69, p.1095-1099, 2006.
- KOH, Y. K. K., CHIU, T. Y., BOOBIS, A. R., CARTMELL, E., POLLARD, S. J. T., SCRIMSHAW, M. D. & LESTER, J. N., A sensitive and robust method for the determination of alkylphenol polyethoxylates and their carboxylic acids and their transformation in a trickling filter wastewater treatment plant. *Chemosphere*, v.73, p.551-556, 2008.
- KOLPIN, D. W., FURLONG, E. T., MEYER, M. T., THURMAN, E. M., ZAUGG, S. D., BARBER, L. B. & BUXTON, H. T., Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, v.36, p.1202-1211, 2002.
- KOMORI, K., TANAKA, H., OKAYASU, Y., YASOJIMA, M. & SATO, C., Analysis and occurrence of estrogen in wastewater in Japan. *Water Science and Technology*, v.50, p.93-100, 2004.
- KUCH, H. M. & BALLSCHMITER, K., Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environmental Science & Technology*, v.35, p.3201-3206, 2001.
- KUSTER, M., DE ALDA, M. L. & BARCELO, D., Liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis and regulatory issues of polar pesticides in natural and treated waters. *Journal of Chromatography A*, v.1216, p.520-529, 2009.
- LABADIE, P., M. HILL, E. M., Analysis of estrogens in river sediments by liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. Comparison of tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1141, p.174–181, 2007.
- LAGANA, A., BACALONI, A., DE LEVA, I., FABERI, A., FAGO, G. & MARINO, A., Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting

- chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Analytica Chimica Acta*, v.501, p.79-88, 2004.
- LANÇAS, F.M. 2004. Validação de métodos cromatográficos de análise, Rima, São Carlos, 62 páginas
- LEE, H. B., PEART, T. E. & SVOBODA, M. L., Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1094, p.122-129, 2005.
- LEI, B. L., HUANG, S. B., ZHOU, Y. Q., WANG, D. H. & WANG, Z. J., Levels of six estrogens in water and sediment from three rivers in Tianjin area, China. *Chemosphere*, v.76, p.36-42, 2009.
- LI, J. D., CAI, Y. Q., SHI, Y. L., MOU, S. F. & JIANG, G. B., Analysis of phthalates via HPLC-UV in environmental water samples after concentration by solid-phase extraction using ionic liquid mixed hemimicelles. *Talanta*, v.74, p.498-504, 2008.
- LIANG, P., XU, J. & LI, Q., Application of dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for the determination of three phthalate esters in water samples. *Analytica Chimica Acta*, v.609, p.53-58, 2008.
- LINTELMANN, J., KATAYAMA, A., KURIHARA, N., SHORE, L. & WENZEL, A., Endocrine disruptors in the environment - (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, v.75, p.631-681, 2003.
- LIU, R., ZHOU, J. L. & WILDING, A., Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1022, p.179-189, 2004.
- LIU, Z. H., KANJO, Y. & MIZUTANI, S., Urinary excretion rates of natural estrogens and androgens from humans, and their occurrence and fate in the environment: A review. *Science of the Total Environment*, v.407, p.4975-4985, 2009.
- MATOZZO, V. & MARIN, M. G., Can 4-nonylphenol induce vitellogenin-like proteins in the clam *Tapes philippinarum*? *Environmental Research*, v.97, p.43-49, 2005.
- MAURICIO, R., DINIZ, M., PETROVIC, M., AMARAL, L., PERES, I., BARCELO, D. & SANTANA, F., A characterization of selected endocrine disruptor compounds in

