

OCORRÊNCIA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS EMERGENTES (COE) E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA EM ÁGUAS SUPERFICIAIS
E TRATADAS DE CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ.

THAYANA PARANHOS PORTAL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
- UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
NOVEMBRO DE 2018

OCORRÊNCIA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS EMERGENTES (COE) E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA EM ÁGUAS SUPERFICIAIS
E TRATADAS DE CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ.

THAYANA PARANHOS PORTAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Naturais (Área de Concentração: Ciências Naturais; linha de pesquisa: Ciências Ambientais).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Canela

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

NOVEMBRO DE 2018

OCORRÊNCIA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS EMERGENTES (COE) E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA EM ÁGUAS SUPERFICIAIS
E TRATADAS DE CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ.

THAYANA PARANHOS PORTAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Naturais (Área de Concentração: Ciências Naturais; linha de pesquisa: Ciências Ambientais).

Aprovada em 26 de Novembro de 2018

Comissão Examinadora:

Prof. Dr Thiago Moreira de Rezende Araújo (IFF)

Prof. Dr Vicente de Paulo Santos de Oliveira (IFF)

Prof^a Dra Maria Raquel Garcia Vega (UENF)

Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Canela (UENF-LCQUI)

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

*Ao meu marido, Thiago, pelo carinho e apoio nos momentos mais difíceis. Com sua ajuda
consegui alcançar esse objetivo.*

Aos meus pais por me proporcionarem as condições para chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus que me deu essa oportunidade de crescer em todos os campos da minha vida. Foi uma experiência muito rica de aprendizagens profissionais, pessoais, além dos amigos que ganhei, tempo de convivência com o grupo de pesquisa que me proporcionou os melhores momentos da vida.

Eu agradeço muito à minha família, meu marido, pais e irmãos que estiveram comigo nos momentos mais difíceis, que entenderam e me incentivaram. Compreenderam nos momentos que precisei estar ausente, que se esforçaram para minimizar problemas para diminuir a carga de problemas para mim. Meu marido, Thiago, me fortaleceu quando precisei, sempre me dando toda a força, vestiu a minha camisa e ficou junto a todo instante, me deu todo o suporte que eu precisei, fez tudo o que foi possível para estar comigo, me incentivou, sofreu comigo e abriu mão de sair, se divertir para me fazer companhia. O apoio da minha família foi realmente o que me sustentou e possibilitou o alcance desse objetivo.

Aos meus tios, tias, avós, primos e ao pequeno Henrique que me acompanharam, que também compreenderam os momentos que precisei estar ausente, não foram poucos, mas que estavam sempre ali me dando a força que eu precisava. Amo muito toda a minha família, paterna e materna, vocês são incríveis.

Com certeza no laboratório 103 fiz os amigos mais maravilhosos da vida. Meu grupo de pesquisa é sensacional. Tenho muito carinho por vocês! Agradeço à Camila e Polyana que sem sombra de dúvidas vou levar para o resto da minha vida, elas me tiraram de cada desespero. Minhas duas irmãs acadêmicas. Gostaria de agradecer aos meus amigos, Rafael, Rodrigo, Isabela e Murilo que me acompanharam e por muitas vezes me fizeram sorrir, adoro a companhia de vocês. Também gostaria de agradecer ao Marcelo e à Juliana pelas palavras agradáveis sempre e carinho. Todos vocês tornaram essa etapa da minha vida mais agradável e repleta de momentos que não esquecerei jamais. Gostaria de agradecer a todos que passaram na minha vida no laboratório 103, a antiga geração e a nova que viveram tantos momentos comigo, não consigo citar nomes pois não gostaria de deixar ninguém de fora.

Mas é importante agradecer alguns amigos do grupo de pesquisa da antiga geração, como a Ruth, Glaucia, Samira, Damila e Michele. Além desses, a Monique e o Thiago que foram pessoas que me espelhei e que tanto me ajudaram no meu trabalho.

Gostaria de agradecer a minha orientadora, que me acompanhou por muitos anos na minha vida acadêmica e que me ensinou a ser a profissional que sou. Sempre defendendo seus alunos e fazendo tudo o que for possível para conseguirmos alcançar os nossos objetivos.

Minhas amigas Paula, Flávia, Giselle e Thatá, vocês são muito queridas, nada melhor do que estar cercada das pessoas mais maravilhosas. Vocês tinham que estar aqui, pessoas que trazem momentos bons que nos faz sentir bem. Sobretudo, a pirua...(Paulinha), minha irmã que sempre me passou várias dicas de comportamento com alunos em sala de aula, a partir de experiências vividas. Sempre recorro a ela.

Queria agradecer à Cibele e ao Murilo que me ajudaram a entender um pouco mais de estatística, contribuíram diretamente para o enriquecimento desse trabalho, além de serem muito amigos. Agradecimento ao técnico Marcelo, que salva todo mundo da química, sempre muito solícito, muito obrigada!

Um agradecimento a todos os professores e profissionais do LCQUI que contribuíram para esse momento, que estiveram fortes em muitos momentos de perrengue que passamos durante esse período. Que sempre acreditaram na educação como a nossa maior riqueza e que lutam para continuar a fazer pesquisa, mesmo nadando contra a maré, numa área de extrema importância e tão desvalorizada. Que ficaram sem receber e mesmo assim se empenharam em suas pesquisas e insistiram. Na dificuldade, aprendi o que é resistência com vocês e quero seguir o exemplo.

Que honra ter passado momentos tão agradáveis com vocês!!!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do diclofenaco	27
Figura 2: Estrutura química do 17- α -etinilestradiol	28
Figura 3: a) Estrutura do Triclosan b) Estrutura do T3, forma mais bioativa do hormônio produzido pela tireóide	30
Figura 4: Estrutura do 4-nonilfenol	31
Figura 5: Estrutura do Bisfenol A.....	33
Figura 6: Principais metabólitos da Atrazina. Fonte: adaptado de (BARCELLOS, 2016)	38
Figura 7: Estrutura da cafeína	39
Figura 8: Vias de aporte, transporte e destino de Compostos Orgânicos Emergentes no ambiente. Fonte: Adaptado de (CANELA et al., 2014)	40
Figura 9: Etapas de análise de COE, * DIC- detector de ionização em chama.....	44
Figura 10: Formados encontrados comercialmente para EFS e SPME. Fonte: Lanças, 2008.	52
Figura 11: Etapas do processo de extração em fase sólida.	53
Figura 12: Composição do sorbente dos cartuchos Oasis HLB.....	54
Figura 13: Diagrama de Polaridade x Volatilidade. Fonte: adaptado de Giger et al, 2009.	56
Figura 14: Reação de derivatização usando o BSTFA + TMCS	59
Figura 15: Figura geométrica gerada a partir de planejamentos compostos centrais: a) $k = 2$ e $\alpha = 1,414$, b) $k = 3$ e $\alpha = 1,682$. (●) planejamento fatorial, (■) pontos axiais e (□) ponto central.	63
Figura 16: Variáveis e Níveis do Planejamento fatorial	65
Figura 17: Sistema de Extração em Fase Sólida.....	66
Figura 18: Fluxograma com as etapas da Extração por SPE	68
Figura 19: Representação dos efeitos dos parâmetros avaliados	74
Figura 20: Probabilidade nos diferentes níveis apresentados.....	75
Figura 21: Intervalo de confiança para os valores dos efeitos. * C/pH – Efeito do cartucho e do ajuste de pH. **C – Efeito do cartucho.	76
Figura 22: Representação gráfica da significância das variáveis estudadas	78

Figura 23: a) Superfície de resposta gerada pelo modelo matemático quadrático: otimização das condições da reação de derivatização das variáveis (VD) e (PM) em função das respostas múltiplas normalizadas para as substâncias (EE2, NON, ATZ, TCS, SMZ, CAF e BPA); b) Zoom da superfície de resposta.	82
Figura 24: Representação gráfica das significâncias das variáveis estudadas no planejamento CCD.	82
Figura 25: Áreas médias dos compostos emergentes comparando forma derivatizada e não derivatizada.	83
Figura 26: Cromatograma dos compostos analisados.	85
Figura 27: a) Cromatograma e b) espectro de massas com o íon mais abundante da substância Bisfenol A.	86
Figura 28: a) Cromatograma e b) espectro de massas com o íon mais abundante da substância Bisfenol A deuterado (16 D)	86
Figura 29: a) Cromatograma da amostra bruta coroa campanha 7, apresentado o Bisfenol A e o surrogate Bisfenol A 16 D. e b) Espectro na amostra do composto bisfenol A 16 D e c) Espectro de massas do composto bisfenol A nas amostras brutas.	87
Figura 30: Resultados de precisão intermediária expresso em DPR para (n = 3).....	91
Figura 31: Resultado do ensaio de recuperação utilizando o método otimizado em água ultrapura (Tipo I) fortificada com os COE abordados nesse estudo.	92
Figura 32: Recuperação do Surrogate na concentração de 10 µg L ⁻¹ . Relativo aos pontos da curva N1, N3 e N7.	93
Figura 33: Mecanismo de ação dos (DEs) nos organismos. a) Efeito natural; b) Efeito agonista; c) Efeito antagonista. Fonte: Ghiselli e Jardim (2007)	96
Figura 34: Representação da resposta de atividade estrogênica das substâncias e hormônios. Fonte: DA SILVA, 2015.	99
Figura 35: a) Divisão das regiões Hidrográficas no estado do RJ; b) Principais formas de uso do solo no estado do RJ.	100
Figura 36: Mapa de Rios no Norte Fluminense RIO PARAÍBA DO SUL (azul) e ITABAPOANA (vermelho) (Adaptada de ANA, acessado dia 19/11/2018)	101
Figura 37: Ponte Alair Ferreira em Campos dos Goytacazes, ponto de coleta de água bruta.	105
Figura 38: Resultados da variação da concentração de cafeína em relação à pluviosidade do período amostral nos anos 2016 a 2018 no Rio Paraíba do Sul.	113

Figura 39: Resultados da variação da concentração de cafeína em relação à pluviosidade do período amostral nos anos 2016 a 2018 no Rio Paraíba do Sul.	114
Figura 40: Representação da frequência de detecção dos COE analisados em amostras brutas e tratadas nos Rios Paraíba do Sul e Itabapoana.	115
Figura 41: Placa de ensaio de 96 poços. Fileiras A e C referentes à curva de 17-β-estradiol em duplicata. Fileiras E e G referentes à amostra e as fileiras B, D, F e H são brancos.	118
Figura 42: Curva dose-resposta do controle positivo (17-β-estradiol) na faixa de concentração 1,330 a 2724 ng L ⁻¹	119
Figura 43: Curva dose-resposta do controle positivo para os compostos a) nonilfenol; b) 17-α-etinilestradiol e c) Bisfenol A.	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais classes de COE	25
Tabela 2: Propriedades físico-químicas dos pesticidas estudados	37
Tabela 3: Processos e taxas de remoção dos COE em ETE com tratamentos convencionais	41
Tabela 4: Lista de padrões utilizados no trabalho.....	64
Tabela 5: Condições avaliadas na otimização do método de extração.....	66
Tabela 6: Método SIM – íons selecionados para quantificação e confirmação após reação de derivatização	69
Tabela 7: Condições cromatográficas de análise	69
Tabela 8: Condições avaliadas na otimização da etapa de derivatização	71
Tabela 9: Matriz de dados do planejamento fatorial e resposta das recuperações.....	73
Tabela 10: Resultados para as variáveis avaliadas pelo planejamento fatorial 2 ³ para otimização do processo de extração	75
Tabela 11: Valores de m/z dos íons de quantificação e detecção dos analitos após reação de derivatização	77
Tabela 12: Matriz do Planejamento Composto Central com 2 variáveis:	79
Tabela 14: Parâmetros da curva analítica	89
Tabela 15: ETAs em Campos dos Goytacazes	102
Tabela 16: Locais de amostragem em Campos dos Goytacazes	103
Tabela 17: Gradiente de composição da fase móvel para análise de LC-ESI-MS/MS.	107
Tabela 18: Resultados dos COE em amostras de água Bruta dos Rios Paraíba do Sul e Itabapoana	110
Tabela 19: Resultados dos COE em amostras de água tratada das ETA Coroa e Sta Maria/Sto Eduardo referentes às fontes de captação Rios Paraíba do Sul e Itabapoana, respectivamente.....	110
Tabela 20: Parâmetros da Curva analítica para os compostos estudados	116
Tabela 21: Resultados das análises de GC-MS e LC-ESI_MS/MS referentes à sexta campanha	117
Tabela 22: Resultados para avaliação da melhor condições de envio das amostras para Ensaio YES.....	120
Tabela 23: Concentrações dos COE determinados por GC-MS em ng L ⁻¹ e os resultados do teste YES que apresentaram resultados para atividade estrogênica.....	122

SIGLAS, ABREVIações E SÍMBOLOS

ANA	Agência Nacional de Águas
ATZ	Atrazina
BPA	Bisfenol A
BSTFA	N,O-bis(Trimetilsilil) Trifluoroacetamida
BLYAS	Do inglês Bioluminescent Yeast Androgen Assay
BLYES	Do inglês Bioluminescent Yeast Estrogen Assay
CAF	Cafeína
CCL4	Do inglês Contaminant Candidate List
CE ₅₀	Concnetração efetiva média que causa a morte de 50% dos organismos no tempo de exposição
COE	Compostos Orgânicos Emergentes
CPRG	Clorofenol vermelho-β-D-Galactopiranosida
DAD	Do inglês Diode Array Detector
DEA	Deetilatrizina
DPR	Desvio Padrão Relativo
DESMA	Departamento de Saneamento e Meio Ambiente
DIA	Deisopropilatrazina
DLLME	Do inglês Dispersive Liquid-Liquid Microextraction
DLPME	Do inglês Dispersive Liquid Phase Microextraction
E2	17-β-estradiol
EE2	17-β-etinilestradiol
ECD	Do inglês Electron Capture Detector
ESI	Do inglês Eletrospray Ioniation

ETA	Estações de Tratamento de Água
ETE	Estações de Tratamento de Esgoto
EU	Do inglês European Union
GC-MS	Do inglês Gas Chromatography-Mass Spectrometry
IC	Intervalo de Confiança
JEA	Do inglês Japan Environmental Agency
K _{oc}	Coeficiente de partição água/octanol
LC-MS	Do inglês Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LC-MS/MS	Do inglês Liquid Chromatography-Mass Spectrometry tandem
LD	Limite de Detecção
LES	Laboratório de Engenharia Sanitária
LLE	Do inglês Liquid-Liquid Extraction
LOAEL	Do inglês Lowest Adverse Effects Level
LQ	Limite de Quantificação
MRM	Do inglês, Multiple Reaction Monitoring
NON	Nonilfenol
OMS	Organização Mundial da Saúde
OSPAR	Do inglês Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic
Q _q Q	
REh	Receptor de Estrogênio Humano
RI	Rio Itabapoana
RPS	Rio Paraíba do Sul
SIM	Do inglês Selective Ion Monitoring
SPE	Do inglês Solid Phase Extraction

SMZ	Simazina
TCS	Triclosan
USEPA	Do inglês United States Environmental Protection Agency
UKEA	Do inglês United Kingdom Environmental Agency
WWF	Do inglês World Wide Fund for Nature
YAS	Do inglês Yeast Androgen-inducible Expression System
YES	Do inglês Yeast Estrogen-inducible Expression System

SUMÁRIO

RESUMO	18
ABSTRACT	19
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E DEFINIÇÃO DE COMPOSTOS EMERGENTES	20
1.1 INTRODUÇÃO.....	20
1.2 OBJETIVOS PRINCIPAIS E ESPECÍFICOS.....	23
1.3 COMPOSTOS ORGÂNICOS EMERGENTES.....	24
1.3.1 Definição e principais COE encontrados em ambientes naturais.....	24
1.3.2 Destino dos COE no ambiente.....	40
CAPÍTULO 2: METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE COE EM MATRIZES AQUOSAS	47
2.1 Análise de COE: Breve histórico.....	47
2.2 Preparação de amostras.....	51
2.2.1 Coleta, preservação e filtração de amostras.....	46
2.2.2 Técnicas de preparação de amostras (Extração e concentração de COE).....	50
2.3 Detectores para determinação de COE.....	55
2.4 Derivatização.....	59
2.5 Planejamento de experimentos.....	60
2.6 Materiais e métodos.....	63
2.6.1 Equipamentos utilizados na pesquisa.....	63
2.6.2 Reagentes e soluções.....	64
2.6.3 Otimização da metodologia para SPE.....	65
2.6.4 Curva analítica em fase aquosa.....	70
2.6.5 Otimização da etapa de derivatização.....	70
2.7 Resultados e discussão.....	72
2.7.1 Otimização da metodologia para SPE usando Planejamento Fatorial 2 ³	72
2.7.2 Otimização da etapa de derivatização.....	72
2.7.3 Validação da metodologia.....	84
CAPÍTULO 3: PRESENÇA DOS COE EM AMBIENTES AQUÁTICOS E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE	94
3.1 Ocorrência de Compostos Orgânicos Emergentes em águas naturais.....	94

3.2 Efeitos à saúde humana e avaliação da atividade estrogênica.....	95
3.3 Mananciais de abastecimento e sistemas de tratamento de água em Campos dos Goytacazes.....	99
3.4 Materiais e métodos.....	103
3.4.1 Amostragem, preservação, preparação da amostra e determinação dos COE nas amostras de água superficial e tratada.....	103
3.4.2 A avaliação da estrogenicidade por meio do ensaio YES.....	107
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	108
3.5.1 Avaliação da presença de Compostos Orgânicos Emergentes em águas superficiais e tratadas.....	108
3.5.2 Avaliação da atividade estrogênica das amostras.....	118
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	124
5 REFERÊNCIAS.....	126
APÊNDICE.....	142

RESUMO

Título: Ocorrência de Compostos Orgânicos Emergentes (COE) e avaliação da atividade estrogênica em águas superficiais e tratadas de Campos dos Goytacazes, RJ.

Autora: Thayana Paranhos Portal

Orientadora: Maria Cristina Canela

Palavras Chaves: contaminação, compostos emergentes, águas superficiais e tratadas, atividade estrogênica.

Os Rios Paraíba do Sul e Itabapoana são importantes mananciais que cortam as regiões do Norte Fluminense, passando por áreas de atividades agrícolas, urbanas e industriais. O crescimento populacional acompanhado das atividades antrópicas tem resultado em um aumento da demanda de produtos industrializados, principalmente por compostos orgânicos emergentes que tem como principal destino final, os mananciais hídricos. A contaminação destes ambientes ocorre através da falta de saneamento básico e descarte sem tratamento de águas residuais e atividades desenvolvidas nas margens destes corpos hídricos, refletindo na qualidade da água captada para distribuição da população. Nesse sentido, esse estudo busca avaliar a presença de importantes compostos orgânicos (nonilfenol, atrazina, simazina, bisfenol A, 17-etinilestradiol, cafeína e triclosan) que apresentam maior ocorrência em águas naturais e representam maior impacto para o ambiente e/ou saúde humana. Esses compostos incluem fármacos, hormônios, agrotóxicos e contaminantes industriais. Para o monitoramento desses compostos orgânicos foi usada a técnica de Extração em Fase Sólida (SPE do inglês *Solid Phase Extraction*) e para análise, a Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS do inglês *Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry*). As amostras foram submetidas ao Teste de estrogenicidade YES para avaliar se pode haver risco no consumo desses compostos para a saúde humana. Os resultados mostraram que todos os compostos analisados foram detectados em pelo menos uma amostra, onde os mais frequentemente detectados foram Cafeína (75,0%), Nonilfenol (78,6%) e Bisfenol A (78,6%). A cafeína (marcador químico de contaminação por esgoto) apresentou concentrações variando entre (76,7 a 1.781,8 ng L⁻¹). Com relação à atividade estrogênica, em 83% de amostras brutas do Rio Paraíba do Sul observou-se atividade estrogênica positiva com valores que variaram de 0,3 a 3,5 EQ E2 ng L⁻¹. Em alguns casos, foram identificados valores maiores de potencial estrogênico em amostras de águas tratadas do que nas brutas, o qual pode estar relacionado à formação de subprodutos durante a etapa de desinfecção nas ETA. Sendo assim, este trabalho apresenta a alta ocorrência de compostos não legislados em águas de mananciais que não são eficientemente removidos após o tratamento e fazem da água potável, uma água que não está totalmente livre de contaminantes químicos.

ABSTRACT

Title: Occurrence of Emerging Organic Compounds (EOC) and analysis of estrogenic activity in drinking and surface water in Campos dos Goytacazes, RJ

Author: Thayana Paranhos Portal

Supervisor: Maria Cristina Canela

Key-words: contamination, emerging compounds, surface and drinking water and estrogenic activity.

The Paraíba do Sul and Itabapoana rivers are important supplies of water that pass through the north of the state of Rio de Janeiro. In your margins are developed agricultural, urban and industrial activities. The population growth and the anthropogenic interference has resulted in increase demand for industrialized products, mainly for emerging organic compounds. These contaminants are often released in aquatic environments. The contamination of this environments occurs because of the lack of basic sanitation and disposal of effluent without treatment and others activities developed near these aquatic environments, reflecting on the quality of the water offered for distribution of the population. Thus, this study aims to evaluate the presence of important organic compounds (4-nonylphenol, atrazine, simazine, bisphenol A, 17- α -ethynylestradiol, caffeine and triclosan) those that had highest occurrence in natural waters and represent greater impact to the environment and/or human health. These compounds include pharmaceuticals, hormones, pesticides and industrial contaminants. For monitoring the presence of these compounds were used the Solid Phase Extraction (SPE) and Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS). The estrogenic activity was available using YES test in the samples to evaluate the impact of the consumption of these compounds in human health. The results showed that all compounds analysed were detected in at least one sample. The most frequently detected substances were caffeine (75,0%), nonylphenol (78,6%) and bisphenol A (78,6%). Caffeine (chemical tracer of sewage contamination) presents concentrations varying between (76,6 to 1781,8 ng L⁻¹). The samples submitted to the estrogenic activity test presents the Paraíba do Sul presents 83% of the raw water samples with positive estrogenic activity varying (0,3 to 3,5 EQ E2 ng L⁻¹). Higher estrogenic potentials were identified for treated water samples than raw samples, this effect can be related to the formation of by-products during the disinfection process in wastewater treatment.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E DEFINIÇÃO DE COMPOSTOS EMERGENTES

1.1 INTRODUÇÃO

A intensa utilização de compostos orgânicos através do consumo de produtos sintéticos pela sociedade moderna e a crescente demanda de água tem contribuído para a geração de grandes volumes de efluentes e inserção desses contaminantes em águas superficiais. Somente no século 20 foram inseridos 10^5 compostos químicos, de uso rotineiro, que possuem diferentes propósitos em residências, indústrias e agricultura. Esses compostos, geralmente tem origem antrópica e incluem fármacos, agrotóxicos, hormônios e contaminantes industriais (LAPSWORTH et al, 2012; PRIMEL *et al*, 2012).

A maioria das investigações tradicionais de qualidade de água ocorre baseada em análise de nutrientes, metais, micro-organismos e alguns poucos compostos orgânicos. No entanto, estudos recentes revelaram a ocorrência de centenas de contaminantes orgânicos em águas residuais que representam uma ameaça para o ecossistema após serem descartados nos corpos hídricos. (MOREIRA et al., 2009; BAI et al., 2018; GOGOI et al., 2018).

Esses contaminantes orgânicos, conhecidos como emergentes (COE), pertencem a diversas classes químicas, tem várias utilizações (hormônios, produtos de cuidado pessoal, fármacos e surfactantes) e são detectados em níveis traços de concentração em águas superficiais e subterrâneas. Muitos deles, até pouco tempo negligenciados, têm sido detectados com frequência nos corpos aquáticos e apresentam efeitos adversos na saúde humana e ao ambiente, tornando-se uma preocupação pública (JURADO et al, 2012, REEMTSMA et al, 2013; SILVEIRA et al, 2013; AMUNOL e SNYDER, 2015).

A exposição crônica a esses contaminantes em águas, tem seus efeitos muito pouco conhecidos a saúde, embora tem sido associada ao desenvolvimento de resistência à antibióticos, interferência endócrina e carcinogenicidade (CUNNINGHAM; BINKS; OLSON, 2009; FONTENELE et al., 2010; BRAUSCH; RAND, 2011). Os interferentes endócrinos têm ganhado destaque devido aos seus efeitos nocivos à saúde humana, tais como alterações no metabolismo, crescimento, desenvolvimento e na reprodução de organismos. Esses efeitos podem ser associados a redução da fertilidade,

feminização anomalias nos órgãos reprodutivos e alterações nos comportamentos sexuais de organismos aquáticos tais como anfíbios, algas, peixes e organismos bênticos (ESTEBAN et al, 2014).

Nesse sentido, testes biológicos *in vitro* e *in vivo* têm sido usados para identificar e estimar o potencial estrogênico dos desreguladores endócrinos de uma grande variedade de substâncias naturais e sintéticas presentes no ambiente, atrelados à análises químicas (PETROVIC et al., 2004; FONTENELE et al., 2010; DA SILVA, 2015). Com relação à exposição humana, atenção deve ser dada à presença desses contaminantes em águas superficiais e tratada. Trabalhos relatam a presença desses compostos em diferentes matrizes ambientais, incluindo águas destinadas ao abastecimento público (RAIMUNDO, 2011; MACHADO, 2015; MAGI et al., 2018; RIVA et al., 2018).

As principais rotas de contaminação das águas superficiais por esses compostos são sistemas de tratamento de águas residuais, águas residuais de processos industriais e hospitalares, descarga de resíduos sólidos, além de escoamento das águas das chuvas que carregam contaminantes para esses corpos aquáticos (BUCHBERGER, 2007).

Em países em desenvolvimento, como o Brasil, essa questão é ainda mais alarmante em virtude da carência dos serviços de tratamento de esgoto. A população brasileira, com cerca de 209 milhões de habitantes (IBGE, 2018), se concentra nas áreas urbanas, resultando em uma ocupação de solo desordenada atrelada à infraestrutura inadequada. Segundo o Relatório de Conjuntura de Recursos Hídricos de 2016 da ANA (Agência Nacional de Águas), o Brasil possui 4,5% (83.450 km) dos cursos de águas classificados como classe quatro, ou seja, com uso muito restrito e os trechos mais críticos estão próximos a centros urbanos (ANA, 2016). Ainda segundo a ANA, 55 % da população brasileira tem esgoto tratado, 18% tem o esgoto coletado, porém, não tratado e 27% não possui coleta e tratamento. Ou seja, aproximadamente 45% de esgoto gerado não recebe o tratamento adequado antes de ser retornado ao ambiente, impactando na qualidade das águas dos mananciais.

Além dos fatores mencionados acima, estudos mostram que os processos convencionais de tratamento de esgoto e água, não são eficientes na remoção de compostos orgânicos. A baixa remoção pode ocorrer de forma parcial dependendo das condições operacionais envolvidas no tratamento, aumentando a probabilidade de

contaminação residual na água tratada (KÖRNER et al., 2000; WANG et al., 2005; MOREIRA et al., 2009).

Os Rios Paraíba do Sul e Itabapoana fazem parte da região hidrográfica do Atlântico Sudeste que é composta por cinco unidades federativas: Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná. Esta é uma das mais expressivas regiões hidrográficas do país, a segunda mais populosa e uma das mais desenvolvidas no sentido de atividades econômicas e industriais que se desenvolvem em suas margens (AGEVAP, 2006).

O aumento no interesse pelo estudo dos contaminantes emergentes com fins de pesquisa e regulamentação, principalmente na região onde existe histórico de carga poluente, torna necessária a coleta de mais informações a respeito da ocorrência desses contaminantes em águas naturais e tratadas, inclusive associada ao estudo da toxicidade. Portanto, o grande desafio do estudo desses compostos é buscar uma metodologia sensível e adequada para a determinação desses compostos que pertencem a distintas classes de substâncias, possuindo diferentes características, e em baixos níveis de concentração como ocorrem nas águas naturais e tratadas (VALSECCHI et al., 2015).

Nesse sentido, esse trabalho faz uma avaliação da presença desses contaminantes em importantes corpos hídricos de onde são feitas captações de água para abastecimento público de água do município de Campos dos Goytacazes. Importantes atividades agrícolas e industriais se desenvolvem nas margens desses mananciais, além de despejos diretos e águas residuais das ETE (Estações de Tratamento de Esgoto) que são retornadas para esses rios, apresentando risco potencial para o ambiente.

Com relação à saúde humana, a avaliação da presença desses contaminantes será feita também em águas tratadas, para avaliação da eficiência da remoção desses compostos nas principais ETA (Estações de Tratamento de Água), responsáveis pelo abastecimento da maior parte da população da região. Estas ETA utilizam o tratamento convencional durante as etapas de tratamento da água. O teste YES, que avalia a estrogenicidade da amostra, será usado como um teste direto para avaliar a toxicidade destes compostos e, portanto, o risco associado à saúde humana e ao ecossistema aquático com respeito a sua capacidade estrogênica.

1.2 OBJETIVOS PRINCIPAIS E ESPECÍFICOS

O objetivo principal desse trabalho é verificar a presença de COE na água dos mananciais que abastecem a companhia de tratamento de água em Campos dos Goytacazes e a sua influência na água tratada após tratamento convencional.

Para tal, alguns objetivos específicos são:

- Desenvolver e otimizar metodologia para a quantificação dos COE: Atrazina, Simazina, Cafeína, Triclosan, Bisfenol A, 4-Nonilfenol e 17- β -Ethinilestradiol em concentrações compatíveis com os encontrados em ambientes naturais, usando extração em fase Sólida e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas;
- Utilizar o planejamento fatorial para otimização do protocolo de derivatização dos compostos estudados;
- Realizar uma avaliação da presença destes COE nas águas para abastecimento público das principais estações de tratamento de água da região de Campos dos Goytacazes;
- Analisar a atividade estrogênica das amostras de água por meio do ensaio YES (do inglês *Yeast estrogen-inducible Expression System*) visando avaliar os efeitos destes contaminantes nos organismos vivos.

1.3 COMPOSTOS ORGÂNICOS EMERGENTES

1.3.1 Definição e principais COE encontrados em ambientes naturais

Produtos de cuidado pessoal, fármacos, produtos da indústria química e muitos outros compostos orgânicos sintéticos tem revolucionado a vida moderna e seu uso é indispensável para uma vida saudável e para o conforto da sociedade contemporânea. No entanto, nos últimos anos, esses compostos têm sido detectados nos diferentes compartimentos ambientais em concentrações traço ou ultra-traços (ANUMOL; SNYDER, 2015; BOIX et al., 2016; GOGOI et al., 2018; RIVA et al., 2018).

Esses compostos são lançados no ambiente com frequência, à uma taxa ligeiramente crescente. Persistentes ou não, eles podem apresentar efeitos negativos nos ecossistemas devido a sua ação e presença crônica (TAHERAN et al., 2018). Essas substâncias têm sido denominadas como compostos emergentes e a maioria delas são contaminantes, tendo como um dos principais efeitos, a interferência no sistema endócrino, sendo que alguns estão na lista de compostos prioritários criada pela União Europeia para serem monitorados devido aos riscos à saúde humana e ao ambiente (Directive 2000/60/EC).

Dessa forma, a definição de Compostos Orgânicos Emergentes (COE) ou Contaminantes Emergentes de Preocupação Emergente, segundo a USEPA (do inglês *United States Environmental Protection Agency*), é um termo usado para identificar substâncias químicas que não possui norma regulamentar, foram recentemente detectados em águas devido a melhoria nos níveis de detecção da técnica analítica, e que apresentam efeitos potencialmente deletérios na vida aquática (USEPA, 2014).

Vários compostos sintéticos ou naturais, como os compostos listados na **tabela 1** apresentam atividade estrogênica conhecida como interferentes endócrinos (fármacos, pesticidas, metais tóxicos e compostos gerados pela indústria química) (GIESY et al, 2002). Diante das diversas características destes compostos que participam dessa classe de contaminantes, serão abordados aqueles que apresentam efeitos tóxicos, largamente utilizados no dia-a-dia e fazem parte de listas de poluentes prioritários.

Tabela 1: Principais classes de COE

Classe	Analito
Fármacos e produtos de cuidado pessoal	Paracetamol
	Amoxicilina
	Ácido acetilsalicílico
	Diclofenaco
	DEET
	Eritromicina
	Ibuprofeno
	Fluoxetina
	Diazepam
	Parabenos
	Triclosan
	Almíscares
	Propranolol
Produtos da indústria química	Retardantes de chama
	Alquilfenóis
	Ftalatos
	Bisfenol A
	Dioxinas e furanos
	Hidrocarbonetos Poliaromáticos (HPA)
	Nanomateriais
	Metais tóxicos
	Fragrâncias almíscares
Hormônios naturais e sintéticos	17- β -estradiol
	17- β -etinilestradiol
	Progesterona
	Testosterona
	Estrona
	Desogestrel
Agrotóxicos	Atrazina
	Clordano
	Dieldrin
	Hexaclorobenzeno
	Glifosato
	Diuron
	Paraoxon

- Fármacos e hormônios

Os fármacos são comercializados para tratar e curar doenças, além de melhorar e aumentar a qualidade de vida. Associado ao uso desses produtos existe o risco potencial do princípio ativo e seus metabólitos entrarem no ambiente através do uso e posterior descarte. Após a administração, uma quantidade significativa das substâncias originais e metabólitos são excretados na urina e nas fezes, sendo frequentemente encontradas no esgoto doméstico. Além disso, estudos apontam que esses contaminantes podem ser persistentes no ambiente, além de que muitos não são totalmente removidos nas ETE (Estações de Tratamento de Esgoto), tendo dessa forma, a sua reinserção nos corpos hídricos (BILA; DEZOTTI, 2003; KAPELEWSKA et al., 2018).

Atualmente, os fármacos é uma das classes de contaminantes emergentes mais estudadas do mundo, em virtude de serem compostos biologicamente ativos e tem se destacado por promoverem aumento na resistência de bactérias. Os produtos farmacêuticos incluem uma ampla variedade de moléculas com diferentes funcionalidades, as quais são consumidas com ou sem prescrição médica, de uso humano e veterinário, incluindo analgésicos, antibióticos, drogas de uso psiquiátrico, reguladores lipídicos, β -bloqueadores, contraceptivos (GOGOI et al., 2018).

No mundo, o consumo de fármacos tem aumentado consideravelmente, em países desenvolvidos. Na Alemanha, o consumo chega a 100 toneladas por ano. Essa quantidade deve ser ainda maior, pois esses dados não consideram os fármacos sem prescrição médica ou adquiridos ilegalmente. O cenário no Brasil deve ser avaliado com a mesma relevância uma vez que o país está entre os 10 maiores consumidores mundiais de medicamentos (TERNES et al, 2002; GRAZIELE; COLLINS, 2011; MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017). A resistência a antimicrobianos tem ganhado destaque e em 2016 a Organização Mundial de Saúde (OMS) emitiu um alerta visando minimizar estes efeitos através de ações para promoção de melhores práticas para evitar a disseminação da resistência aos antibióticos em vários países. Uma dessas ações envolve uma abordagem padronizada para a coleta e compartilhamento de dados relacionados à resistência antimicrobiana em nível global para informar as tomadas de decisão e impulsionar ações locais e regionais. (WHO, 2018).

Neste trabalho foi estudado o diclofenaco (**Figura 1**). Este fármaco é um anti-inflamatório não esteroideal que é largamente utilizado para inflamações e alívio de dores, inclusive sem prescrição médica. Ele é um dos medicamentos mais vendidos no Brasil e tem sido detectado em ambientes naturais como esgoto e águas superficiais (GHELFI, 2014). Em trabalhos realizados em países europeus, o diclofenaco foi encontrado em concentrações entre 10 a 2200 ng L⁻¹ (ISLAS-FLORES et al., 2013).

No Brasil, no estudo realizado por Ghiselli (2011) foram encontradas concentrações desse fármaco de até 6 µg L⁻¹ em águas superficiais e em esgoto bruto de 2,87 µg L⁻¹.

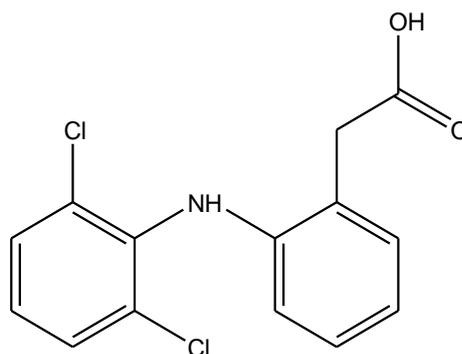


Figura 1: Estrutura química do diclofenaco

Estudos toxicológicos com exposição de peixes na espécie Jundiá, *Rhamdia quelen* mostraram que quando submetidos a concentrações de diclofenaco, próximas àquelas encontradas no ambiente, estes organismos apresentam alterações hepáticas e genéticas (GHELFI A., 2014).

Alguns fármacos têm como princípio ativo os hormônios, principalmente contraceptivos, medicamentos para terapias de reposição hormonal e tratamento de neoplasias. Os hormônios são substâncias produzidas e secretadas pelas glândulas endócrinas lançadas na corrente sanguínea, coordenando o funcionamento de todo o corpo (SHIMADA et al, 2001). Esses compostos foram modificados e criados com o intuito de agirem no sistema endócrino apresentando, portanto, alto potencial estrogênico.

A concentração de hormônios sintéticos ou naturais em vários tipos de ambientes aquáticos geralmente está abaixo de 10 ng L⁻¹, segundo um levantamento realizado por Petrovic e colaboradores (2003). O 17- α -etinilestradiol (**Figura 2**) é um hormônio sintético usado em contraceptivos e possui 30 vezes mais potencial estrogênico que o hormônio natural estradiol. Ele é considerado um interferente endócrino e pode causar a

feminização de peixe, diminuição da quantidade de esperma e aumento na incidência de câncer de mama e testículo em humanos (WISE et al, 2011).

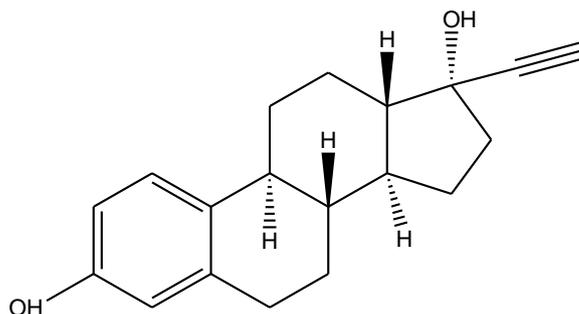


Figura 2: Estrutura química do 17- α -etinilestradiol

Os hormônios têm coeficiente de partição octanol-água na faixa de 10^3 a 10^6 , indicando serem pouco polares. Dessa forma, esses estrogênios quando inseridos no ambiente aquático tendem a ficar adsorvidos no leito dos sedimentos. Outra consequência da baixa polaridade desses compostos consiste no fato de se bioacumularem nos organismos aquáticos. No estudo realizado por Larsson e colaboradores (1999) observou-se a presença de substâncias estrogênicas em concentrações de 10^4 - 10^6 vezes maior em bÍlis de peixes presentes à jusante de uma estação de tratamento de esgoto que na água, devido à presença desse tipo de contaminante. Foi constatado nesse trabalho que o estrogênio sintético etinilestradiol apresentava alta estabilidade em ambientes aquáticos. Apesar das baixas concentrações não representarem uma ameaça imediata à saúde humana, o efeito de bioacumulação e a alta atividade biológica pode ser um risco para o ecossistema e à saúde humana.

- Produtos de Cuidado Pessoal

Outra classe de contaminantes que tem se destacado são os produtos de cuidado pessoal que se constituem compostos presentes em sabonetes, produtos de cuidado da pele, loções, fragrâncias, pastas de dentes e substâncias antimicrobianas (POSTIGO; BARCELÓ, 2015). Alguns produtos de cuidado pessoal se bioacumulam no ambiente, são persistentes e muitos deles estão sob investigação por serem biologicamente ativos (interferentes endócrinos) (BRAUSCH; RAND, 2011). O uso contínuo destes compostos e seus metabólitos faz com que sejam inseridos no ambiente e facilmente encontrados em águas superficiais devido ao aporte de esgoto não tratado (LEE; LEE; OH, 2010).

O triclosan (**Figura 3**) é um exemplo de produto de cuidado pessoal e é um antimicrobiano presente em sabonetes, desodorantes, cremes dentais, hidratantes e plásticos. Esse composto se constitui em um dos 10 compostos mais comumente detectados em águas residuais e é considerado estável e lipofílico, bioacumulando-se no ambiente e sendo tóxico para organismos aquáticos devido à exposição aguda ou crônica (BRAUSCH; RAND, 2011).

Segundo a Diretiva 76/768/CEE e suas alterações subsequentes, o uso de triclosan em produtos de cuidado pessoal não deve ultrapassar a concentração de 0,30% (m/m). Devido a sua larga utilização e por apresentar características lipofílicas, a presença desse contaminante tem sido cada vez mais detectada no ambiente e no corpo humano, como em amostras de sangue e leite materno (NOGUEIRA, 2008; GRAZIELI; COLLINS, 2011).

Segundo um levantamento de trabalhos na Europa e América feito por Veldhoen e colaboradores (2006) relacionados ao estudo de triclosan, esse composto tem sido detectado em concentrações de 0,01 a 0,65 $\mu\text{g L}^{-1}$ em efluentes de ETE e de 4 a 12 $\mu\text{g g}^{-1}$ em lodo proveniente de estações de tratamento.

Com relação à toxicidade, existem estudos que associam baixas concentrações desse contaminante a distúrbios metabólicos e na homeostase hormonal (ALLMYR et al, 2006). O triclosan apresenta uma estrutura semelhante ao hormônio da tireóide (**Figura 3**), podendo perturbar as funções que envolvem o crescimento e desenvolvimento tanto em humanos quanto em animais associada a ação desse hormônio.

O hormônio da tireóide é produzido como tiroxina (T4) e posteriormente convertido a 3,5,3'-triiodotironina (T3), sua forma mais bioativa. No estudo realizado por Veldhoen e colaboradores apontam que o T3 (3,5,3'-triiodotironina) é útil como biomarcador e apresenta alta sensibilidade para detecção de exposição à agentes químicos, tal como o triclosan, devido à similaridade estrutural, representando um desregulador do desenvolvimento normal envolvendo a ação do hormônio da tireóide em animais e humanos. Especificamente em organismos aquáticos, o triclosan tem a capacidade de bioacumular em peixes em concentrações subletais e ser tóxico às espécies *Oryzias latipes*, *Oncorhynchus mykiss*, no crustáceo *Ceriodaphia dubia* e em algas (VELDHOEN et al., 2007).

Com relação à exposição humana, um estudo realizado por Adolfsson-Erici e colaboradores (2002) mostrou a presença desse agente antimicrobiano em amostras de

leite humano na faixa de concentração de 60 a 300 ng g⁻¹ de peso úmido lipídico. Esse trabalho também apresentou resultados de persistência desse composto aos processos de tratamento da ETE (Estação de Tratamento de Esgoto), mostrando a sua reinserção em ambientes naturais e estando potencialmente biodisponível para bioacumulação em organismos aquáticos.

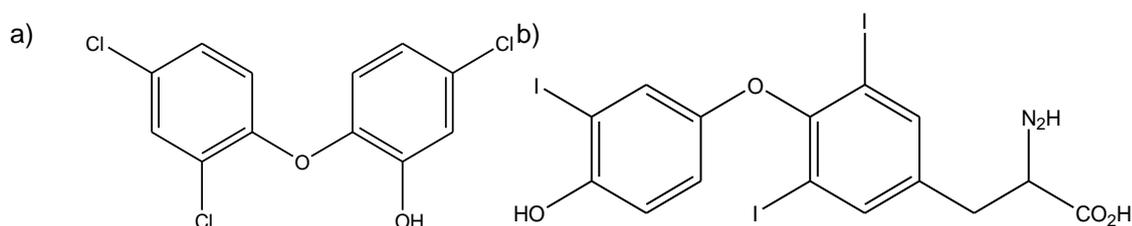


Figura 3: a) Estrutura do Triclosan b) Estrutura do T3, forma mais bioativa do hormônio produzido pela tireóide

Fonte: Adaptado de Veldhoen et al, 2006

- Alquilfenóis Etoxilados

Os compostos alquilfenóis etoxilados pertencem à classe dos surfactantes não iônicos e apresentam aplicações em diversos setores da indústria como em produtos de limpeza, detergentes, emulsificantes, dispersantes, formulações de agrotóxicos, óleos lubrificantes, agentes solubilizadores, assim como nos produtos de higiene pessoal. Em escala global, a maior participação de sua aplicação é na indústria e comércio (LINTELMANN et al., 2003). Em 2012, o mercado mundial de surfactantes atingiu cerca de 26,9 bilhões de dólares, cujo mercado de tensoativos representa 34% do mercado global (BAIN & COMPANY, 2011)

Os compostos alquilfenólicos, principalmente os nonilfenóis e octilfenóis e seus produtos de degradação, é um grupo de interesse devido a frequência com que tem sido detectado no ambiente e sua toxicidade. Quando lançados no ambiente ou nos processos primários nas ETE, são biodegradados a produtos mais tóxicos e persistentes do que seus produtos de origem (YING; WILLIAMS; KOOKANA, 2002).