- a Portuguese wastewater treatment plant. *Environmental Monitoring and Assessment*, v.118, p.75-87, 2006.
- MEI, H., HSIEH, Y. S., NARDO, C., XU, X. Y., WANG, S. Y., NG, K. & KORFMACHER, W. A., Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: application to drug discovery. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v.17, p.97-103, 2003.
- MOREIRA, D. S. 2008 “Desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia/espectrometria de massas para avaliação da ocorrência de perturbadores endócrinos em mananciais de abastecimento da região metropolitana de belo horizonte.” 108 páginas. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto-MG,
- NAGEL, S. C., VOMSAAL, F. S., THAYER, K. A., DHAR, M. G., BOECHLER, M. & WELSHONS, W. V., Relative binding affinity serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environmental Health Perspectives*, v.105, p.70-76, 1997.
- NAKAMURA, S., SIAN, T. H. & DAISHIMA, S., Determination of estrogens in river water by gas chromatography-negative-ion chemical-ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.919, p.275-282, 2001.
- NIE, Y. F., QIANG, Z. M., ZHANG, H. Q. & ADAMS, C., Determination of endocrine-disrupting chemicals in the liquid and solid phases of activated sludge by solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1216, p.7071-7080, 2009.
- NIESSEN, W. M. A., State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.856, p.179-197, 1999.
- NIMROD, A. C. & BENSON, W. H., Estrogenic responses to xenobiotics in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Marine Environmental Research*, v.42, p.155-160, 1996.
- NOGUEIRA, J. M. F., Desreguladores Endócrinos: Efeitos adversos e estratégias para monitorização dos sistemas aquáticos. *Química*, v.88, p.65-71, 2003.

- PEDROUZO, M., BORRULL, F., POCURULL, E. & MARCE, R. M., Estrogens and their conjugates: Determination in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, v.78, p.1327-1331, 2009.
- PENG, X. Z., YU, Y. J., TANG, C. M., TAN, J. H., HUANG, Q. X. & WANG, Z. D., Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. *Science of the Total Environment*, v.397, p.158-166, 2008.
- PENTEADO, J. C. P., EL SEOUD, O. A., CARVALHO, L. R. F. “Alquilbenzeno sulfonato linear: uma abordagem ambiental e analítica” *Química Nova*, v.29, p.1038-1046, 2006.
- PEREIRA, C., MAPUSKAR, K., VAMAN RAO, C., Effect of diethyl phthalate on rat testicular antioxidant system: A dose-dependent toxicity study. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 90, p.52–57, 2008.
- PETROVIC, M., ELJARRAT, E., DE ALDA, M. J. L. & BARCELO, D., Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples. *Journal of Chromatography A*, v.974, p.23-51, 2002.
- PNMAII 2004 – Relatório do Programa Nacional do Meio Ambiente: “Aperfeiçoamento do Monitoramento da Qualidade das Águas da Bacia do Alto Curso do Rio das Velhas – Avaliação dos resultados do ano de 2003” Ministério do Meio Ambiente-Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável de Minas Gerais – SEMAD.
- PSILLAKIS, E. & KALOGERAKIS, N., Hollow-fibre liquid-phase microextraction of phthalate esters from water. *Journal of Chromatography A*, v.999, p.145-153, 2003.
- PURDOM, C. E., HARDIMAN, P. A., BYE, V. V. J., ENO, N. C., TYLER, C. R. & SUMPTER, J. P., Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works. *Chemistry and Ecology*, v.8, p.275 – 285, 1994.
- QUINTANA, J. B., CARPINTEIRO, J., RODRIGUEZ, I., LORENZO, R. A., CARRO, A. M. & CELA, R., Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, v.1024, p.177-185, 2004.

- RAMAKRISHNAN, S. & WAYNE, N. L., Impact of bisphenol-A on early embryonic development and reproductive maturation. *Reproductive Toxicology*, v.25, p.177-183, 2008.
- RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C., Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v.27, p.771-780, 2004
- RIBEIRO, C., PARDAL, M. A., MARTINHO, F., MARGALHO, R., TIRITAN, M. E., ROCHA, E. & ROCHA, M. J., Distribution of endocrine disruptors in the Mondego River estuary, Portugal. *Environmental Monitoring and Assessment*, v.149, p.183-193, 2009.
- RODRIGUEZ-MOZAZ, S., DE ALDA, M. J. L. & BARCELO, D., Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. *Journal of Chromatography A*, v.1152, p.97-115, 2007.
- ROUTLEDGE, E. J., SHEAHAN, D., DESBROW, C., BRIGHTY, G. C., WALDOCK, M. & SUMPTER, J. P., Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environmental Science & Technology*, v.32, p.1559-1565, 1998.
- RUDDER, J. D., WIELE, T. V. D., DHOOGHE, W., COMHAIRE, F. & VERSTRAETE, W., Advanced water treatment with manganese oxide for the removal of 17[alpha]-ethynylestradiol (EE2). *Water Research*, v.38, p.184-192, 2004.
- RUDEL, R. A., MELLY, S. J., GENO, P. W., SUN, G. & BRODY, J. G., Identification of alkylphenols and other estrogenic phenolic compounds in wastewater, septage, and groundwater on Cape Cod, Massachusetts. *Environmental Science & Technology*, v.32, p.861-869, 1998.
- SAARISTO, M., CRAFT, J. A., LEHTONEN, K. K., BJORK, H. & LINDSTROM, K., Disruption of sexual selection in sand gobies (*Pomatoschistus minutus*) by 17 alpha-ethinyl estradiol, an endocrine disruptor. *Hormones and Behavior*, v.55, p.530-537, 2009.