Com relação à sua toxicidade, estudos mostram que os alquilfenóis etoxilados e seus produtos de degradação mimetizam os estrogênios naturais e interferem no sistema endócrino de muitas espécies aquáticas, interagindo com o receptor do hormônio e bloqueando a ação do hormônio original, além da capacidade de se bioacumularem nesses organismos (LAWS, 2000; JOBLING et al., 2006; LI; JIN; SNYDER, 2018). Devido

a esses efeitos tóxicos, esses compostos foram listados como poluentes prioritários de interferência endócrina na água pelos órgãos internacionais *Water Framework Directive* da União Europeia (Framework Directive EU, 2008), pela Agência de Proteção Ambiental do Canadá (CANADA, 1999) e pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos na CCL4 (do inglês *Contaminant Candidate List*) (EPA, 2016).

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram o composto para-Nonilfenol ou 4-nonilfenol apresenta atividade estrogênica, competindo com o hormônio natural 17- β -estradiol. Esses efeitos tem sido relatados associados a indução da síntese de receptores de estrogênio e progesterona, causando proliferação de células de câncer de mama, apresentando efeito de indução do receptor de estrogênio e progesterona (SOTO et al., 1991).

Diante disso, a produção, comércio e uso desses tipos de surfactantes têm sido restringidos pela comunidade Europeia e na Convenção OSPAR. A convenção para a Proteção do Ambiente Marinho do Atlântico Nordeste, Convenção OSPAR, foi realizada visando a implementação da PARCOM *Recommendation*, que é uma série de tomadas de decisões visando a redução e substituição de produtos que utilizam compostos alquilfenólicos etoxilados. (OSPAR Commission, 2006; *Framework Directive* EU, 2008).

O nonilfenol (**Figura 4**) tem sido detectado em amostras de diferentes matrizes aquosas, sedimentos e lodos provenientes de ETE. De acordo com estudo realizado por Kolpin e colaboradores (2002), para reconhecimento conduzido pelo serviço geológico dos Estados Unidos, foram investigados 139 córregos susceptíveis de contaminação durante os anos de 1999 e 2000. O nonilfenol foi detectado com uma frequência de 50,6%, nos quais as concentrações média e máxima foram de 0,8 e 40 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

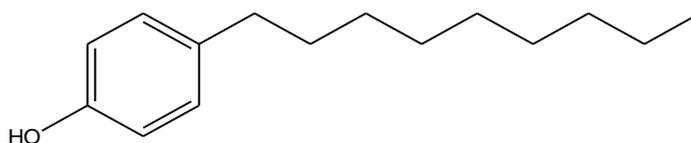


Figura 4: Estrutura do 4-nonilfenol

- Plastificantes

Os plastificantes são compostos que aumentam a plasticidade de materiais envolvidos em produtos de embalagem, resinas de epóxi (presentes em revestimentos de latas de alimentos e bebidas), papéis de impressão térmica, fabricação de celulares, recipientes plásticos para acondicionamento de alimentos, vedantes para cremes dentais, entre muitos outros usos (WILKINSON et al., 2017).

O bisfenol A (**Figura 5**) é uma substância química de alto volume de produção usado em uma variedade de produtos de uso comum no cotidiano e um dos compostos mais estudados em matrizes ambientais (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017). As formas de exposição ao bisfenol A podem ocorrer via inalação, ingestão e contato dérmico. Em centros de controle e prevenção de doenças dos Estados Unidos, o bisfenol A tem sido identificado em mais de 90% de amostras de urina da população (SIRACUSA et al., 2018).

Muitos estudos têm sido conduzidos no sentido de avaliar seus efeitos tóxicos para os seres humanos. Esses trabalhos mostraram que o bisfenol A apresenta efeitos como interferente endócrino em vários tipos de receptores tais como do estrogênio α/β , relacionado ao estrogênio γ , receptor andrógeno e do hormônio da tireóide (GOULD et al., 1998; OKADA et al., 2008; DONG; TERASAKA; KIYAMA, 2011).

Estudos associam a exposição ao bisfenol A aos efeitos negativos na qualidade e maturação dos oócitos (células que por meio de divisões meióticas dão origem ao óvulo), redução da produção de esperma e de sua qualidade, danos às células testiculares e interferência nas funções ovulares e na morfologia uterina de animais modelos (LASSEN et al., 2014; LEE et al., 2014; GOLDSTONE et al., 2015).

No trabalho realizado por Peretz e colaboradores (2014) foi realizada uma revisão dos estudos associando bisfenol A aos efeitos adversos no sistema reprodutivo. O autor concluiu que doses abaixo de LOAEL (do inglês, *lowest adverse effects level*) de 50 mg kg⁻¹ dia⁻¹ impacta no sistema reprodutivo feminino e tem efeitos negativos no sistema masculino reprodutor. Além dos danos ao sistema reprodutivo também são associados outros distúrbios à exposição ao bisfenol A, como diabetes, obesidade, defeitos congênitos, doenças cardiovasculares e câncer de mama (REZG et al., 2014).

Devido ao seu conhecido efeito como interferente endócrino ele foi inserido na lista de interferentes endócrinos e em função de seu uso intensivo no dia a dia, a sua presença no ambiente tem sido motivo de preocupação tanto para o ecossistema como no âmbito da saúde humana. Esse contaminante tem sido frequentemente detectado em diferentes compartimentos ambientais, tais como afluentes e efluentes de estações de ETE em concentrações na faixa de ng L^{-1} a mg L^{-1} . As taxas de remoção de BPA da fase aquosa nas etapas de tratamento das ETE variam de 62,5 – 99,6%. As concentrações de bisfenol A divulgadas em vários trabalhos variam 5 a 320 ng L^{-1} em águas superficiais, de 20 a 700 ng L^{-1} em efluentes de ETE e 0,1 a 384 ng g^{-1} em alimentos (GOODSON; SUMMERFIELD; COOPER, 2002; KOLPIN et al., 2002; THOMSON; GROUNDS, 2005; BALLESTEROS-GÓMEZ et al., 2007; MA et al., 2018; MARQUES et al., 2017).

Devido ao uso intenso de produtos que apresentam bisfenol A em sua composição e diante de estudos que comprovam seus efeitos tóxicos, a USEPA estabeleceu como dose de referência para ingestão diária tolerável, a concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ por dia de bisfenol A (BALLESTEROS-GÓMEZ; RUBIO; PÉREZ-BENDITO, 2009).

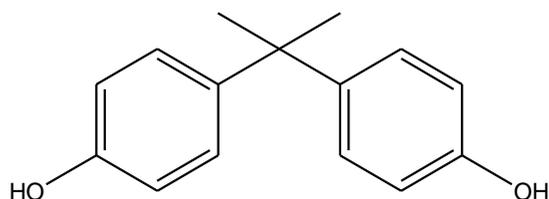


Figura 5: Estrutura do Bisfenol A

- Pesticidas

Os pesticidas são substâncias que abrangem uma grande variedade de compostos biologicamente ativos, que são utilizados para controlar pragas (*Food and Environmental Protection Act*, 1985). Nos últimos anos, a crescente demanda por alimentos aumentou a utilização desses produtos agrícolas e o Brasil se destaca nesse setor como o maior consumidor mundial de agrotóxicos desde 2008, representando cerca de 20% do uso mundial desses produtos (ABRASCO, 2015). Esses compostos estão continuamente sendo produzidos, existindo em grande diversidade no mercado e com diferentes propriedades físico-químicas que interferem diretamente na sua mobilidade no ambiente (FRENICH et al, 2000).

Durante a aplicação dos pesticidas, há a perda desses compostos, onde menos de 0,1% atinge a peste alvo, enquanto que o restante tem alto potencial de mobilização nos diferentes compartimentos ambientais, inclusive para águas superficiais (YOUNOS et al, 1988).

A contaminação por pesticidas depende de muitas variáveis tais como, tipo, quantidade e rotas de exposição, que são fatores que interferem na sua mobilidade no ambiente e variam de acordo com as suas propriedades inerentes (propriedades físico-químicas) como: solubilidade em água, pressão de vapor, teor de carbono orgânico, /coeficiente de partição octanol/água (K_{oc}) e tempo de meia vida. A mobilidade destes pesticidas também é afetada pelas condições ambientais como clima, características do solo e práticas agrícolas regionais (COVA et al, 1990).

Essas substâncias quando alcançam as águas superficiais podem ser tóxicas, bioacumulativas e persistentes causando efeitos adversos nos organismos não-alvo, além de causar câncer e interferir nos sistemas endócrinos da biota e de seres humanos, sendo necessário o controle desses contaminantes na água superficial e tratada (MONTAGNER et al, 2014).

Apesar da utilização intensa e a ocorrência desses contaminantes no ambiente, a legislação brasileira não contempla limites para muitos pesticidas e seus produtos de degradação, contribuindo para a inserção desses contaminantes no ambiente e na alimentação.

Um exemplo das falhas da legislação brasileira é o caso da atrazina. Apesar da Portaria 2.914 do Ministério da Saúde estabelecer um limite máximo permitido de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ para a atrazina em águas destinadas ao consumo humano, (BRASIL, 2011), outras legislações são muito mais rigorosas. Na legislação Europeia, a concentração máxima permitida é de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ para a somatória de pesticidas encontrados em água, independente do pesticida. Porém, o mais agravante é o fato da atrazina estar banida de países europeus, por ser classificado com interferente endócrino, além de constar entre os 33 poluentes de prioridade da União Europeia (COUNCIL DIRECTIVE, 1998; SASS e COLANGELO, 2006).

Os problemas relacionados à ocorrência de pesticidas em águas superficiais possuem diferentes vertentes, dentre elas a que a maioria deles é considerado interferente endócrino (GHISELLI; JARDIM, 2007). Com relação à saúde humana, os efeitos sinérgicos desses contaminantes e seus produtos de degradação ainda são

desconhecidos, apesar destes compostos geralmente serem aplicadas nas plantações na forma de misturas de pesticidas e não individualmente. Em um estudo realizado por Relyea (2009), o autor mostrou que as misturas de pesticidas causam efeitos negativos em grupos taxonômicos presentes no ambiente.

Esse trabalho irá abordar os agrotóxicos Atrazina e Simazina. Esses compostos foram escolhidos devido a sua ocorrência em águas superficiais e utilização no Brasil. Os agrotóxicos atrazina e simazina são herbicidas da classe das triazinas, cujas estruturas químicas e algumas propriedades físico-químicas são apresentadas na **tabela 2**. No Brasil, suas principais aplicações são nas culturas de cana-de-açúcar, café, milho e abacaxi (ANVISA, 2018).

O consumo de herbicidas no Brasil representa 58,5% do total de agrotóxicos comercializados, totalizando em 315.573,38 toneladas de ingrediente ativo, segundo o boletim de comercialização de agrotóxicos e afins. Esse mesmo boletim apresenta o herbicida atrazina ocupando a sexta posição de mais vendido no ano de 2017, representando 24.730,90 toneladas do princípio ativo no mercado brasileiro (IBAMA, 2017).

No que se refere à contaminação dos recursos hídricos em relação à presença dessas substâncias na água potável, foi estabelecido desde 1990, na Portaria GM/MS nº 36 a obrigatoriedade do monitoramento de pesticidas na água destinada à população, que hoje se encontra preconizada na atual Portaria 2.914/MS, 2011. Esse monitoramento resultou em uma base de dados do Sistema de informações de Vigilância da Qualidade da água para consumo humano (Sisagua) (MS, 2016).

Segundo o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, baseado nesse monitoramento de agrotóxicos em águas para abastecimento humano constatou-se a presença de atrazina e simazina em concentrações superiores ao VMP (Valor Máximo Permitido) de $2 \mu\text{g L}^{-1}$, segundo a Portaria 2.914 em 5% das amostras analisadas, referente ao ano de 2011 (MS, 2016).

Com relação à simazina, ela é considerada de preocupação pública devido à sua persistência, dificuldade de biodegradação e alta toxicidade para o ambiente. A exposição a esse herbicida pode gerar mutagenicidade, toxicidade no desenvolvimento reprodutivo e imuno toxicidade em animais, sobretudo em anfíbios, peixes e macrófitas (LI et al., 2018). Além do mais, a simazina tem sido considerada como tóxica para o sistema neuroendócrino, interferindo no metabolismo da dopamina, podendo levar a transtornos

no sistema dopaminérgico (YU et al., 2016). Devido a esses efeitos neuroendócrinos, a simazina está na lista de prioridade de compostos de interferência endócrina da EPA (EPA, 2010).

Com relação à atrazina, ele é um dos herbicidas mais utilizados por vários países, no entanto, esse herbicida foi banido da União Europeia desde 2003, devido a sua capacidade de persistir por longos períodos no solo e em águas subterrâneas (tempo de meia-vida variando de 13-1800 dias, produzindo Deetilatrazina (DEA) e Deisopropilatrazina (DIA) entre outros metabólitos (Figura 6) (VONBERG et al., 2014). Estudos mostram que a atrazina apresenta efeitos de interferência endócrina tanto em humanos quanto em animais (HAYES et al., 2011; KUCKA et al., 2012; GOLFINOPOULOS et al., 2017).

Muitos estudos têm sido desenvolvidos para avaliação dos efeitos tóxicos da exposição à atrazina. A toxicidade dos pesticidas é representada pelo valor da dose diária média letal (LD_{50}) por via oral, consistindo na concentração média necessária para matar 50% de ratos ou outros animais teste. Baseados nesse valor, os compostos podem ser classificados com relação à toxicidade humana e periculosidade ambiental de extremamente tóxicos até não tóxicos e altamente perigosos a não perigosos, respectivamente (MENEZES, 2006).

A atrazina e simazina são herbicidas relativamente pouco tóxicos e com risco ambiental moderado. A LD_{50} é relativamente alta em ratos para simazina (5 g kg^{-1}) e para a atrazina apresenta LD_{50} de 1.869 g kg^{-1} para animais dessa mesma classe taxonômica (KOMATSU, 2004; PEREIRA, 2011). No entanto, ambos herbicidas são considerados interferentes endócrinos pelas organizações UKEA (Agência ambiental do Reino Unido), USEPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) e JEA (Agência Ambiental do Japão) (GHISELLI; JARDIM, 2007). Também é importante destacar que ambos pesticidas apresentam persistência ambiental, justificando a preocupação quanto sua toxicidade crônica e bioacumulação (DO CARMO et al., 2013).

Com relação aos seus efeitos tóxicos em animais, ambos herbicidas, atrazina e a simazina, possuem efeitos mutagênicos e adversos no crescimento, desenvolvimento sistema imunológico e endócrino, especialmente em anfíbios e peixes (SAI et al., 2015; WANG et al., 2011). Hayes e colaboradores (2011) mostraram que ocorre a feminização de peixes, anfíbios, répteis e mamíferos pela exposição à atrazina, comprometendo o desenvolvimento das gônadas masculinas. Esse modelo de interferente endócrino

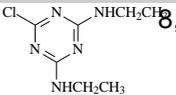
também já foi relatado pela exposição à simazina (VELISEK et al., 2012). Esses resultados mostram a relevância do monitoramento desses contaminantes em águas superficiais, em virtude do declínio dessas espécies, interferindo no equilíbrio do ecossistema.

O consumo de resíduos de atrazina e simazina pode causar problemas neurológicos e reprodutivos. Munger e colaboradores (1997) associaram as altas taxas de nascimento de crianças prematuras em uma comunidade em Iowa com o consumo de água com altas concentrações de atrazina (MUNGER et al., 1997). Cragin e colaboradores (2011) avaliaram a relação consumo de água contaminada com atrazina e interferência no ciclo menstrual e produção de ciclos ovulatórios inférteis (CRAGIN et al., 2011).

No Brasil, os herbicidas atrazina e simazina têm sido detectados em amostras de águas. No trabalho de revisão de Montagner e colaboradores (201

4) foi feito um levantamento da ocorrência de pesticidas em águas superficiais no Brasil. Como resultado, os herbicidas foram a classe mais investigada e as faixas de concentração foram de 0,002-9,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para atrazina, sendo identificados nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso e Rio Grande do Sul, enquanto a simazina foi encontrada na faixa de concentração de 0,007-0,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ nos estados de Mato Grosso, São Paulo e Rio Grande do Sul.

Tabela 2: Propriedades físico-químicas dos pesticidas estudados

Pesticida	Grupo químico	Estrutura	Pressão de vapor (mPa) ¹	Constante de Henry (Pa m ³ mol ⁻¹) ²	Log k _{ow}	Solubilidade	Classificação toxicológica
Atrazina	Triazina		$3,9 \times 10^{-2}$	$2,9 \times 10^{-4}$	2,7	35	III
Simazina	Triazina		$8,0 \times 10^{-4}$	$3,4 \times 10^{-4}$	2,2	5	III

1- Friedrich e Stambach, 1964; 2-Steen et al. 2001

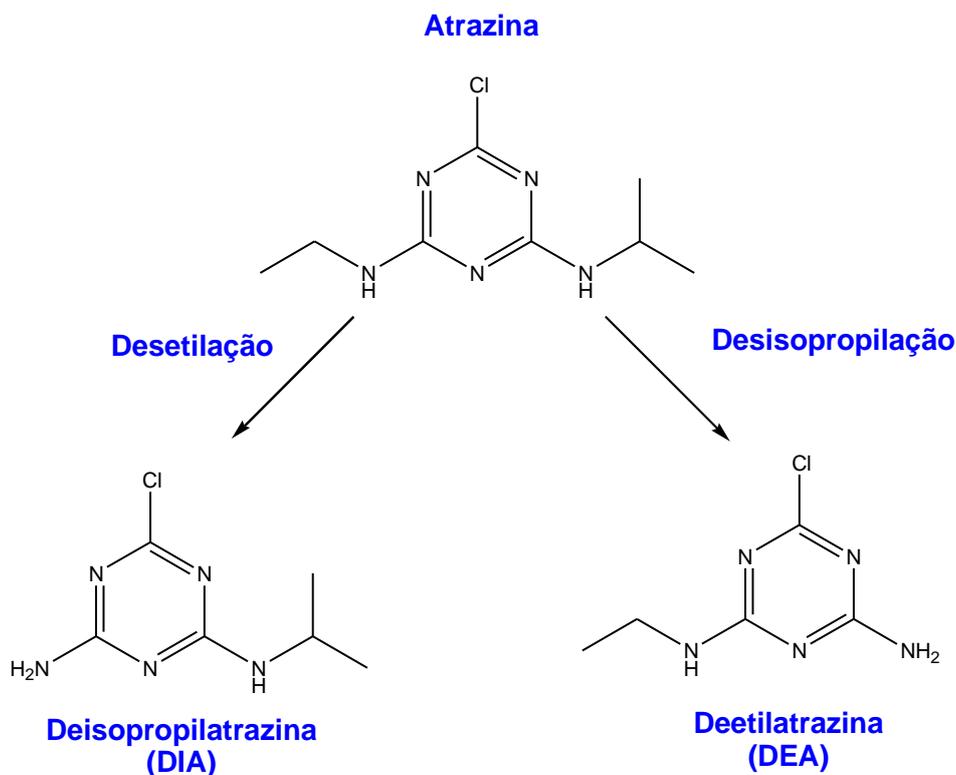


Figura 6: Principais metabólitos da Atrazina. Fonte: adaptado de (BARCELLOS, 2016)

- **Cafeína**

A cafeína (**Figura 7**) é um alcalóide da classe das metilxantinas, sendo considerada uma das substâncias psicoativas mais consumidas no mundo (DIOGO et al., 2013). Ela ocorre em diversas espécies vegetais, tais como café, chás, guaraná, cacau, ervas e mais outras 60 espécies de plantas, além de estar presente em uma variedade de bebidas e produtos alimentícios (BUERGE et al., 2003).

O consumo de cafeína ocorre em função da ingestão de produtos alimentícios que contém essa substância e através de medicamentos. É estimado que cerca de 70 % da cafeína consumida mundialmente seja proveniente do café e que esta seja a bebida mais consumida no mundo (BUTT; SULTAN, 2011; CANELA et al., 2014). No Brasil, o consumo interno de café em 2017 foi estimado em 21,5 milhões de sacas correspondendo a cerca de 1,07 milhão de toneladas, destacando-se como o segundo maior consumidor a nível mundial, perdendo apenas para os Estados Unidos (EMBRAPA, 2017).

Esse composto é metabolizado parcialmente pelo organismo humano e excretado através da urina. Sua remoção em águas superficiais ou em efluentes de

estações de tratamento de esgoto e água não são 100% eficientes devido ao elevado consumo e a falta de saneamento adequado (GLASSMEYER et al, 2005). Em vários países, a cafeína tem sido detectada em ambientes aquáticos naturais e está fortemente relacionada com atividades antropogênicas, sendo usado muitas vezes como bom indicador de qualidade de água associado à presença de esgoto (MONTAGNER et al., 2014; CANELA et al., 2014).

No trabalho realizado por Raimundo (2011) evidenciou-se que a presença de cafeína em águas tratadas estava intrinsecamente relacionada ao aporte de contaminantes emergentes ao comparar 16 contaminantes emergentes com o potencial estrogênico, usando um bioensaio com levedura modificada. Estes resultados comprovaram que a cafeína pode ser usada como indicador de qualidade, principalmente em relação à possível atividade estrogênica presente nas amostras. Além desse trabalho, outros países também mostraram a relação entre a carga de esgoto e presença de cafeína (BUERGE et al., 2003; CHEN et al., 2002; DANESHVAR et al., 2012; SEILER et al., 1999).

Com relação à concentração dessa substância no ambiente, o estudo realizado por Montagner e colaboradores (2014) fez uma comparação entre a presença de cafeína em águas superficiais em países com altos níveis de saneamento, nas quais as concentrações de cafeína foram encontradas na faixa de 13-107 ng L⁻¹ (França), 0,6-1056 ng L⁻¹ (Itália) e 2-225 ng L⁻¹ (Estados Unidos). Países como o Brasil, com baixos níveis de saneamento, apresentaram faixas de concentração variando entre 174-127.092 ng L⁻¹ em capitais como São Paulo e 1.410-753.500 ng L⁻¹ em Curitiba.

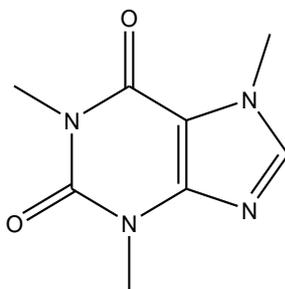


Figura 7: Estrutura da cafeína

1.3.2 Destino dos COE no ambiente

A ampla classe de contaminantes que abrange os compostos emergentes tem sido identificada nos diferentes compartimentos ambientais como águas superficiais, águas subterrâneas, água potável e efluentes de ETE (**Figura 8**). Embora os efluentes das ETE sejam vistos como uma das fontes que mais contribuem para a contaminação das águas naturais com compostos emergentes (TERNES et al., 2004).

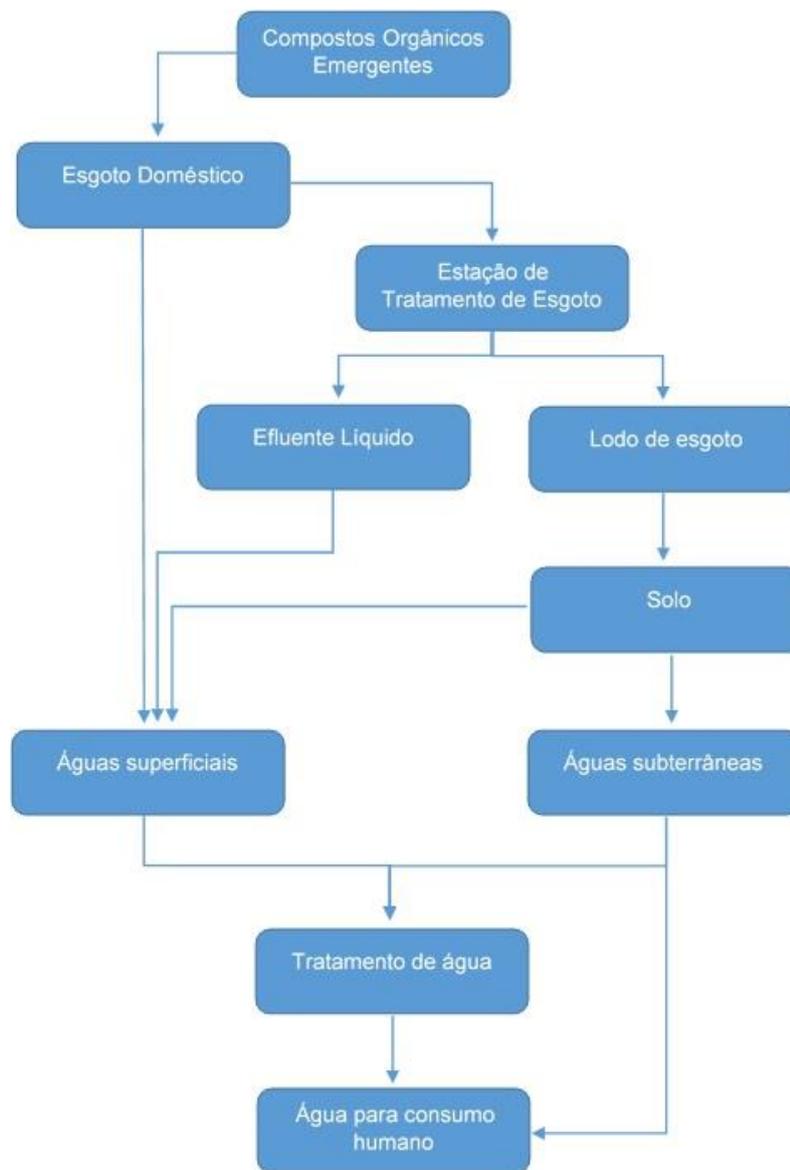


Figura 8: Vias de aporte, transporte e destino de Compostos Orgânicos Emergentes no ambiente. Fonte: Adaptado de (CANELA et al., 2014)

Os sistemas tradicionais de tratamento de esgoto geralmente realizam o tratamento primário, secundário e ocasionalmente o tratamento terciário, dependendo do destino final desta água. Esses processos são compostos de várias etapas de tratamentos biológicos e físico-químicos. No tratamento primário, o resíduo sólido, plásticos, óleos, gorduras e areias são separados principalmente por processos mecânicos através de filtração e sedimentação. O tratamento secundário envolve a degradação biológica das substâncias orgânicas que pode ocorrer de forma aeróbica ou anaeróbica e pode variar significativamente. Nessa etapa, várias tecnologias de tratamentos biológicos podem ser usadas, como biorreatores de leito fixo, biorreatores de membrana e reator de biofilme de leito móvel. Nessa etapa, as substâncias orgânicas e o nitrogênio são degradados pelo lodo ativado utilizando o oxigênio dissolvido (GOGOI et al., 2018; MANAHAN, 2000).

Por último, o tratamento terciário pode remover o fósforo por precipitação e filtração (BATT; KIM; AGA, 2007). Algumas ETE podem fazer a desinfecção por irradiação UV ou cloração antes de descarregar o efluente no ambiente. No entanto, esses tratamentos não garantem a remoção completa dos contaminantes emergentes. A técnica do lodo ativado é a mais comumente utilizada no mundo, ela não é capaz remover todos os compostos emergentes de forma eficiente, além disso, vários processos biológicos e químicos de degradação e fotólise podem transformar os contaminantes em formas mais tóxicas que os compostos de origem (CELIZ et al., 2009). A **Tabela 3** apresenta quais são as taxas de remoção de alguns compostos emergentes das ETE e quais são os principais processos responsáveis por sua remoção.

Tabela 3: Processos e taxas de remoção dos COE em ETE com tratamentos convencionais

Processo de tratamento	Compostos	Eficiência de Remoção (%)	Referência
Clarificação, desinfecção (cloração) e Filtração (carvão ativado granular.	Nonilfenol	73	Stackelberg, 2007
	Cafeína	88	Stackelberg, 2007
	Bisfenol A	76	Stackelberg, 2007
Oxidação com cloro livre	Etinilestradiol	68,1	Wu et al, 2012
Floculação, sedimentação,	Atrazina	70,4 ± 32,1	Padhye et al, 2014
	Triclosan	55,4 ± 32,0	Padhye et al, 2014

ozonização, filtração e cloração			
	Simazina	NE	NE

NE – Não foram encontrados dados de remoção em ETE com tratamento convencional.

Além desse cenário, no Brasil outra questão relevante é o lançamento de esgoto bruto diretamente nos corpos hídricos. Segundo o IBGE (2008), último censo realizado sobre saneamento básico, pouco mais da metade dos municípios brasileiros, representando 55,2%, apresenta rede de esgotamento sanitário que é o sistema apropriado. O restante, não se sabe qual é o destino do esgoto, sabendo que em um país em desenvolvimento como o Brasil, muito desse esgoto acaba tendo como destino as águas superficiais como foi mostrado em diversos trabalhos usando a cafeína como marcador químico (BUERGE et al., 2003; DANESHVAR et al., 2012; HILLEBRAND et al., 2012; CANELA et al., 2014; MONTAGNER et al., 2014). A utilização intensiva de produtos que contenham COE e a comprovação da sua toxicidade em animais e humanos tem feito com que organizações governamentais e não-governamentais, tais como União Europeia (EU), Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), Organização Mundial de Saúde (OMS) e Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, do inglês *International Program Chemical Safe*) apoiem e incentivem os estudos sobre estes compostos. Os estudos são voltados para avaliação dos efeitos dos COE e regulamentação desses compostos, visando à melhoria da qualidade da água (BUENO et al, 2012; ROBLES-MOLINA et al, 2014).

Nesse sentido, alguns países têm buscado implementar tecnologias que priorizem esses contaminantes ambientais. A USEPA disponibilizou a CCL-4 (*Contaminant Candidate List-4*), que sofreu sua quarta atualização, que consiste de uma lista de contaminantes candidatos a uma futura regulamentação nos termos da lei para águas destinadas para o consumo humano. Nesse documento estão aproximadamente 100 compostos ou grupos químicos que podem estar presentes no sistema público de abastecimento (USEPA, 2018).

Um das iniciativas pioneiras de regulamentação desses compostos partiu da União Europeia (Directive 2000/60/EC) que listou 33 grupos de substâncias de preocupação prioritária devido a sua persistência, toxicidade, bioacumulação, frequência de utilização e detecção em ambientes aquáticos. Posteriormente, outras legislações tais como a Directive 2008/105/EC estabeleceu pela primeira vez padrões de qualidade para

esses tipos de contaminantes, visando a qualidade do ambiente e saúde humana. Novos compostos têm sido acrescentados nas listas de contaminantes prioritários à medida que suas toxicidades vão sendo estudadas (BUENO et al, 2012).

CAPÍTULO 2 – METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE COE EM MATRIZES AQUOSAS

2

2.1 Análise de COE: Breve histórico

A baixa concentração dos COE em matrizes ambientais, principalmente aquosas, e a dificuldade de analisa-los e a falta de informação sobre seus efeitos fez com que a presença destes compostos na água só recebesse importância nas últimas décadas. Embora alguns compostos já contaminassem as águas naturais há muito tempo, as técnicas de extração e detecção ainda eram pouco eficientes e sensíveis para verificar a presença dos mesmos. O desenvolvimento dos materiais de extração e da instrumentação analítica tornou possível a análise de contaminantes em nível de micro traços, mostrando que vários compostos não naturais, apareciam em matrizes ambientais e que vários efeitos poderiam ser observados nos organismos vivos.

No entanto, ainda há muitos obstáculos a serem superados como a complexidade das matrizes e várias faixas de polaridade dos compostos a serem analisados. Além dos desafios da análise desses contaminantes que pertencem à uma ampla faixa de compostos de diferentes classes em diversas matrizes ambientais, outras dificuldades relacionadas a esse tipo de análise são: a concentração que esses contaminantes estão em água (na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$, ng L^{-1} e pg L^{-1}); e as altas concentrações de interferentes, causando efeito matriz em detrimento da baixa concentração dos analitos (BILA; DEZOTTI, 2007; SODRÉ, LOCATELLI e JARDIM, 2010; MACHADO, 2015).

As etapas envolvidas na determinação dos COE em matrizes aquosas são apresentadas na (**Figura 9**). O primeiro grande desafio são as etapas de pré-tratamento da amostra, pois são complexas, trabalhosas e consomem muito tempo. O pré-tratamento envolve a remoção do analito da matriz aquosa, assim como sua pré-concentração para atingir limites detectáveis pelo equipamento de análise. Diante das

dificuldades na determinação destes compostos, o avanço no desenvolvimento das técnicas analíticas ocorre no sentido de otimizar os passos envolvidos na análise de uma ampla faixa de classes de compostos de forma eficiente e rápida.

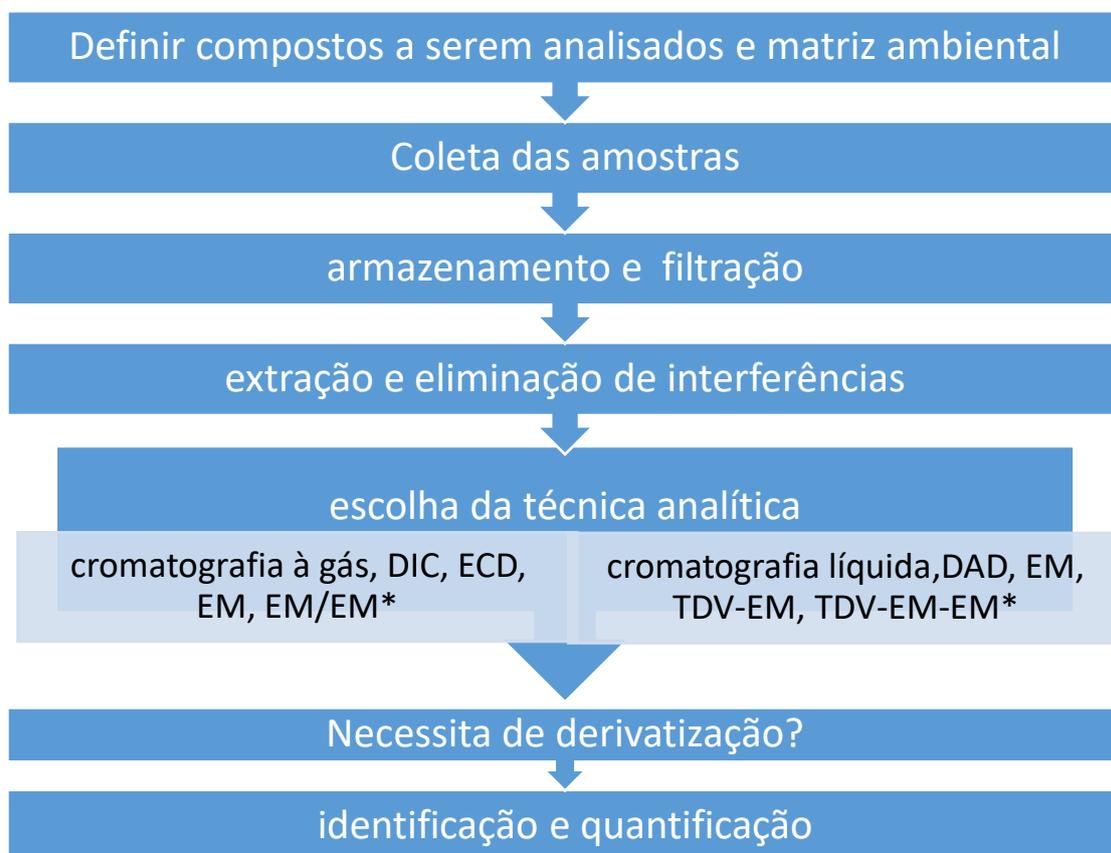


Figura 9: Etapas de análise de COE, * DIC- detector de ionização em chama

* A etapa de derivatização será necessária somente para determinados grupos de substâncias.

Na literatura, a análise de contaminantes emergentes em matrizes aquosas é descrita utilizando vários métodos analíticos tradicionais, como por exemplo, as técnicas cromatográficas com diferentes detectores. No entanto, estas técnicas necessitam ter alta sensibilidade e seletividade, uma vez que esses compostos apresentam atividade estrogênica mesmo em baixas concentrações (LOCATELLI et al, 2016). O quadro 1 apresenta os principais métodos para determinação de COE em diferentes matrizes aquosas publicado por vários autores.

Quadro 1: Exemplos de métodos analíticos mais usados para determinação de COE.

Analitos	Matriz	Método de extração	Método de análise	LQ (ng L⁻¹)	LD (ng L⁻¹)	Referência
Estrona, 17-β-estradiol, estriol, 17-α-etinilestradiol, Bisfenol, A, 4-n-octilfenol e 4-n-nonilfenol	Água tratada e superficial	SPE	LC-MS	0,04 – 1,0	0,1 – 3,1	JARDIM et al, 2012
Atrazina, alquilfenóis, cafeína, triclosan, bisfenol A, hormônios, fenolftaleína, Ibuprofeno, metil-triclosan e paracetamol	Águas tratadas e mananciais	SPE	GC-MS/ LC-MS/MS (derivatização)	1,90 - 143,30	0,57 – 42,99	MACHADO, 2015
Drogas de abuso de várias classes químicas	Águas superficiais e ETE	SPE	LC-MS/MS	0,1 – 100	0,5 – 154,2	BAKER; KASPRZYK-HORDERN, 2011
Fármacos, produtos de cuidado pessoal, compostos da indústria, hormônios e pesticidas	ETE, fossas sépticas, águas superficiais e subterrânea	SPE on-line	LC-MS/MS	-	0,1 - 10	AMUNOL; SNYDER, 2015
Fármacos e produtos de cuidado pessoal	ETE e águas superficiais	SPE – DLPME ¹	UHPLC ² -MS/MS	3	1	CELANO et al, 2014

Fármacos, produtos de cuidado pessoal, pesticidas e metabólitos	ETE	SPE e LLE ³	LC – MS/MS e GC - MS	0.9 – 952,4	0,1 – 285,7	BUENO et al, 2012
Fármacos e drogas de abuso	ETE e águas superficiais	Injeção direta e SPE on-line	UHPLC – MS/MS e LC-MS/MS	0,1 – 41,1	-	BOIX et al, 2015
Fármacos, pesticidas, derivados da indústria química, hormônios e HPAs	ETA e águas superficiais	SBSE ⁴	GC-MS Derivatização (<i>in-situ</i>)	-	1- 500	HOECK et al, 2009
Hormônios, fármacos, produtos de cuidado pessoal e pesticidas	ETE, águas superficiais e água de abastecimento	Off-line SPE e on-line SPE	LC – MS/MS	0,08 – 80,0	0,03 – 30,0	KUSTER et al, 2008
Estrogênios	ETE	On-line SPE	HPLC – MS/MS	-	0,4 – 0,7	SALVADOR et al, 2007

¹Micro Extração Líquido-Líquido Dispersiva (DLPME). ²Cromatografia Líquida de Ultra Alta Pressão (UHPLC). ³Extração Líquido-Líquido (LLE). ⁴Extração Sortiva em Barra de Agitação (SBSE).

Na determinação de COE (**Quadro 1**), o preparo de amostra mais utilizado para amostras aquosas são baseados na Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) e a análise por métodos cromatográficos como a Cromatografia Gasosa (GC, do inglês *gas chromatographic*) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatographic*) acoplados à sistemas sensíveis e específicos de detecção como o Espectrômetro de Massas (MS, do inglês *mass spectrometer*) simples ou em tandem (MS/MS). Para a análise de determinados compostos polares por GC é necessário o processo de derivatização da amostra. No entanto, atualmente o desenvolvimento da técnica de HPLC e seu acoplamento a detectores como MS, utilizando a ionização por eletrosspray (ESI – do inglês *EletroSpray Ionization*) e analisador por Tempo de Voo (TOF – do inglês *Time Of Flight*) tornou possível a determinação desses contaminantes sem a necessidade dessa etapa (PETROVIC et al, 2002).

2.2 Preparação de amostras

2.2.1 Coleta, preservação e filtração de amostra

A coleta, preservação da amostra e demais passos subsequentes da análise de contaminantes devem reproduzir o próprio ambiente estudado, portanto, essas etapas devem ser cuidadosamente planejadas para que os dados gerados sejam representativos à área de estudo. A coleta de amostras aquosas depende de fatores como uso do corpo d'água, natureza, área de influência e característica da área de estudo. Essas amostras podem ser coletadas em águas classificadas como bruta, tratada ou residuária; superficial ou subterrânea; interior ou costeira; doce, salobra ou salina (ANA, 2011).

A coleta da amostra é o passo mais importante para avaliação da área de estudo, pois, devem-se evitar todas as possíveis fontes de contaminação e perdas para que haja a veracidade dos resultados analíticos da sua origem. O tipo de coleta, preservação da amostra e tipo de filtração a ser utilizada deve considerar a matriz a ser amostrada e os métodos analíticos escolhidos para determinação dos analitos.

A amostragem pode ser simples, composta e integrada, a primeira é caracterizada por uma tomada de amostra de forma pontual e instantânea, usada quando

a vazão e composição do corpo d'água não sofre variação significativa. A amostragem composta é constituída por unidades de amostras simples coletada por um determinado período de tempo que são misturadas e homogeneizadas, a qual é indicada para quando ocorre uma grande variação na composição ou vazão do corpo hídrico (ANA, 2011).

A amostragem integrada consiste na coleta simultânea, ou em intervalos de tempo o mais próximo possível, de alíquotas que serão reunidas numa única amostra (ANA, 2011). O volume de amostra depende do(s) tipo(s) de análise que serão realizadas. Segundo Locatelli e colaboradores (2016) para uma determinação utilizando as técnicas cromatográficas, os volumes podem variar de 50 mL até 20 L, dependendo da sensibilidade e da faixa de detecção da técnica analítica utilizada. Os mesmos autores afirmam que volumes maiores de 5 L devem ser evitados devido ao aumento do efeito matriz e logística de amostragem. O volume ótimo de amostra para análise por GC-MS/MS e HPLC-MS/MS deve estar na faixa de 250 mL e 1 L.

A etapa posterior e igualmente importante na análise de compostos orgânicos é a preservação da amostra. Essa etapa deve ser capaz de minimizar qualquer alteração química ou biológica que possa ocorrer após a amostragem (DEAN, 2003). A técnica mais utilizada para preservação de amostras de contaminantes em matrizes aquosas é armazenar a amostra no cartucho de extração, condicionando o sorbente com metanol e percolando a amostra para posteriormente congelá-la a cerca de -18°C antes de 24 horas da amostragem.

O tipo de matriz também pode estar atrelado à quantidade de matéria orgânica e partículas em suspensão na amostra, que podem interferir nas etapas subsequentes da análise. Portanto, na maioria dos casos é necessária a filtração prévia da amostra cujo método mais usado é através de filtros de fibra de vidro. (LOCATELLI et al, 2016). O quadro 2 mostra as técnicas mais utilizadas para coleta, preservação e filtração de amostras de COEs e suas respectivas porcentagens de recuperação.