- SAKURAI, A., TOYODA, S. & SAKAKIBARA, M., Removal of bisphenol A by polymerization and precipitation method using *Coprinus cinereus* peroxidase. *Biotechnology Letters*, v.23, p.995-998, 2001.
- SALVADOR, A., MORETTON, C., PIRAM, A. & FAURE, R., On-line solid-phase extraction with on-support derivatization for high-sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry of estrogens in influent/effluent of wastewater treatment plants. *Journal of Chromatography A*, v.1145, p.102-109, 2007.
- SANCHEZ-AVILA, J., BONET, J., VELASCO, G. & LACORTE, S., Determination and occurrence of phthalates, alkylphenols, bisphenol A, PBDEs, PCBs and PAHs in an industrial sewage grid discharging to a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Science of the Total Environment*, v.407, p.4157-4167, 2009.
- SANTAMARTA, J. 2001 Ameaça dos disruptores endócrinos. *Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável*. Porto Alegre, v.2, n.3, julho/agosto.
- SCHOENE, K., BRUCKERT, H. J., STEINHANSES, J. & KONIG, A., 2-stage derivatization with n-(tert-butyldimethylsilyl)-n-methyl-trifluoroacetamide (mtbstfa) and n-methyl-bis-(trifluoroacetamide) (mbtfa) for the gas-chromatographic analysis of oh-compounds, sh-compounds and nh-compounds. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, v.348, p.364-370, 1994.
- SCHRODER, H. F., Tracing of surfactants in the biological wastewater treatment process and the identification of their metabolites by flow injection-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry and -tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.926, p.127-150, 2001.
- SEGNER, H., CAROLL, K., FENSKE, M., JANSSEN, C. R., MAACK, G., PASCOE, D., SCHAFERS, C., VANDENBERGH, G. F., WATTS, M. & WENZEL, A., Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.54, p.302-314, 2003.
- SHAO, B., HU, J. Y., YANG, M., AN, W. & TAO, S., Nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in river water, drinking water, and fish tissues in the area of Chongqing, China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v.48, p.467-473, 2005.

- SHAREEF, A., PARNIS, C. J., ANGOVE, M. J., WELLS, J. D. & JOHNSON, B. B., Suitability of N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide and N-(tert-butyltrimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide as derivatization reagents for the determination of the estrogens estrone and 17 alpha-ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1026, p.295-300, 2004.
- SLANETZ, L. W., BARTLEY C. H., Detection and sanitary significance of fecal streptococci in water. *American Journal Public Health*, v.54, p.609-614, 1964.
- SNYDER, S. A., KEITH, T. L., VERBRUGGE, D. A., SNYDER, E. M., GROSS, T. S., KANNAN, K. & GIESY, J. P., Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. *Environmental Science & Technology*, v.33, p.2814-2820, 1999.
- SOARES, A., GUIEYSSE, B. & MATTIASSON, B., Influence of agitation on the removal of nonylphenol by the white-rot fungi *Trametes versicolor* and *Bjerkandera sp BOL 13*. *Biotechnology Letters*, v.28, p.139-143, 2006.
- SOLE, M., DE ALDA, M. J. L., CASTILLO, M., PORTE, C., LADEGAARD-PEDERSEN, K. & BARCELO, D., Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalanian area (NE Spain). *Environmental Science & Technology*, v.34, p.5076-5083, 2000.
- STRECK, G., Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, v.28, p.635-652, 2009.
- STUART, J. D., CAPULONG, C. P., LAUNER, K.D., PAN, X. "Analyses of phenolic endocrine disrupting chemicals in marine samples by both gas and liquid chromatography-mass spectrometry" *Journal of Chromatography A*, v.1079, p.136-145, 2005.
- SUN, L., YONG, W., CHU, X. G. & LIN, J. M., Simultaneous determination of 15 steroidal oral contraceptives in water using solid-phase disk extraction followed by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.1216, p.5416-5423, 2009.