Quadro 2: Coleta, preservação e filtração de amostras

Analitos	Matriz	Volume de amostra (L)	Aditivo	Tempo de armazenamento (°C)	Tempo pré extração (horas)	Tipo de filtração	Preparo de amostra	Recuperação (%)	Referência
Fármacos, filtros-UV, retardantes de chama, antioxidantes, Fragrâncias sintéticas, desinfetantes e agrotóxicos	ETE	1 L amostragem integrada	-	4	48	Filtro de fibra de vidro (0,7 µm)	SPE ou LLE	Média maior que 67	BUENO et al, 2012
Fármacos, Produtos de cuidado pessoal e agrotóxicos	Superficiais e tratada	1 L amostragem simples	-	4° C	24	Filtro de acetato de celulose	SPE	70-120	CALDAS et al, 2013
Fármacos e produtos de cuidado pessoal	Tratada, mar, superficial e residual	500 mL* e 250 mL** amostragem simples	-	-20°C	-	Filtro de fibra de vidro (2,7 µm)	SPE e DLLME	>70	CELANO et al, 2014
Estrogênios naturais e sintéticos, desinfetantes,	Águas superficiais	500 mL amostragem	-	-20° C	-	Filtro de membrana	On-line TFC***	Média = 92%	ESTEBAN et al, 2014

conservantes, plastificantes, compostos alquil fenólicos, anticorrosivos, retardantes de chama e cafeína		em simples				de nylon (0,45 µm)			
17β-etsradiol, 17α-etinilestradiol e 4-nonilfenol	Águas superficiais	1 L amostragem em simples	5 mL de metanol	4° C	48	Membrana (0,5 µm)	SPE	90-96	MOREIRA et al, 2009
Fármacos, estrogênios, progestogênios e agrotóxicos	Efluentes de ETEs, águas superficiais e água tratada	0,25 L*** e 0,05 L** amostragem em simples	Tiosulfato de sódio anidro (amostras cloradas)	4° C	48	Filtro de nylon (0.45 µm)	SPE	Média maior que 80	KUSTER et al, 2008
Atrazina, alquilfenóis, produtos de cuidados pessoal e plastificantes, hormônios	Águas naturais e tratadas	1 L Amostragem em composta	-	4° C	24	-	SPE	Média maior que 60	MACHADO, 2015

*água do mar, rio e tratada; **residual; *** rio e tratada; TFC – do inglês Turbulent Flow Chromatography

Observa-se que a maioria dos trabalhos utilizam volumes de amostra em torno de 1 a 0,25 L. No entanto, volumes menores de amostras são mais adequados para amostras de efluentes de ETE a fim de evitar o efeito matriz. O uso de aditivos (substâncias adicionadas para preservação das amostras) não é muito utilizado devido ao curto tempo antes da etapa de pré-tratamento de amostra (24 - 48 horas).

2.2.2 Técnicas de preparação de amostras (Extração e concentração de COE)

A análise de contaminantes emergentes em matrizes aquosas requer técnicas de alta separação e concentração dos analitos antes de chegar ao instrumento analítico. A preparação da amostra é uma das etapas mais importantes do método analítico, especialmente se tratando de análise de compostos em concentração a níveis traços. Nesse sentido, a demanda de análises em baixas concentrações de compostos orgânicos em matrizes complexas, deve considerar a eliminação de interferentes e redução no volume final dos extratos para fornecer uma alta concentração dos analitos e possibilitar detecção sensível com baixos limites de quantificação. Essa etapa pode incluir ajuste de pH, extração, limpeza e pré-concentração para garantir que os analitos possam ser determinados nos níveis de concentração adequados (PADRÓN et al, 2014).

Nesse sentido, além de técnicas de análises eficientes, também são necessárias etapas de preparo de amostra, incluindo a extração e concentração dos analitos, que se constituem numa das etapas mais importantes para determinação desses contaminantes. A literatura reporta uma variedade de métodos para extração de compostos emergentes em água (MOREIRA et al, 2009; JARDIM et al, 2012; VALSECCHI et al, 2015), contudo a SPE é uma das técnicas mais utilizadas para amostras aquosas (DA SILVA; COLLINS, 2011).

A Extração em Fase Sólida é uma técnica líquido-sólido baseada na cromatografia líquida de baixa pressão que possui o propósito de isolar analitos presentes em uma amostra complexa. O formato mais comum para SPE é o cartucho, no entanto, também podem ser encontrado comercialmente de outras formas. Os discos, depois do cartucho, é a forma mais utilizada para determinação de compostos orgânicos em matrizes aquosas (**Figura 10**). Esses últimos consistem de uma membrana de 0,5 mm de espessura, na qual o adsorvente (sílica ou polimérico) é imobilizado em uma rede de microfibras a base de politetrafluoroetileno (PTFE) (ZWIR-FERENC e BIZIUK, 2006).

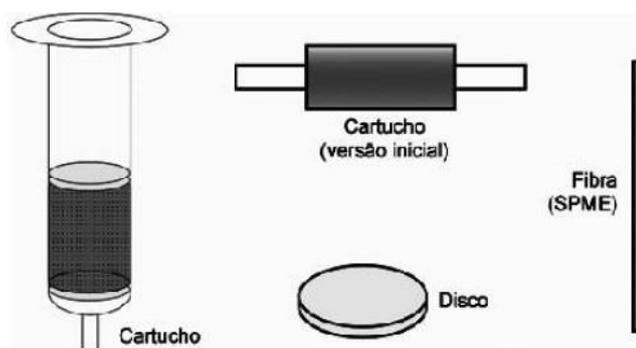


Figura 10: Formados encontrados comercialmente para EFS e SPME. Fonte: Lanças, 2008.

Os discos são colocados em sistemas típicos de filtração, ao qual é aplicado um vácuo para forçar a amostra a passar pelo sistema. Comercialmente, estão disponíveis sistemas *manifolds* para extração múltipla utilizando os discos. Os discos estão disponíveis em diferentes diâmetros que variam de acordo com o volume de amostra

As principais vantagens da utilização de discos em relação aos cartuchos são: leito mais homogêneo, evitando os canais preferenciais, pressões menores durante a aplicação da amostra, melhor reprodutibilidade e repetitividade, vazões mais altas e menores volumes de eluição. Nessa técnica a transferência de massa ocorre de forma mais rápida e eficiente devido ao menor tamanho da partícula (QUEIROZ et al, 2001; ZWIR-FERENC e BIZIUK, 2006). No entanto, dentre suas desvantagens destacam-se a maior variação de desempenho em relação às marcas e lotes; formação de uma interface ar/água com mais facilidade devido sua maior área superficial e, portanto, a secagem deve ser evitada; e da mesma forma como ocorre nos cartuchos, as amostras devem ser filtradas para evitar o entupimento dos poros por material particulado (CALDAS et al, 2011).

No caso dos cartuchos, primeiramente, ele é ativado com solvente; após a ativação a amostra é percolada pelo cartucho, em seguida passa-se água desionizada para retirada de possíveis interferentes e por último, os analitos retidos no cartucho são eluídos com solvente (FARIA, 2004) (**Figura 11**).

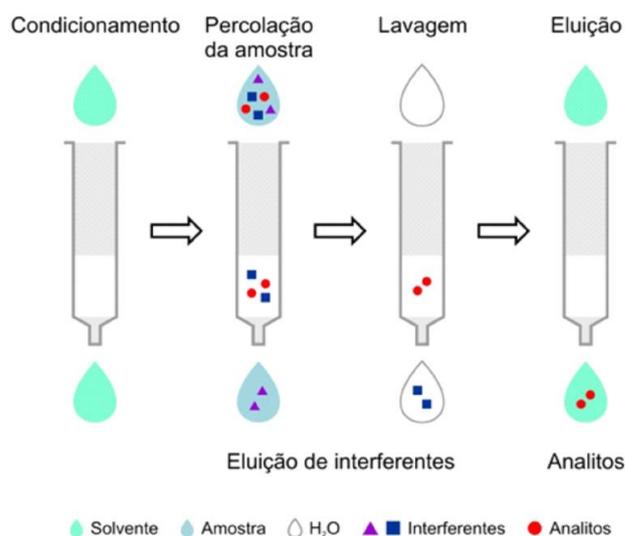


Figura 11: Etapas do processo de extração em fase sólida.

Fatores como o tipo e a quantidade de sorbente; o volume de amostra, e solvente que são percolados pelos cartuchos são importantes e devem ser considerados para obtenção de resultados mais exatos (FARIA, 2004). Nesse sentido, é necessário um estudo criterioso para definir as melhores condições para que a SPE seja eficiente.

Existem diversos tipos de sorbentes (C8, C18, carbono grafitizado, resina trocadora de íons e materiais poliméricos) que devem ser escolhidos de acordo com as características do analito, sua polaridade, faixa de pH trabalhada (CALDAS et al, 2011).

Atualmente, os sorbentes baseados em HLB (sorbente polimérico de fase reversa hidrofóbico/hidrofílico balanceado) são os mais utilizados para determinação de COEs (ROBLES-MOLINA et al, 2014; SILVA, 2014; MACHADO, 2015). Esse sorbente é caracterizado pela sua habilidade de reter uma larga faixa de compostos (ácidos, básicos e neutros). Sua composição baseia-se em poliamida, poli(n-vinilpirrolidina-divenilbenzeno (DVZ)), metacrilato DVZ e poliestireno hidroxilado DVZ, abrangendo as seguintes marcas (OASIS HLB, STRATA XL, Super Selected HLB e Bond Elut Plexa) (KUMAR e SIVAPERUMAL, 2016; LOCATELLI et al, 2016).

Os cartuchos Oasis HLB (Waters) (Figura 12) possuem essa capacidade de reter compostos com características lipofílicas e hidrofílicas, pois são constituídos por um polímero lipofílico, de divinilbenzeno, e um polímero hidrofílico, de n-vinilpirrolidina, com tamanho de poro de 80 Å e tamanho de partícula de 30 µm. O monômero lipofílico tem interação do tipo fase reversa para a retenção dos analitos por meio de interações hidrofóbicas, enquanto que, o polímero hidrofílico proporciona propriedades umectantes

à fase extratora, retendo compostos polares por interações mais fortes, como as ligações de hidrogênio. Esse material também é estável em uma ampla faixa de pH, não sofre interações silanol e sem alterações do sorbente na secagem (RAIMUNDO, 2011).

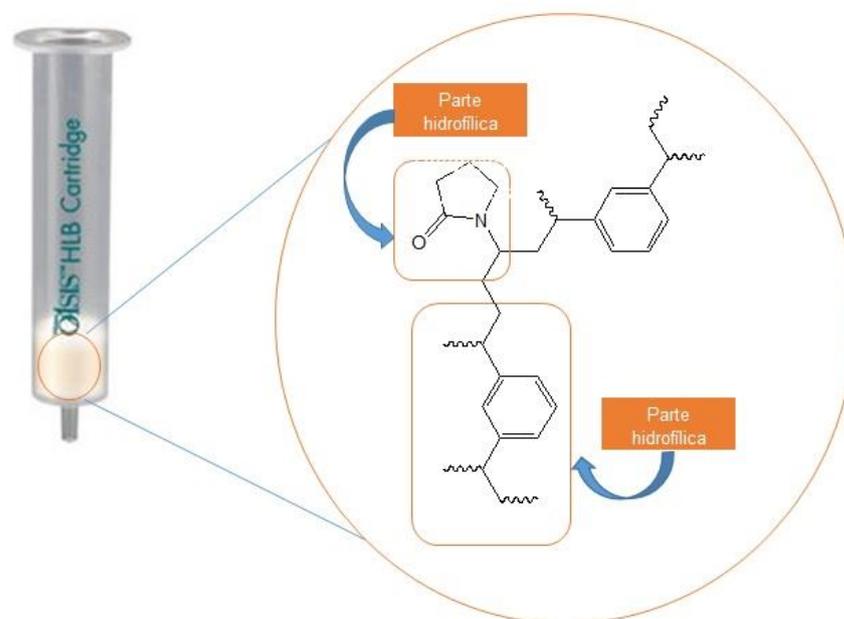


Figura 12: Composição do sorbente dos cartuchos Oasis HLB.

Outro fator que influencia na eficiência da extração é a faixa de pH trabalhada. A forma como os compostos orgânicos fracamente ácidos está na solução e sua afinidade pelo sorbente depende do valor de pH desta solução. Dessa forma, a acidificação da solução aquosa tende a diminuir a dissociação dos analitos fracamente ácidos, aumentando assim a eficiência da extração do composto alvo, se a sua forma não dissociada liga mais fortemente ao sorbente (LIU, ZHOU e WILDING, 2004). No entanto, é importante trabalhar numa faixa de pH onde não ocorra a degradação do analito (DA SILVA e COLLINS, 2011).

No trabalho realizado por Tran e colaboradores (2007) foram comparadas diferentes técnicas de pré-concentração de herbicidas polares em matrizes ambientais aquáticas. Nesse trabalho, foram confrontadas as técnicas de LLE (do inglês, *liquid liquid extraction*), SPE (cartucho – Oasis HLB) e SPE (discos – SBD-XC Empore) em diferentes matrizes, incluindo amostras aquosas contendo alta concentração de material particulado. O uso do disco SBD-XC e filtro de fibra de vidro se mostrou mais rápido, eficiente e com boa reprodutibilidade para determinação de herbicidas em águas naturais e com alta concentração de material particulado.

Para aumentar a seletividade ou mesmo a capacidade de análise para determinação simultânea de compostos com características diferentes pode-se empregar a técnica de empilhamento que consiste no empilhamento de vários discos de um mesmo ou diferentes sorbentes (multiclasse de analitos) (QUEIROZ et al,2001).

Para uma maior variedade de contaminantes emergentes, Boyd e colaboradores (2003) desenvolveram uma metodologia empregando a SPE em disco (cartucho SDB-XC Empore disk) para análise de fármacos e produtos de cuidado pessoais (ácido clofíbrico, ibuprofeno, acetaminofeno, cafeína, fluoxetina, clorofeno, naproxen, triclosan, bisfenol A, estrona e 17- β -estradiol). Os resultados mostraram porcentagens de recuperação para a maioria dos compostos estudados acima de 47%, exceto para cafeína e acetaminofeno. Os limites de detecção apresentados foram na faixa de 0,1 a 107,1 ng L⁻¹ e 1,1 a 39,5 % de desvio padrão relativo (RSD).

2.3 Detectores para determinação de COE

Os compostos emergentes vêm sendo lançados no ambiente por décadas, no entanto, somente puderam ser detectados e quantificados com o avanço das técnicas analíticas para detecção e quantificação em baixas concentrações (na faixa de ng L⁻¹), além da análise simultânea de um número cada vez maior de contaminantes.

As técnicas de separação GC e HPLC são as mais utilizadas para determinação de contaminantes em baixas concentrações em matrizes aquosas por serem sensíveis e seletivas (DIMPE e NOMNGONGO, 2016; VALSECCHI et al, 2015; WANG et al, 2015; BUENO et al, 2012; MOREIRA et al, 2009).

A escolha entre a cromatografia líquida ou gasosa vai depender das características físico-químicas dos analitos. O diagrama de polaridade/volatilidade orienta com relação à técnica analítica a ser usada (**Figura 13**).

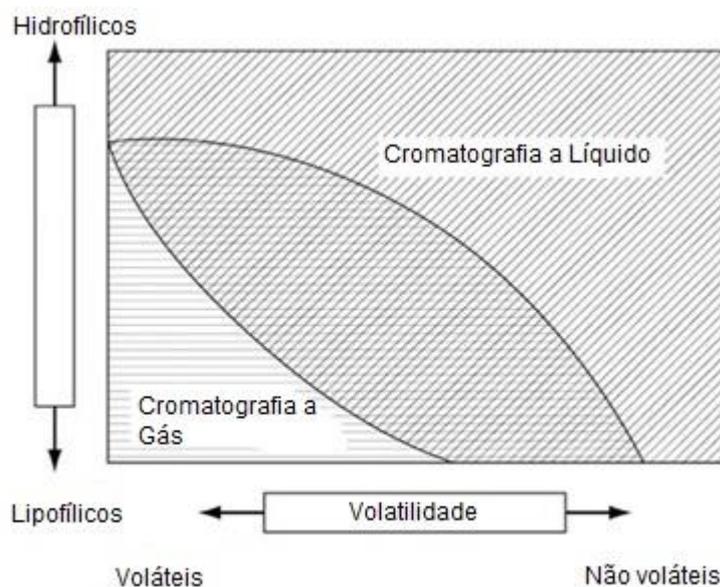


Figura 13: Diagrama de Polaridade x Volatilidade. Fonte: adaptado de Giger et al, 2009.

Portanto, analitos voláteis ou semivoláteis, não polares (lipofílicos) utiliza-se geralmente a técnica de cromatografia a gás, enquanto que compostos com polaridade mais alta, volatilidade mais baixa ou ainda termicamente instáveis são geralmente analisados por HPLC. Entretanto, compostos com características polares também podem ser determinados utilizando a técnica de GC, após reações de derivatizações para transformá-los em espécies mais voláteis (DA SILVA e COLLINS, 2011; GIGER, 2009).

Os métodos de separação GC e HPLC são altamente eficientes e seletivos quando são acoplados com detectores de alta sensibilidade como o MS (do inglês, *Mass Spectrometry*) ou sistemas tandem MS/MS (HUANG e SEDLAK, 2001)

Por quase quatro décadas, a análise por GC prevaleceu devido ao foco em compostos com características mais apolares, voláteis ou semivoláteis na química ambiental. Os detectores utilizados podem ser universais, como o FID (do inglês, *Flame Ionization Detector*) ou detectores mais específicos como os detectores ECD (do inglês *Electron Capture Detector*), que foram muito utilizados para análises de baixas concentrações de compostos orgânicos halogenados. No entanto, o detector de MS foi o mais amplamente usado devido a sua possibilidade de identificação e ao mesmo tempo seus limites de quantificação e detecção mais baixos (MACHADO, 2015; GIGER, 2009).

A espectrometria de massas tem revolucionado o campo da química analítica permitindo a análise de uma ampla variedade de classes de contaminantes em níveis traços. Esse detector fornece padrões de fragmentação que permitem a identificação de

uma grande variedade de classes de contaminantes, se constituindo num detector mais universal (SILVA, 2014).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas tem sido um método analítico bastante utilizado para determinação dos contaminantes orgânicos devido à grande quantidade de informação estrutural gerada através da utilização *full scan* obtida principalmente através da ionização por impacto de elétrons (IE – do inglês *Eletron Impact*) e também pela possibilidade de comparação com bibliotecas comerciais tornando possível a elucidação de estruturas desses contaminantes (AGÜERA et al., 2005).

No entanto, a cromatografia a gás apresenta desvantagens devido a sua capacidade limitada de analisar compostos mais polares e com volatilidade menor. Nesse sentido, contaminantes muito polares e com características anfifílicas podem ser determinados por GC/MS depois de reações de derivatização ou transformação dos analitos em espécies mais voláteis que possibilita o aumento da sensibilidade e seletividade tanto na separação, como na detecção no MS (GALLART-AYALA, MOYANO e GALCERAN, 2010).

A cromatografia líquida é mais adequada quando é necessário analisar uma faixa maior de polaridade e tem se apresentado como uma importante ferramenta para identificação de metabólitos. O desenvolvimento de fontes de ionização por eletronebulização (ESI – do inglês *Eletronspray ionization*) e ionização química a pressão atmosférica (APCI – do inglês *Atmospheric-Pressure Chemical Ionization*) permitiu o acoplamento da cromatografia líquida ao detector espectrometria de massas (MS), proporcionando um grande avanço na determinação de contaminantes em matrizes aquosas, especialmente de compostos não-alvo.

A técnica de HPLC-MS com fonte de ionização por elétron-spray e analisador com tempo de voo (ESI/TOF) permite a elucidação de estruturas orgânicas por meio da medida da massa exata, mesmo com muitos poucos íons produzido pelo ESI (GIGER, 2009), melhorando ainda mais a capacidade de detecção.

As técnicas analíticas de GC-MS e HPLC-MS têm sido descritas na literatura como eficientes na identificação e quantificação de contaminantes emergentes. A Quadro 3 apresenta alguns trabalhos envolvendo ambas as técnicas, as condições para extração e os limites de detecção e taxas de recuperação para essas classes de contaminantes.

Quadro 3: Relação de metodologias para detecção e quantificação de contaminantes emergentes.

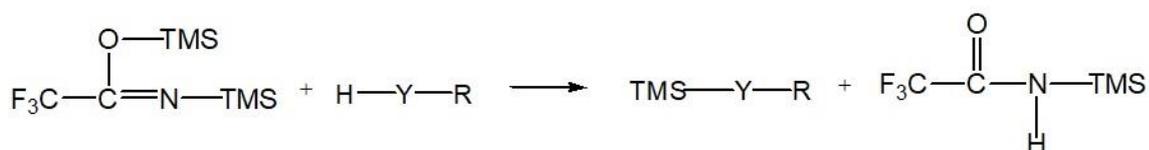
Referencia	Tipo de manancial	Nº de compostos analisados	Extração	Solvente de eluição	Técnica analítica	Porcentagem de recuperação (%)	Limite de detecção (ng L ⁻¹)
GROS et al, 2006	Águas superficiais e residuais	29	Oasis HLB (Waters)	Metanol	LC-MS/MS	60 a 110	1 a 160
KASPRZYK et al, 2008	Águas superficiais	56	Oasis MCX (Waters)	Metanol	UPLC-MS	5 a 144	0,05 a 20
MOL et al, 2000	Águas superficiais	8	C-18 (Baker)	Acetato de etila	GC-MS	58-106	4-300
JARDIM et al, 2012	Águas superficiais e tratadas	7	Oasis HLB (Waters)	Metanol	LC-MS	81-140	0,04-1
MOREIRA, 2009	Águas superficiais	3	C-18	Acetato de etila	LC-MS-IT-TOF	90-96	0,9-6,5
ANUMOL; SNYDER, 2015	Águas superficiais, subterrâneas e efluentes	34	PLRPs	Álcool isopropílico, metanol e acetonitrila	LC-MS/MS	61,2-145,1	0,1-13,1
BUENO et al, 2012	Efluente de ETE	100	Oasis HLB (Waters)	Metanol	LC-QTRAP-MS	23-127	0,04-50
WANG et al, 2011	Águas superficiais e tratada	16	Oasis HLB (Waters)	Metanol/Metanol:acetona	LC-MS/MS	12,6-136	0,1-4,3
SODRÉ et al, 2010	Água tratada	11	Stracta X (Phenomenex)	Acetona/metanol	GC-MS	44 – 108	30 a 110
HIBBERD et al, 2009	Água superficial e tratada	7	Oasis HLB (Waters)	Acetato de etila	GC-MS/MS	86 – 102	0,01 – 0,49
KELLY, 2000	Águas superficiais e Efluente de ETEs	3	C-18	Metanol/água	GC-MS/MS	92 – 99,6	1

2.4 Derivatização

As reações de derivatização ocorrem por meio de reações químicas com reagentes capazes de modificar grupos específicos em um ou mais grupos funcionais na molécula. Dentre esses grupos se destacam: grupo carboxila (-CO₂H), grupo hidroxila (-OH), grupo amino (-NH) e grupo tiol (-SH) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006 *apud* MACHADO, 2015).

Dentre as reações de derivatização para esse tipo de análise, o tipo mais usado é a sililação, pois é rápida, quantitativa, apresenta produtos termicamente estáveis e altamente voláteis, implicando em picos mais estreitos e simétricos. Entretanto, muitos derivados silícicos podem sofrer hidrólise durante a reação de derivatização, sendo, portanto, necessário derivatizantes estáveis. O N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida + (trimetilclorosilano), BSTFA(TMCS) obtém produtos menos susceptíveis a reações de hidrólise (MOL; SUNARTO; STEIJGER, 2000).

A reação de derivatização utilizando esse reagente ocorre em uma única etapa, via mecanismo SN₂, ou seja, uma reação de substituição nucleofílica de 2^a ordem, conforme ilustra a Figura 10. O ataque para a substituição ocorre nos hidrogênios ativos da molécula reduzindo as interações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo, elevando a volatilidade dos compostos que sofrem essas modificações (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006 *apud* MACHADO, 2015).



Onde: TMS (trimetilsilil)

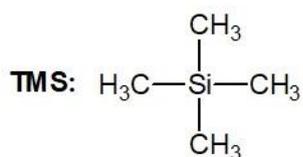


Figura 14: Reação de derivatização usando o BSTFA + TMCS

A facilidade de substituição dos grupos funcionais pelo reagente derivatizante segue a seguinte ordem: álcoois > fenóis > ácidos carboxílicos > aminas e amidas. As

reações de silição devem ocorrer na ausência de água e podem ser catalisadas pelo aquecimento do meio reacional (ORATA, 2012).

Além desses trabalhos, podemos destacar um estudo realizado por Machado (2015), em Curitiba, onde foram determinados contaminantes com classes de contaminantes semelhantes às abordadas nesse trabalho, utilizando a GC-MS e a etapa de derivatização para aumentar a eficiência do método. Nesse trabalho, após a reação de derivatização foram obtidas áreas 3 a 4 vezes maiores quando comparadas aos mesmos compostos na forma não derivatizada. Dessa forma, o protocolo de derivatização foi utilizado para análise das amostras e as substâncias encontradas nas foram: cafeína, atrazina, triclosan, ibuprofeno e bisfenol A. A cafeína (3,9 a 236 ng L⁻¹) foi detectada em todas as amostras e a segunda substância mais encontrada foi a atrazina (75% das amostras), em concentrações de 3,0 a 15,0 ng L⁻¹.

2.5 Planejamento de experimentos

O termo otimização tem sido usado por um longo tempo na química buscando melhorar o desempenho de um processo, método ou sistema, para obter o máximo benefício possível. Obter essas condições ideais é uma tarefa que envolve a avaliação da influência de vários fatores que tradicionalmente tem sido realizado monitorando a influência de um fator de cada vez na resposta experimental. No entanto, a otimização univariada, apresenta desvantagens tais como grande demanda de tempo, má interpretação dos resultados, pois esse tipo de estudo não inclui o importante efeito de interação entre as variáveis presentes, além do grande número de experimentos que leva ao excesso no consumo de reagentes e materiais (ARAUJO; BRERETON, 1996; BEZERRA et al., 2008).

Visando solucionar esse problema, a otimização de procedimentos analíticos têm sido realizados usando a estatística multivariada, conhecida como planejamento de experimentos que permite a avaliação de duas ou mais variáveis independentes (efeitos) e os efeitos de interação entre essas variáveis (variáveis dependentes) (DAVIDIDOU, 2018; KUMAR et al., 2015; MARTÍNEZ-URUÑUELA; GONZÁLEZ-SÁIZ; PIZARRO, 2004; RODRIGUES et al., 2014).

No planejamento fatorial, o número de experimentos (N) é determinado pela expressão $N = 2^k$, onde k define o número de fatores a serem avaliados. Para avaliar o

efeito de qualquer fator sobre uma dada resposta é necessário variar o nível. Dessa forma, os fatores são variados em dois níveis, (+) nível alto e (-) nível baixo, à qual são atribuídos valores máximos e mínimos e é observado o resultado que essa variação produz na resposta (NETO; SCARMINIO e BRUNS, 2010).

A determinação do erro experimental do planejamento é realizada através de repetições autênticas, havendo a necessidade de duplicar o número de experimentos. Entretanto, é utilizada como alternativa a realização dos experimentos com ponto central (0). Para utilizar esse recurso, o número de experimentos no ponto central deve corresponder de 25 a 30% do número de experimentos (FERREIRA, 2015).

Nos procedimentos de otimização de metodologia muitas vezes é necessária a determinação de variáveis em função de mais de uma substância ou elementos ao mesmo tempo. Dessa forma, a função Resposta Múltipla (RM) auxilia na determinação dessas condições baseada no somatório das respostas normalizadas. A normalização é feita dividindo-se a resposta de um composto pelo maior valor da série, ou seja, o valor obtido pela sua resposta pelo maior valor de resposta para aquele composto (FERREIRA, 2015). A RM tem sido utilizada por pesquisadores empregando diferentes ferramentas quimiométricas.

No trabalho desenvolvido por Silva e colaboradores (2013), a função RM foi utilizada para otimização de um procedimento de extração em fase sólida para seis compostos orgânicos em protetores solares para análise dos filtros UV, usando um Planejamento Fatorial Fracionário (PFF). Em outro trabalho realizado por Araujo e colaboradores (2013) empregou-se a RM com o objetivo de otimização das condições operacionais de um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado para determinação da composição mineral de quatorze elementos químicos em comidas de gatos e cachorros.

O planejamento de experimentos deve envolver também a validação do modelo desenvolvido. Isso permite a consolidação do trabalho de otimização e avaliação de que o modelo escolhido seja significativamente correto e avalia o ajuste entre os dados. A validação de modelos quadráticos, mais comumente empregados, pode ser feita utilizando várias ferramentas estatísticas, que utilizam os dados experimentais. Um dos métodos mais confiáveis para avaliar a qualidade do ajuste do modelo é empregar a análise de variância (ANOVA) (FERREIRA, 2015; SOUZA et al., 2015;).

Logo, espera-se que um bom modelo apresente uma regressão significativa e falta de ajuste não significativa. Assim, espera-se que a maior parte da variação total das observações esteja em torno da média, sendo descrita pela equação da regressão e o restante com os resíduos. Também é desejável que a variação associada aos resíduos seja considerada erro puro (associado aos erros experimentais) e não uma falta de ajuste do modelo.

Em um sistema, diversos fatores podem interferir na resposta desejada. Nesse sentido, um experimento de triagem é necessário visando determinar as variáveis experimentais e interações entre as variáveis que tem influência significativa sobre as respostas (LUNSTEDT et al, 1998). Posteriormente, deve-se escolher qual planejamento usar para estimar a influência das diferentes variáveis no resultado.

Após a realização dos experimentos de triagem, os efeitos mais significativos são selecionados e segue com a otimização com o objetivo de encontrar o valor das variáveis que irão produzir a melhor resposta desejada, ou seja, encontrar a região ótima na superfície definida pelos fatores, sendo viável dessa forma gerar uma superfície de resposta. A técnica multivariada de superfície de resposta (RSM) (do inglês *Response Surface Methodology*) emprega ferramentas estatísticas e matemáticas baseada no ajuste de uma equação polinomial aplicada aos dados experimentais e que devem descrever o comportamento de um conjunto de dados para obter previsões estatísticas (BEZERRA et al., 2008).

As principais metodologias de superfície de respostas são: planejamento composto central (CCD do inglês *Central Compound Design*), planejamento Box Behnken, matriz de Doehlert e planejamento fatorial de três níveis. Esses modelos são estabelecidos mediante figuras geométricas, tendo níveis e valores codificados nessas figuras. Os modelos quadráticos são avaliados considerando as respostas experimentais e os valores obtidos pelos modelos (FERREIRA, 2015).

O planejamento CCD apresenta vantagens como pequeno número de fatores e pouco número de ensaios. Ele deve apresentar um planejamento fatorial completo de dois níveis. Além de experimentos no ponto central ($x_i = 0$, para todo i), experimentos nos pontos axiais ($x_i = \pm\alpha$, onde $x_j \neq x_i$) e $\alpha = \sqrt[4]{2^k}$ (LANGSRUD; ELLEKJAER; NAES, 1994). A figura 15 mostra o desenho os pontos experimentais no sistema de coordenadas definidas pelos eixos X_i .

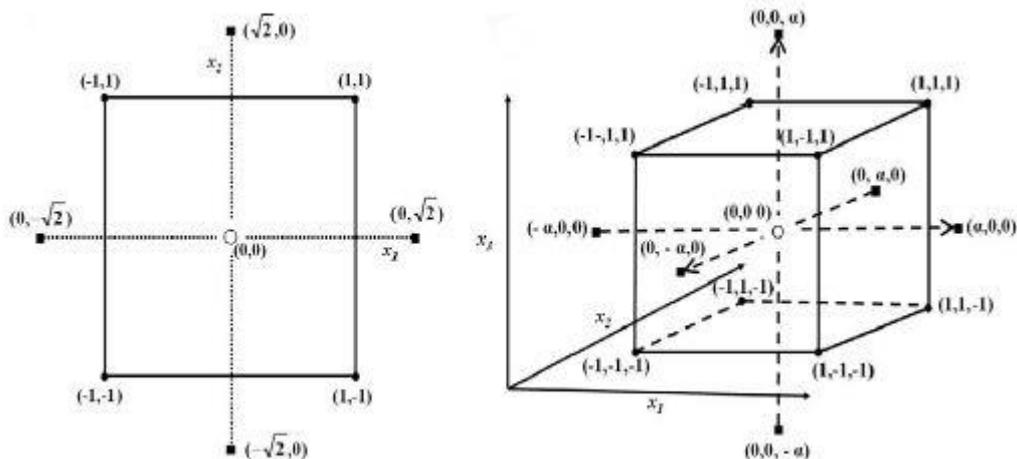


Figura 15: Figura geométrica gerada a partir de planejamentos compostos centrais: a) $k = 2$ e $\alpha = 1,414$,
 b) $k = 3$ e $\alpha = 1,682$. (●) planejamento fatorial, (■) pontos axiais e (□) ponto central.

Neste trabalho foi utilizado o planejamento experimental 2^2 com ponto central para triagem das variáveis com efeitos mais significantes e posteriormente foi usado um planejamento CCD utilizando a técnica RSM para a otimização dos parâmetros para a reação de derivatização, buscando um menor número de experimentos e uma resposta eficiente.

2.6 Materiais e métodos

2.6.1 Equipamentos utilizados na pesquisa

- Cromatógrafo a gás (Shimadzu GC-2010) acoplado ao detector de espectrometria de Massas (Shimadzu GCMS-Q Plus) e coluna capilar SBL-5ms (5% difenil 95% dimetilpolisiloxano), (Supelco, USA) 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno.
- *Manifold* para Extração em Fase sólida (Supelco) de 20 posições acoplado à bomba a vácuo (Quimis, modelo Q-355J).
- Condutivímetro (Bio Cristal, modelo: CA150).
- pH-metro (Micronal, modelo: B 374)
- Balança analítica (Shimadzu, Modelo: AY220 de capacidade máxima de medida 220 g).
- Sistema de água ultra-pura Sartorius (modelo: Arium mini, Lâmpadas 185/254 nm).
- Micro seringa para líquidos de 10 μ L (Hamilton).

- Micro pipetadores automáticos (Gopet de 100 a 1000 μL) e (Gilson de 20 a 100 μL).

2.6.2 Reagentes e soluções

Nas etapas de otimização e determinação de contaminantes em matrizes aquosas foram utilizados 9 padrões de compostos orgânicos considerados de preocupação emergente que estão listados na **Tabela 4**.

Tabela 4: Lista de padrões utilizados no trabalho

Substância	Sigla	Fórmula	Massa Molar	Fornecedor	Pureza (%)
4-nonilfenol	NON	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$	220	Sigma Aldrich	> 99
Etinilestradiol	EE2	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_2$	296	Sigma Aldrich	98
Atrazina	ATZ	$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{ClN}_5$	215	Sigma Aldrich	99
Bisfenol A	BPA	$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2$	228	Sigma Aldrich	97
Bisfenol A 16 D	BPA 16 D	$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2$	244	Supelco	> 99
Cafeína	CAF	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$	194	Sigma Aldrich	99
Trifenilfosfato	TFF	$\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{O}_4\text{P}$	326	Sigma Aldrich	
Simazina	SMZ	$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{ClN}_5$	201	Sigma Aldrich	> 99
Triclosan	TCS	$\text{C}_{12}\text{H}_7\text{Cl}_3\text{O}_2$	288	Sigma Aldrich	> 99

Os solventes utilizados foram grau pesticida ou HPLC (Tedia) e água tipo 1 (ultra-pura) obtida por meio de um sistema de purificação (Sartorius).

As soluções dos padrões de concentração 400 mg L^{-1} para o preparo da curva analítica foram preparadas pesando-se em balança analítica (Shimadzu, modelo: AY220 de capacidade máxima de medida 220 g) cada um dos compostos e dissolvendo em metanol. As concentrações das soluções variaram: 0,25; 0,5; 1; 5; 10 e $25 \mu\text{g L}^{-1}$. Essas mesmas soluções foram usadas na fortificação das amostras para os ensaios de recuperação. A princípio, o padrão de Bisfenol-A 16 D foi usado como padrão interno na

concentração $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Na segunda parte do trabalho, na qual foi acrescida a etapa de derivatização ao procedimento, este foi usado como *surrogate* na concentração $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

2.6.3 Otimização da metodologia para SPE

O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística muito empregada para planejamento e otimização de experimentos. Portanto, através dessa avaliação foi possível determinar as melhores condições de extração de análise dos compostos abordados nesse estudo.

Dessa forma, o planejamento fatorial foi 2^3 , onde foram analisadas 3 variáveis em 2 níveis (alto e baixo), totalizando 8 experimentos. As variáveis avaliadas foram: número de cartuchos (variável 1), tipo de solvente (variável 2) e ajuste de pH (variável 3). As variáveis, níveis e condições experimentais são apresentadas na **Tabela 5** e **Figura 16**.

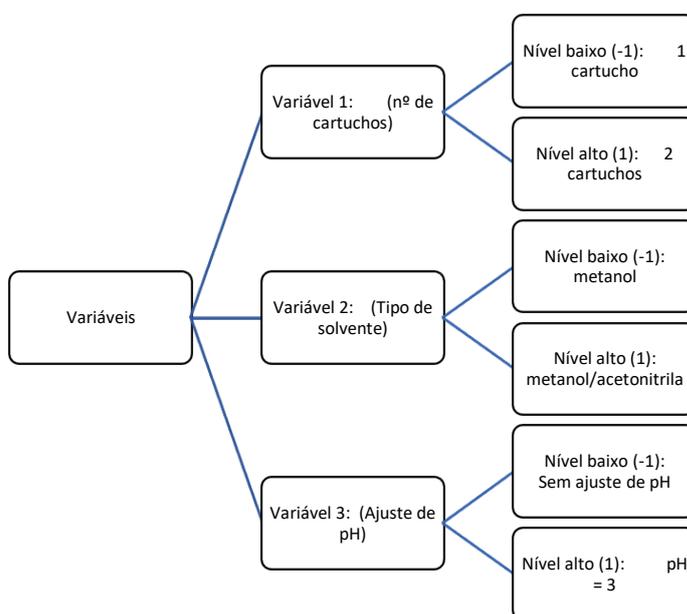


Figura 16: Variáveis e Níveis do Planejamento fatorial

Tabela 5: Condições avaliadas na otimização do método de extração

Experimento	Variável 1	Variável 2	Variável 3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1

O processo de Extração por SPE foi realizado usando o cartucho HLB (do inglês Hydrophilic-Lipophilic-Balanced) contendo 500 mg de sorbente (1 ou 2 cartuchos), da marca Oasis Waters. O sistema SPE é composto de *manifold* (Supelco) acoplado a uma bomba de vácuo, conforme apresentado na **Figura 17**.

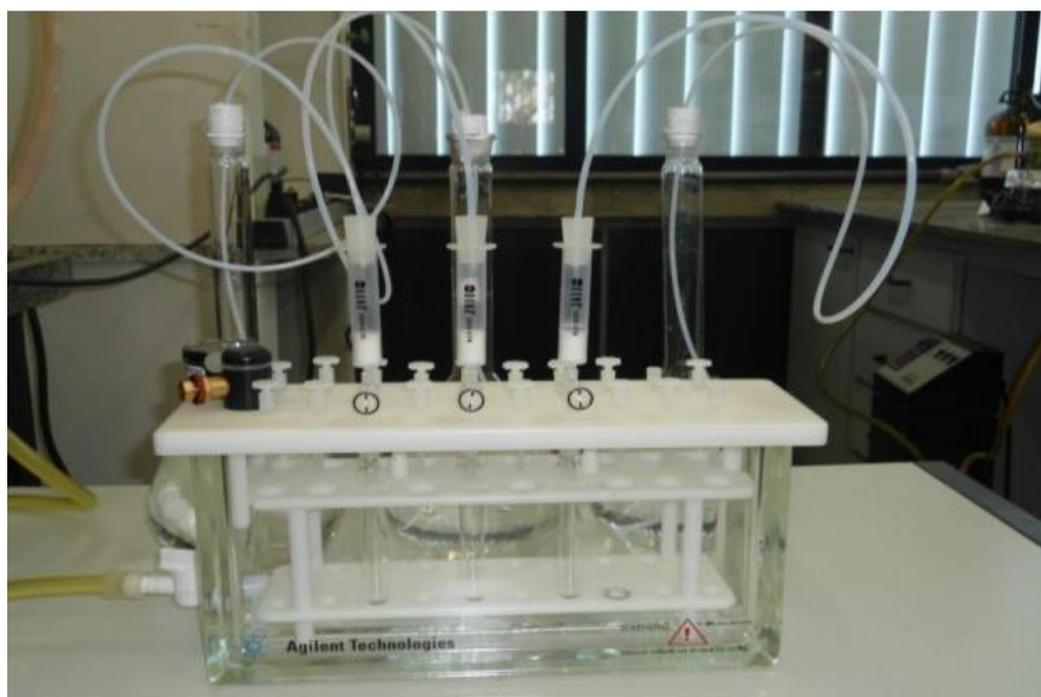


Figura 17: Sistema de Extração em Fase Sólida

O experimento foi realizado fortificando-se (contaminando água tipo 1) com concentração conhecida de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ dos padrões estudados e volume final de 2 L. Antes da extração, foi realizado o ajuste de pH quando necessário. O processo de extração (figura 18) foi realizado com os seguintes passos:

1. Condicionamento do SPE: a) Experimentos com apenas metanol – 3 alíquotas de 2,5 mL de metanol + 10 mL de água tipo 1 e b) Experimentos com Metanol/Acetonitrila – 2 alíquotas de 2,5 mL de metanol e uma alíquota de 2,5 mL de acetonitrila + 10 mL de água tipo 1.
2. Passagem da amostra: cada 2 L de amostra fortificada foram passados por 2 cartuchos (1 L em cada cartucho) de amostra.
3. Preparação do cartucho para eluição: Após a passagem da amostra é feita uma lavagem com a passagem de 10 mL de água tipo 1, para a remoção de possíveis interferentes. Posteriormente, deixa-se passar ar por cerca de 30 minutos pelo material sorbente, evitando que contenha água no extrato final.
4. Eluição: A eluição foi realizada de acordo com o tipo de solvente de cada experimento (a e b). Após o processo de extração, as amostras foram evaporadas até a secura e foram ressuspensas em 250 μL de padrão interno (20 mg L^{-1}) e 250 μL de metanol, obtendo um volume final de 500 μL de extrato final.

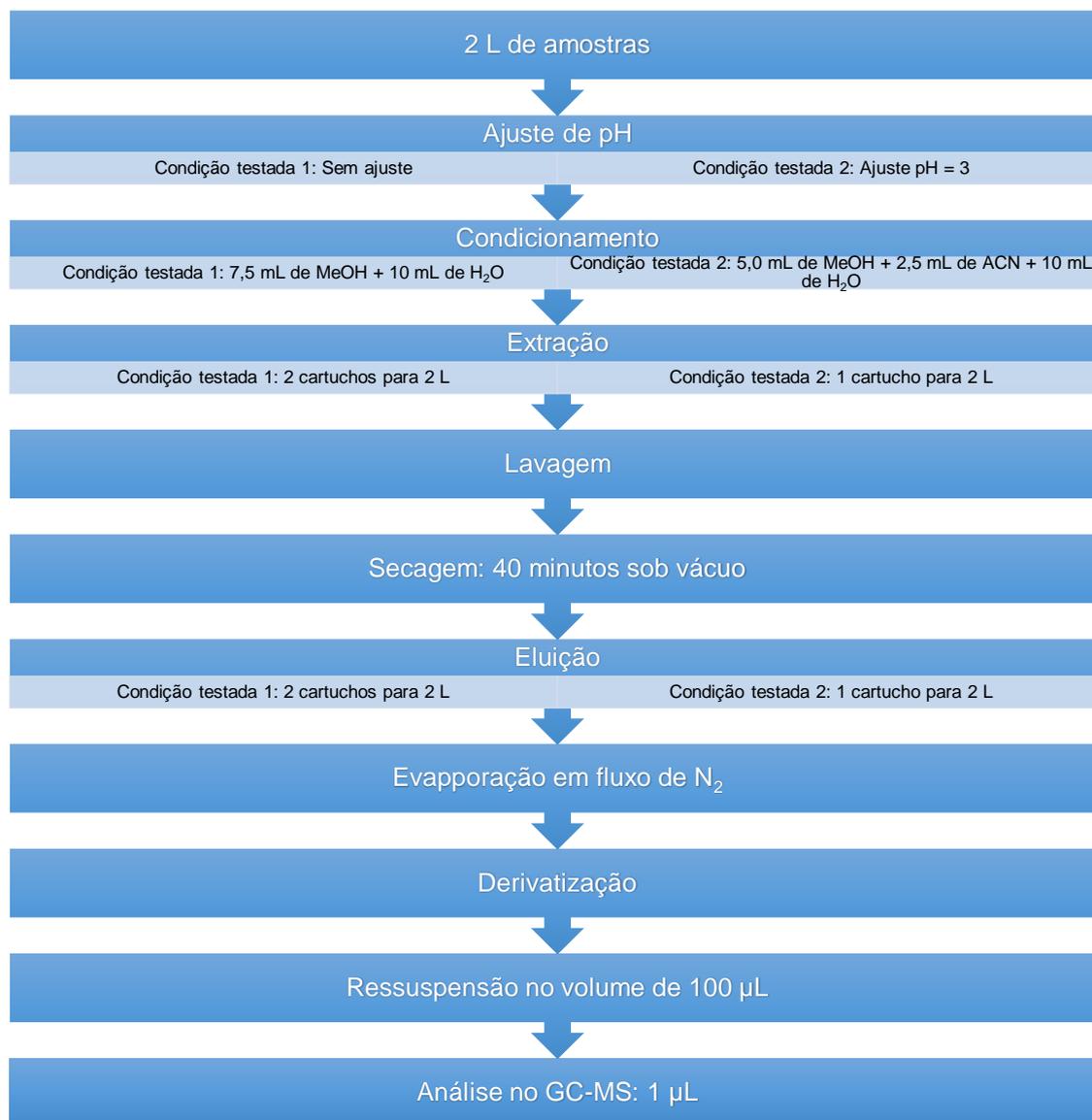


Figura 18: Fluxograma com as etapas da Extração por SPE

Após a obtenção do extrato final, as amostras fortificadas foram injetadas no GC-MS utilizando o método SIM (do inglês, *Selective Ion Monitoring*). O íon mais abundante foi usado para quantificação e o segundo íon mais abundante e o íon molecular foram usados para confirmação da presença do analito (**Tabela 6**).