- TANIDA, T., WARITA, K., ISHIHARA, K., FUKUI, S., MITSUHASHI, T., SUGAWARA, T., TABUCHI, Y., NANMORI, T., QI, W. M., INAMOTO, T., YOKOYAMA, T., KITAGAWA, H. & HOSHI, N., Fetal and neonatal exposure to three typical environmental chemicals with different mechanisms of action: Mixed exposure to phenol, phthalate, and dioxin cancels the effects of sole exposure on mouse midbrain dopaminergic nuclei. *Toxicology Letters*, v.189, p.40-47, 2009.
- TERNES, T. A., STUMPF, M., MUELLER, J., HABERER, K., WILKEN, R. D. & SERVOS, M., Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of the Total Environment*, v.225, p.81-90, 1999.
- UNIÃO EUROPEIA 2009. Site oficial da União Européia. http://ec.europa.eu/environment/endocrine/definitions/index_en.htm acessado em 29/11/09)
- USEPA 1997 “Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis” U.S. Environmental Protection Agency, Report No. EPA/630/R-96/012, Washington DC.
- USEPA 2001 “Removal of Endocrine Disruptor Chemicals Using Drinking Water Treatment Processes.” U.S. Environmental Protection Agency. Report No. EPA/625/R-00/015, Washington DC.
- VESSMAN, J.; STEFAN, R. I.; STADEN, J. F. V.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D. T.; FAJGELJ, A.; MÜLLER, H., Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001) *Pure and Applied Chemistry*, v.73, p.1381-1386, 2001.
- VOM SAAL, F. S., COOKE, P. S., BUCHANAN, D. L., PALANZA, P., THAYER, K. A., NAGEL, S. C., PARMIGIANI, S. & WELSHONS, W. V., A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicology and Industrial Health*, v.14, p.239-260, 1998.
- WESTERHOFF, P., YOON, Y., SNYDER, S. & WERT, E., Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes. *Environmental Science & Technology*, v.39, p.6649-6663, 2005.

- WHO 2008 "Guidelines for Drinking-water Quality" World Health Organization. Third Edition Incorporating. The First And Second Addenda, volume 1, Geneva, 2008
- WOZNIAK, A. L., BULAYEVA, N. N. & WATSON, C. S., Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-mediated Ca²⁺ fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environmental Health Perspectives*, v.113, p.431-439, 2005.
- WU, J. M., HU, R. K., YUE, J. Q., YANG, Z. G. & ZHANG, L. F., Determination of fecal sterols by gas chromatography-mass spectrometry with solid-phase extraction and injection-port derivatization. *Journal of Chromatography A*, v.1216, p.1053-1058, 2009.
- YANG, L. H., LAN, C. Y., LIU, H. T., DONG, J. & LUAN, T. G., Full automation of solid-phase microextraction/on-fiber derivatization for simultaneous determination of endocrine-disrupting chemicals and steroid hormones by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.386, p.391-397, 2006.
- YING, G. G., KOOKANA, R. S., KUMAR, A. & MORTIMER, M., Occurrence and implications of estrogens and xenoestrogens in sewage effluents and receiving waters from South East Queensland. *Science of the Total Environment*, v.407, p.5147-5155, 2009.
- YOON, Y. M., WESTERHOFF, P., SNYDER, S. A. & ESPARZA, M., HPLC-fluorescence detection and adsorption of bisphenol A, 17 beta-estradiol, and 17 alpha-ethynyl estradiol on powdered activated carbon. *Water Research*, v.37, p.3530-3537, 2003.
- YOON, Y., WESTERHOFF, P., SNYDER, S. A., WERT, E. C. Nanofiltration and ultrafiltration of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products. *Journal of Membrane Science*, v.270, p.88-100, 2006.
- ZAFRA-GOMEZ, A., BALLESTEROS, O., NAVALON, A. & VILCHEZ, J. L., Determination of some endocrine disrupter chemicals in urban wastewater samples using liquid chromatography-mass spectrometry. *Microchemical Journal*, v.88, p.87-94, 2008.