Tabela 6: Método SIM – íons selecionados para quantificação e confirmação após reação de derivatização

Padrões	m/z (1) (Quantificação)	m/z (2) (Confirmação)	m/z (3)* (Confirmação)
4 – nonilfenol	179	292	292
Etinilestradiol	285	368	-
Atrazina	200	215	215
Bisfenol A	357	372	372
Bisfenol A 16 D	368	-	-
Cafeína	194	109	194
Simazina	201	186	201
Triclosan	200	345	345

*Quando houver e em alguns casos o íon molecular coincide com m/z 1 ou m/z 2.

As condições cromatográficas são apresentadas na **Tabela 7**. A coluna cromatográfica usada foi uma coluna capilar SBL-5ms Supelco (30 m, ID 0,25 mm, 0,25 µm).

Tabela 7: Condições cromatográficas de análise

<i>Parâmetros</i>			
<i>Modo</i>	<i>Split</i>		
<i>Gás de arraste</i>	Hélio		
<i>Temperatura do injetor</i>	250°C		
<i>Temperatura da coluna</i>	80°C		
<i>Temperatura da fonte de íons</i>	200°C		
<i>Fluxo Total</i>	18,2 mL min ⁻¹		
<i>Razão de Split</i>	10,0		
<i>Rampa de aquecimento</i>	Razão (°C min ⁻¹)	Temperatura (°C)	Tempo de espera (min)
	-	80	1.00
	10	160	0.00
	6,5	250	0.00
	20	300	10.00

Após analisadas as áreas dos picos das duas curvas analíticas, os resultados foram obtidos em termos de porcentagem de recuperação dos analitos estudados. A partir dos resultados do planejamento fatorial foram apontadas modificações, reformulando o método para aplicação em amostras reais.

2.6.4 Curva analítica em fase aquosa

A curva analítica em fase aquosa busca refazer todos os passos de extração com padrões de concentração conhecida a fim de obter o quanto é perdido durante todo o procedimento de tratamento da amostra. Com essa finalidade, uma solução estoque individual de cada padrão foi preparada na concentração de 400 mg L⁻¹ em metanol. Em seguida, as soluções foram preparadas em 3 diferentes faixas de concentrações. Solução 1, contendo 17- β -etinilestradiol e cafeína nas concentrações 250; 500; 750; 1000; 1260; 1494 e 1750 μ g L⁻¹. Solução 2 com os padrões Nonilfenol e bisfenol A nas concentrações 9,84; 90,53; 172,2; 246; 324,7; 413,28 e 490 μ g L⁻¹ e a Solução 3 contendo os padrões atrazina, simazina e triclosan nas concentrações 49,8; 182,3; 315,4; 448,2; 581; 697,2 e 830 μ g L⁻¹. Essas faixas de concentração foram escolhidas em virtude das concentrações encontradas nas amostras reais.

Após a fortificação das amostras foi realizado o procedimento de extração conforme a descrição no item 4.3 usando as melhores condições definidas pelo planejamento fatorial, tais como: a) uso de 2 cartuchos para a passagem da amostra; b) o condicionamento e eluição utilizando metanol e acetonitrila; c) com ajuste de pH =3.

Aos extratos finais foram adicionados 250 μ L de padrão interno (Bisfenol A 16 D) 20 mg L⁻¹ e 250 μ L de metanol e, então os extratos foram injetados no GC-MS, também descrito no item 4.3.

2.6.5 Otimização da etapa de derivatização

Essa etapa foi acrescentada a partir da 3ª coleta a fim de melhorar os limites de detecção da técnica. A otimização da etapa de derivatização ocorreu através da utilização do planejamento fatorial, buscando encontrar as condições adequadas para a determinação simultânea dos 8 compostos emergentes. O planejamento fatorial

empregado foi 2^2 , 2 variáveis em dois níveis, além da avaliação da triplicata do valor médio entre os níveis (Ponto Central). As variáveis e os níveis são apresentados na **tabela 8**.

Tabela 8: Condições avaliadas na otimização da etapa de derivatização

Variáveis	Nível baixo (-1)	Ponto Central (0)	Nível alto (1)
Volume de derivatizante	20 μL	40 μL	60 μL
Potência do microondas	3	5	7

O micro-ondas doméstico (Panasonic, Modelo: NN-ST357WRPH) usado apresenta uma variação de potência entre 1 e 10. A determinação das potências aproximadas referentes àquelas utilizadas no planejamento fatorial (3, 5, e 7) foi realizada através de cálculos que usam as equações abaixo (**Equação 1 e 2**). Estas equações relacionam a quantidade de calor transferido pelos micro-ondas para a substância em um intervalo de tempo. Para isso, foram realizados 3 experimentos utilizando água, nas potências estudadas.

$$Q = m \cdot c \cdot (T_f - T_i) \quad (\text{Equação 1})$$

$$P = \frac{E}{\Delta t} \quad (\text{Equação 2})$$

Para a realização dos experimentos de derivatização, alíquotas de 50 μL da solução mix de padrões de 40 mg L^{-1} foram adicionadas em *via/s* de 2,0 mL. O solvente foi evaporado até a *secura* e, então foram acrescentados os volumes de derivatizante (BSTFA) referentes a cada nível do experimento (**Tabela 8**). As reações de derivatização foram colocadas em forno micro-ondas por 5 min e após transcorrido esse tempo, os vials foram levados à *secura* e foram ressuspensos em 100 μL do solvente hexano.

2.7 Resultados e discussão

2.7.1 Otimização da metodologia para SPE usando Planejamento Fatorial 2³

A otimização das melhores condições para extração dos compostos abordados nesse estudo foi realizada através de um planejamento fatorial 2³, buscando avaliar quais são as melhores condições de extração para a determinação dos compostos abordados nesse estudo. Nesse sentido, as variáveis que poderiam interferir na resposta dos analitos, no momento do procedimento de extração são: a) número de cartuchos, por se tratar de uma matriz complexa e necessidade de alto limite de detecção. A quantidade de massa retida no sorbente não deve saturar para evitar perda de analito durante a percolação da amostra; b) tipo de solvente: esses devem ser escolhidos de acordo com a afinidade pelos analitos para melhor recuperação; c) ajuste para pH ácido, pois ao acidificar, o meio diminui a dissociação de compostos fracamente ácidos, podendo ligar-se mais fortemente ao sorbente e aumentando a recuperação.

Em um primeiro momento foram avaliadas as respostas múltiplas através da porcentagem dos efeitos conforme apresentado no gráfico de representação dos efeitos (Figura 25). A partir dos resultados foram considerados os efeitos mais relevantes, e a partir de então avaliados os erros experimentais das medidas, prosseguindo os cálculos do planejamento.

Dessa forma, foi analisado o gráfico de representação dos efeitos que mostra a porcentagem dos efeitos principais, secundários e terciários. O efeito principal é individual de cada variável ou fator (Ex. Efeito 1 referente ao número de cartuchos). Efeitos secundários são os efeitos das interações (Ex. Efeito 1-2, efeito da variável 1 com a variável 2, ou seja, o efeito do número de cartuchos associado com o tipo de solvente). Por fim, o efeito terciário é o efeito das três variáveis juntas (Ex. Efeito 123, efeito das variáveis número de cartuchos, tipo de solvente e necessidade de ajuste de pH, respectivamente).

O resumo das informações utilizadas no desenvolvimento do planejamento fatorial é apresentado na **tabela 9**.

Tabela 9: Matriz de dados do planejamento fatorial e resposta das recuperações.

EXPER.	Nº DE CART.	TIPO DE SOLVENTE	AJUSTE DE PH	PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO (%)						
				EE2	NON	ATZ	SMZ	BPA	CAF	TCS
1	-1 (1)	-1 (MeOH)	-1 (s/ ajuste)	28,4	62,4	88,1	49,6	1,3	96,4	37,4
2	+1 (2)	-1 (MeOH)	-1 (s/ ajuste)	50,2	32,4	69,9	81,0	76,7	60,2	39,7
3	-1 (1)	+1 (MeOH/ACN)	-1 (s/ ajuste)	53,1	24,8	64,9	1,19	68,1	38,8	35,3
4	+1 (2)	+1 (MeOH/ACN)	-1 (s/ ajuste)	52,3	25,3	66,0	85,0	72,4	56,9	29,8
5	-1 (1)	-1 (MeOH)	+1 (3,0)	44,1	25,1	55,4	69,6	45,9	47,6	36,5
6	+1 (2)	-1 (MeOH)	+1 (3,0)	28,2	24,1	38,6	54,7	39,6	33,9	29,4
7	-1 (1)	+1 (MeOH/ACN)	+1 (3,0)	33,6	25,7	42,8	58,1	33,4	36,5	24,8
8	+1 (2)	+1 (MeOH/ACN)	+1 (3,0)	99,1	52,6	18,6	155,5	119,9	17,6	99,6

Os resultados do planejamento fatorial 2^3 mostraram que os efeitos principais que apresentaram a maior relevância são relativos aos parâmetros: a) número de cartuchos (Efeito 1) e b) ajuste de pH (Efeito 3), conforme é mostrado na **figura 23**. A variável 2, referente ao tipo de solvente, não apresentou efeito significativo, ou seja, ela não interfere significativamente na melhora da resposta analítica do processo de extração, logo, ela foi rejeitada e prosseguiu-se com os cálculos do planejamento sem essa variável. Embora o efeito principal da variável dois não tenha sido significativo, o efeito secundário da interação 12 apresentou a maior porcentagem de efeito. Dessa forma, essa interação deve ser considerada nos cálculos.

A partir da análise do gráfico de probabilidade (**Figura 20**) ficou evidente que a variável três (pH) deve estar em nível baixo (sem a necessidade de ajuste de pH), quadrante esquerdo inferior, pois quando está em nível alto a Resposta Múltipla (RM) diminui. A interação da variável 12 foi alta, dessa forma essas duas variáveis devem estar no mesmo nível, como a variável Um (número de cartuchos) que possui efeito alto e positivo e a variável dois deve acompanhar estando também em nível alto. Portanto, deve ser utilizada a mistura de solventes metanol/acetonitrila (2:1), ou seja, 2 alíquotas de 2,5 mL de metanol e 1 alíquota de 2,5 mL de acetonitrila. O resumo das melhores condições para a extração dos compostos emergentes é apresentado na **tabela 10**.



Figura 19: Representação dos efeitos dos parâmetros avaliados

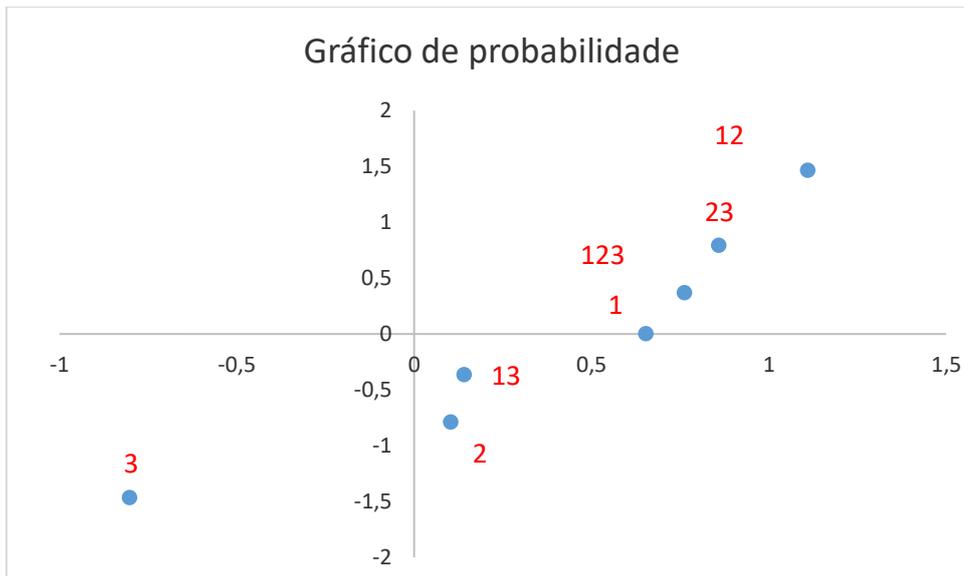


Figura 20: Probabilidade nos diferentes níveis apresentados.

Tabela 10: Resultados para as variáveis avaliadas pelo planejamento fatorial 2^3 para otimização do processo de extração

Variáveis	Condições otimizadas
1. Número de cartuchos	2 cartuchos para cada litro de amostra (+)
2. Tipo de solvente	Mistura de solventes: metanol/acetonitrila (+)
3. Ajuste de pH	Sem ajuste de pH (-)

Uma importante etapa no desenvolvimento do planejamento fatorial é a validação do modelo escolhido, nesse caso o modelo quadrático, visando avaliar a se o ajuste do modelo escolhido é adequado ao conjunto de dados do planejamento. A partir dos efeitos calculados é possível estimar o erro experimental das medidas. Dada a repetição feita numa determinada combinação de níveis podemos calcular a variância e através dessa calcular o erro-padrão de um efeito. Esses cálculos foram realizados para cada efeito e foram obtidos os valores $s^2 = 1,28$ e erro padrão de um efeito = 0,80. Um intervalo de

confiança para os valores dos efeitos é possível ser calculado a partir do erro-padrão, usando a distribuição de *Student*.

O intervalo de confiança é calculado a partir do produto do valor do erro-padrão (0,8006) pelo ponto da distribuição de *Student* (2,132), para quatro graus de liberdade e 0,005 de probabilidade. Esse cálculo implica que somente serão significativos os erros experimentais cujas estimativas forem superiores ao valor absoluto do limite de confiança. Conforme a **Figura 21** apresenta, nos 3 parâmetros avaliados, todos os intervalos de confiança calculados incluíram o valor zero, mostrando uma falta de ajuste não significativa.

Ou seja, o tratamento estatístico se ajusta ao modelo quadrático no nível de confiança de 95%. Portanto, temos a expectativa que a maior parte da variação das observações esteja em torno da média e o restante com os resíduos. Além da variação associada aos resíduos estar associada ao erro puro (erro experimental) e não com a falta de ajuste do modelo. (FERREIRA, 2015).

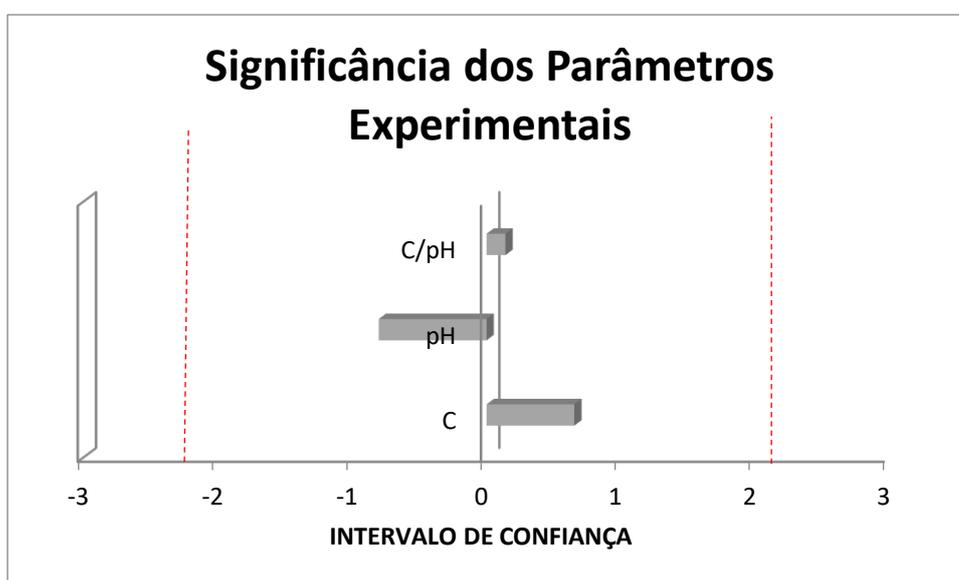


Figura 21: Intervalo de confiança para os valores dos efeitos. * C/pH – Efeito do cartucho e do ajuste de pH. **C – Efeito do cartucho.

2.7.2 Otimização da etapa de derivatização

A presença da etapa de derivatização é frequente quando se utiliza a técnica de GC-MS (ZHANG, Z.; HIBBERD; ZHOU, 2006; POOJARY; PASSAMONTI, 2016; LÓPEZ-SERNA et al., 2018; SAJID; PŁOTKA-WASYLKA, 2018). No entanto, não há um método

específico ou validado para a determinação de uma variedade de contaminantes em matrizes aquosas ambientais.

Nesse sentido, foi realizado um planejamento fatorial para determinação das melhores condições de derivatização para os analitos propostos. Os compostos atrazina, simazina e cafeína não sofrem reação com o agente derivatizante BSTFA + (TMS), sendo possíveis de análise direta por GC-MS. Os demais foram detectados e quantificados com relações m/z diferentes pelo método SIM e os íons de identificação e quantificação são apresentados na **Tabela 11**. Devido às dificuldades de trabalho e alto custo, o diclofenaco não foi analisado.

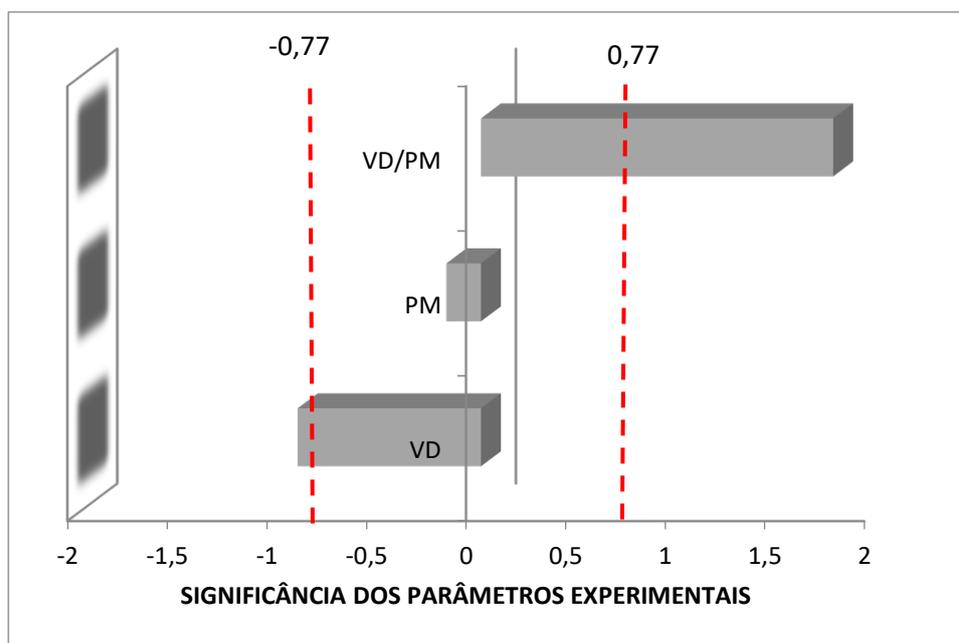
Tabela 11: Valores de m/z dos íons de quantificação e detecção dos analitos após reação de derivatização

SUBSTÂNCIA	MASSA MOLAR (G MOL⁻¹)	MASSA MOLAR* (G MOL⁻¹)	M/Z DE QUANTIFICAÇÃO	M/Z DE IDENTIFICAÇÃO
NON	220	292	179	292
EE2	296	440	285	368
ATZ	215	215	200	215
BPA	228	372	357	372
CAF	194	194	194	109
SMZ	201	201	201	186
TCS	287	361	200	345

*Massa Molar após a reação de derivatização

O planejamento fatorial 2² com ponto central foi usado para determinação das melhores condições para a reação de derivatização. Nesse tipo de reação, alguns fatores são importantes, tais como, o volume do reagente derivatizante (Efeito 1), e a potência do micro-ondas (Efeito 2). A partir das respostas das áreas dos padrões injetados dos analitos foram calculados seus efeitos e os erros experimentais. Os efeitos significativos

foram analisados com 95% de confiança e 2 graus de liberdade. Os efeitos mais representativos são apresentados na **Figura 22**.



*Efeito secundário de interação entre as variáveis (VD) e (PM)

Figura 22: Representação gráfica da significância das variáveis estudadas

Através da análise do gráfico é possível concluir que os efeitos mais significativos foram: a) o efeito principal - Volume de Derivatizante (VD) e b) o efeito secundário de interação -Volume de Derivatizante (VD) associado ao efeito de Potência do Microondas. No entanto, essas variáveis foram significativas e ultrapassam o limite do intervalo de confiança, apresentando resultado significativo para falta de ajuste. Dessa forma, foi utilizado outro modelo para desenvolvimento do planejamento fatorial. Nesse momento foi possível calcular os valores críticos, ou seja, as condições ideais para utilização das variáveis através para utilização na determinação de COE nas amostras. Os valores foram calculados baseados na equação que é utilizada para decodificar as variáveis. Através da derivada da equação (5) foram obtidos os valores de $x_1=0,098$ e $x_2=0,5199$. Para obtenção dos valores críticos, ou seja, as condições ideais, as variáveis (x_1 e $x_2 = X_n$) foram substituídas na Equação 6. Os cálculos mostraram que o valor ótimo para VD é $41,96 \mu\text{L}$ e para PM é $6,04$. As condições utilizadas para o tratamento das amostras foi de $42 \mu\text{L}$ para o volume de derivatizante e a potência do micro-ondas foi de 6.

$$X_n = (Z_r - Z_m)/(\Delta Z/2) \quad \text{(Equação 3)}$$

Sendo:

X_n : valor codificado;

Z_r : valor real

Z_m : média dos valores dos níveis +1 e -1;

ΔZ : variação entre os valores do nível +1 e -1.

Para continuação do planejamento fatorial, houve um ajuste através da adição de mais quatro pontos, para utilizar o modelo Planejamento Compostos Centrais (CCD). Esses pontos acrescentados representam os experimentos nos pontos axiais, conforme foi justificado na revisão da literatura. A matriz com base no CCD 2^2 é observada na **tabela 12** totalizando 9 experimentos.

Tabela 12: Matriz do Planejamento Composto Central com 2 variáveis:

EXPERIMENTO	VD (μL)	PM (W)	
1	-1 (20)	-1 (3)	Planejamento fatorial
2	+1 (60)	-1 (3)	
3	-1 (20)	+1 (7)	
4	+1 (60)	+1 (7)	
5	0 (40)	0 (5)	Ponto central
6	$-\sqrt{2}$ (12)	0 (5)	Pontos axiais
7	$+\sqrt{2}$ (70)	0 (5)	
8	0 (40)	$-\sqrt{2}$ (2)	
11	0 (40)	$+\sqrt{2}$ (8)	
6	0 (40)	0 (5)	Repetições do ponto central
7	0 (40)	0 (5)	

Os pontos experimentais $-\sqrt{2}$ e $+\sqrt{2}$ foram calculados a partir da equação 3.

Em seguida foi proposto um modelo experimental, na qual um polinômio com duas variáveis $x_1(\text{VD})$ e $x_2(\text{PM})$, VD – Volume de Derivatizante e PM – Potência do Microondas. A **Equação 4** abaixo, representa o modelo algébrico para obtenção das condições ótimas para essas duas variáveis. O termo b_0 é o valor da média dos pontos centrais e de b_1 a b_3 são os coeficientes do modelo que são determinados usando a **Equação 5**. Onde X é a matriz de contraste, X^t é a matriz transposta de X e Y é a média das intensidades normalizadas, obtendo a **Equação 6**.

$$Y = b_0 + b_1(x_1) + b_2(x_2) - b_1 x_1^2 - b_2 x_2^2 - b_3 (x_1x_2) \text{ (Equação 4)}$$

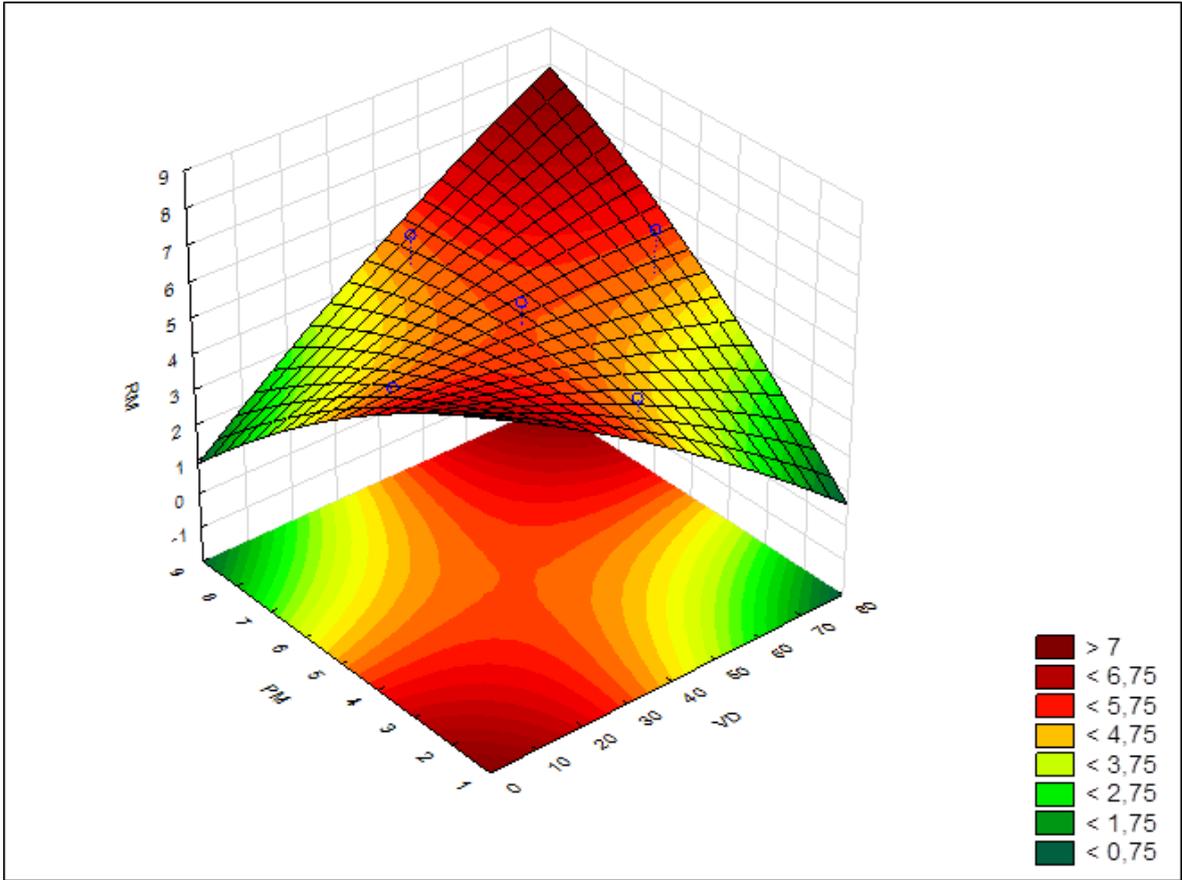
$$b = (X^t X)^{-1}(X^t Y) \text{ (Equação 5)}$$

$$Y = 5,26 - 0,000977 x_1 - 0,0611176 x_2 - 0,095711 x_1^2 - 0,153529 x_2^2 + 0,88 x_1x_2 \text{ (Equação 6)}$$

A partir do modelo descrito pela equação 6 foi possível gerar a superfície de resposta para as variáveis VD e PM (**Figura 23 a) e b)**). A **figura 23 a)** apresenta a superfície de resposta que ilustra as condições ótimas para a reação de derivatização para as variáveis Volume de derivatizante (VD) e Potência do Micro-ondas (PM) **e 23 b)** um ampliação da superfície de resposta.

Através da superfície de resposta do modelo obtida é possível concluir que à medida que aumenta ou diminuiu ambas as variáveis ao mesmo tempo obtém-se um aumento da resposta múltipla, desde que varie as duas variáveis ao mesmo tempo e no mesmo nível. O valor crítico baseado na superfície de resposta foram 39 µL de volume de derivatizante e 5 para potência do micro-ondas. Valores semelhantes àqueles obtidos através dos cálculos. Para todo o procedimento de análise a partir da terceira campanha foram utilizados os valores de 42 µL de volume de derivatizante e 6 para potência do micro-ondas, pois foram as condições utilizadas desde o início do procedimento de reação de derivatização. Na **figura 23** podemos concluir que não houve falta de ajuste no modelo proposto.

a)



b)

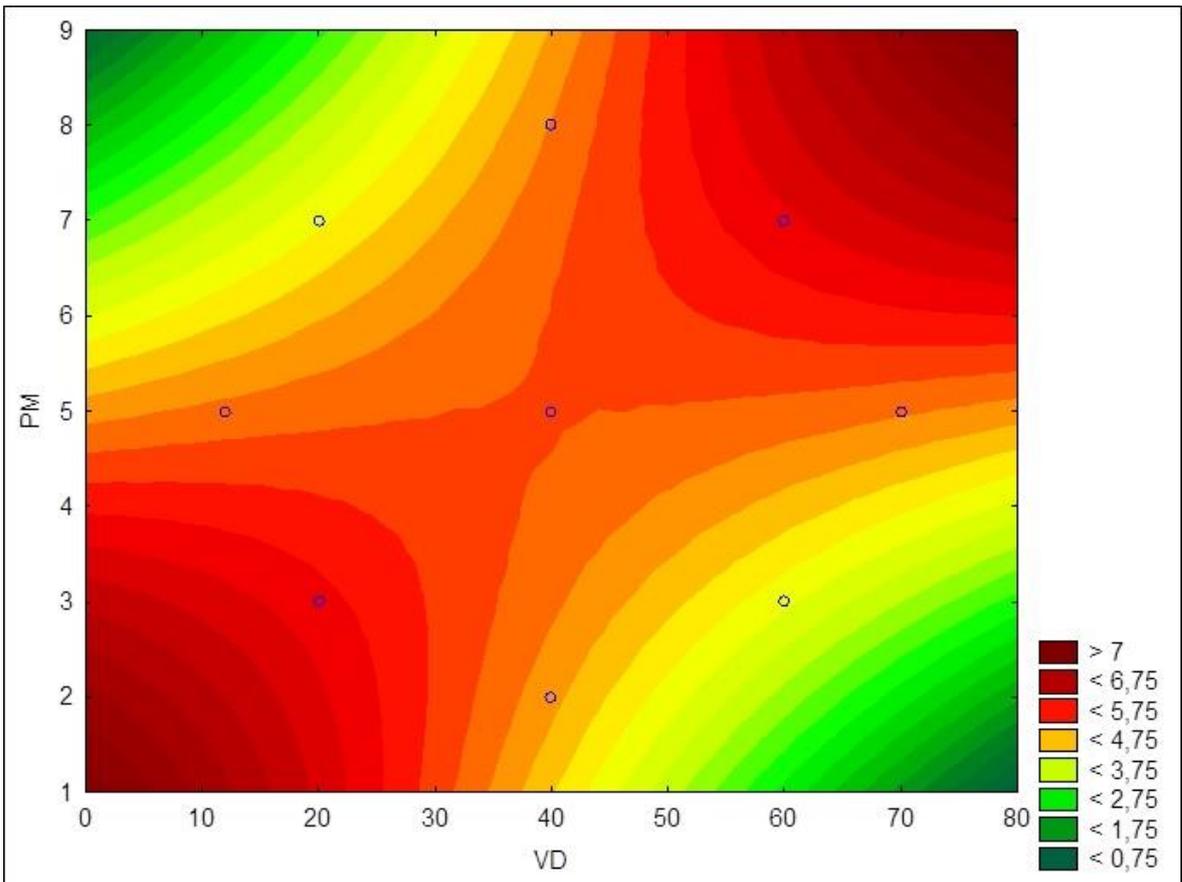


Figura 23: a) Superfície de resposta gerada pelo modelo matemático quadrático: otimização das condições da reação de derivatização das variáveis (VD) e (PM) em função das respostas múltiplas normalizadas para as substâncias (EE2, NON, ATZ, TCS, SMZ, CAF e BPA); b) Zoom da superfície de resposta.

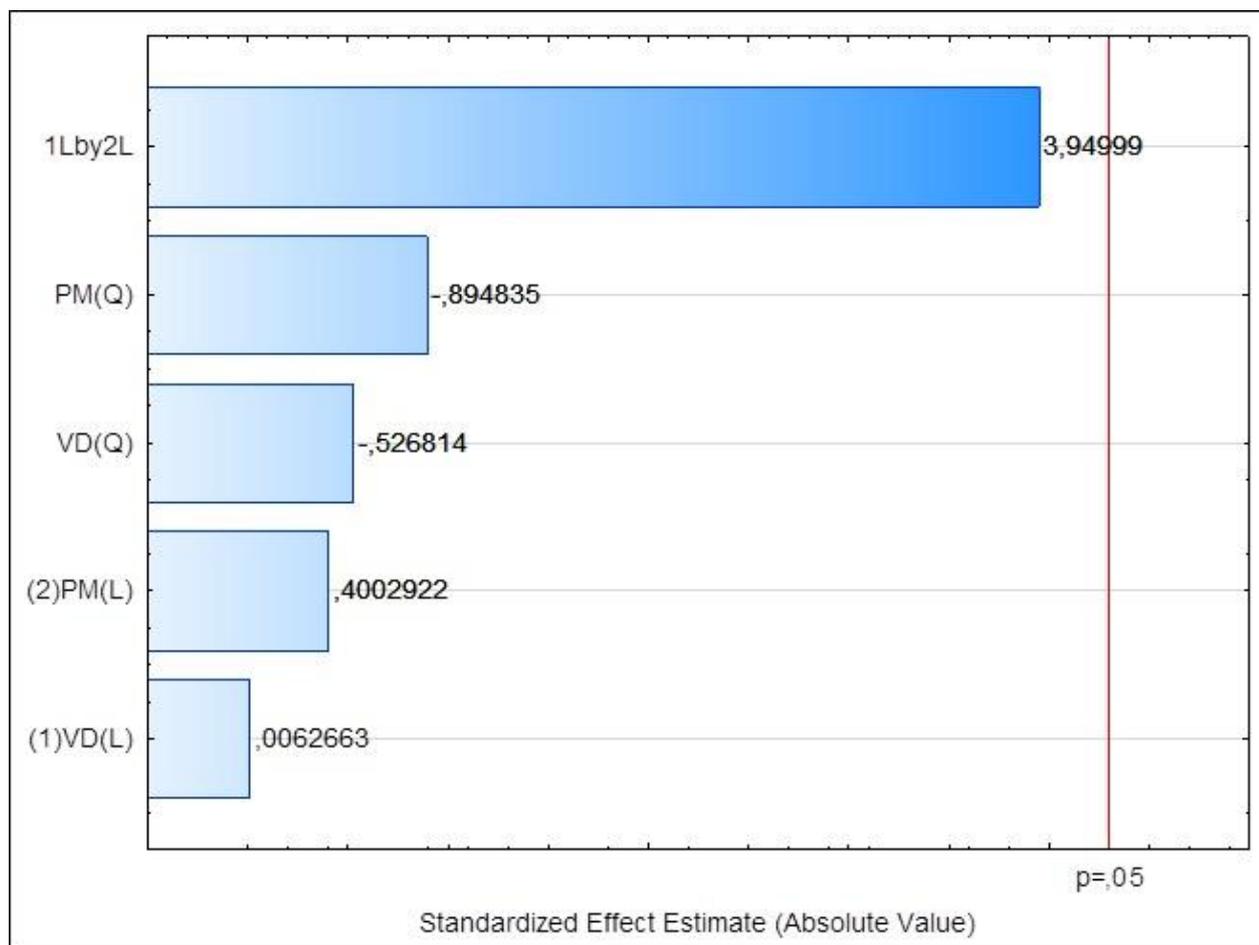


Figura 24: Representação gráfica das significâncias das variáveis estudadas no planejamento CCD.

Através de equações da termodinâmica, conforme descrito no item 4.7, foi possível calcular potências aproximadas para o micro-ondas. A Tabela 13 mostra as informações para a determinação das potências aproximadas utilizadas no planejamento fatorial.

Tabela 13. Determinação da potência do micro-ondas

POTÊNCIA	M (KG)	TI (°C)	TF (°C)	TF – TI (°C)	Q (J)	TEMPO (S)	POTÊNCIA CALCULADA (W)
P3	0,25	30	54	24	25.116	120	209,3
P5	0,25	31	70	39	40.813	120	340,1
P7	0,25	30	81	51	53.371	120	444,8
P10	0,25	29	97	68	71.162	120	593

A reação de derivatização apresentou resultados melhores em relação à condição sem derivatização. Isso pode ser observado na **Figura 25**, na qual são apresentadas as áreas médias de cada composto com e sem derivatização. A simazina é um composto que pode ser quantificado diretamente sem a necessidade de derivatização. No entanto analisando o gráfico ele apresenta área menor após do que antes da reação de derivatização. Isso deve estar associado ao DPR (Desvio Padrão Relativo) que para esse composto apresentou 45% para esse parâmetro, um desvio muito alto associado a erros experimentais. Os demais compostos apresentaram DPR abaixo de 15%, valor máximo de variação permitido pela ANVISA (2011).

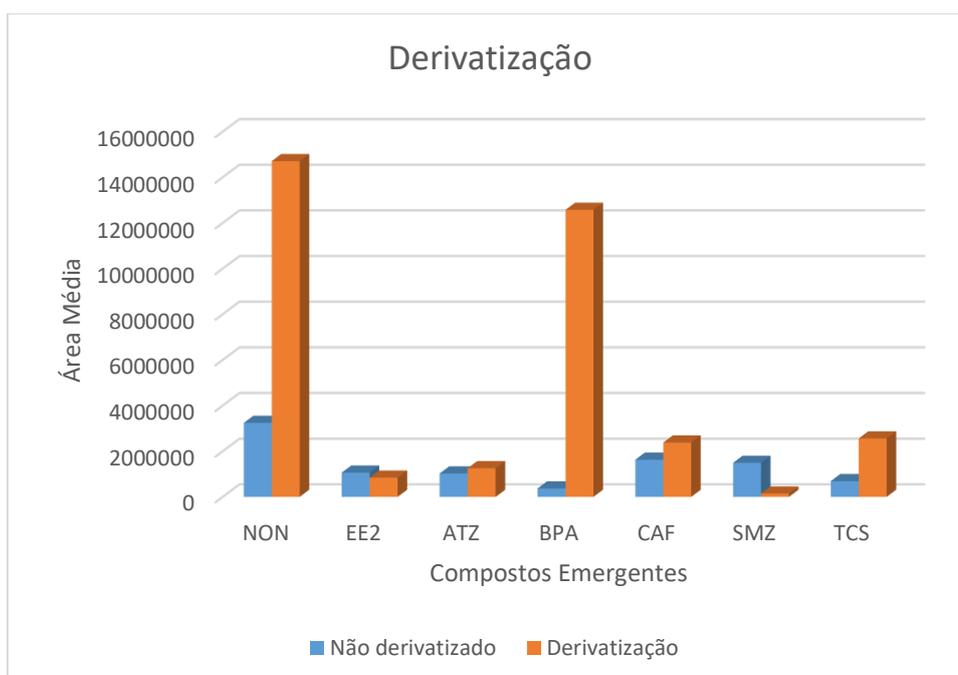


Figura 25: Áreas médias dos compostos emergentes comparando forma derivatizada e não derivatizada.

2.7.1 Validação da metodologia

As técnicas de separação, tais como cromatografia à gás (GC) e cromatografia Líquida (LC) tem se destacado na química analítica pela capacidade de proporcionarem resultados qualitativos e quantitativos em várias matrizes, sobretudo amostras ambientais. No entanto, o desempenho de qualquer técnica analítica depende da qualidade das medidas instrumentais e confiabilidade dos cálculos envolvidos no seu processamento (RIBANI et al., 2004).

Para assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método, este deve sofrer um processo de avaliação denominado de validação do método. A estimativa dos parâmetros avaliados varia de acordo com a técnica analítica empregada. Não existe um procedimento de validação preconizado para determinações de substâncias classificadas como contaminantes emergentes em matrizes ambientais. Dessa forma devem ser conhecidas e avaliadas as características gerais envolvidas em uma metodologia de análise e a partir dessas informações, elaborar os critérios mais importantes para a validação (RIBEIRO et al., 2008).

No Brasil, os dois órgãos que regulamentam a validação de métodos são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO) (RIBEIRO et al., 2008). O método proposto nesse trabalho será aplicado em amostras ambientais de águas superficiais e águas para abastecimento público, sendo essa metodologia baseada nos parâmetros descritos no Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (ANVISA, 2011) e Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos (INMETRO, 2011).

Os parâmetros de desempenho analíticos para a validação do método proposto serão: seletividade, linearidade, limite de detecção instrumental ($LD_{\text{instrumental}}$), limite de quantificação ($LQ_{\text{instrumental}}$) e exatidão.

- **Seletividade**

A seletividade de um método instrumental é a capacidade de medir de forma inequívoca uma substância na presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz que podem interferir na resposta em

uma amostra complexa. Em cromatografia a pureza de um pico pode ser considerada atribuindo que cada pico corresponde a um único componente (ANVISA, 2011).

Dessa forma, nesse método a seletividade foi verificada baseada nos cromatogramas e espectros de massas, onde foi possível relacionar os picos cromatográficos a cada substância de interesse e seus respectivos espectros de massas e dessa forma, conseguir diferenciá-los. Além disso, o método cromatográfico apresenta o modo de aquisição de dados SIM, que permite monitorar íons específicos referentes a cada composto, conforme apresentado na tabela 6, atribuindo maior seletividade ao método.

A **figura 26** apresenta o cromatograma com os íons escolhidos para quantificação de cada padrão. O método proposto se mostrou seletivo para os compostos estudados, pois os picos não se sobrepõem, portanto, cada composto apresenta tempos de retenção diferentes. Sobretudo, a utilização do detector de espectrometria de massas auxilia na identificação de cada substância avaliada. Por exemplo, os compostos bisfenol A e seu par deuterado bisfenol A (16 D), que poderiam coeluir devido à similaridade na estrutura, podem facilmente ser diferenciados através do espectro de massas, utilizando o método SIM. As **figuras 27 e 28** mostram os cromatogramas e espectros de massas do padrão dessas substâncias baseado no íon de maior abundância relativa. A **figura 29** apresenta a identificação dos compostos bisfenol A e bisfenol A 16 D, usado como *surrogate*, nos extratos finais das amostras.

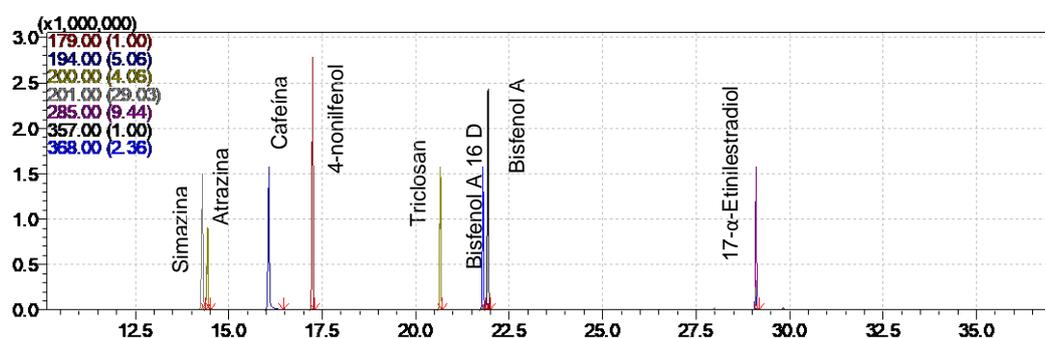


Figura 26: Cromatograma dos compostos analisados.

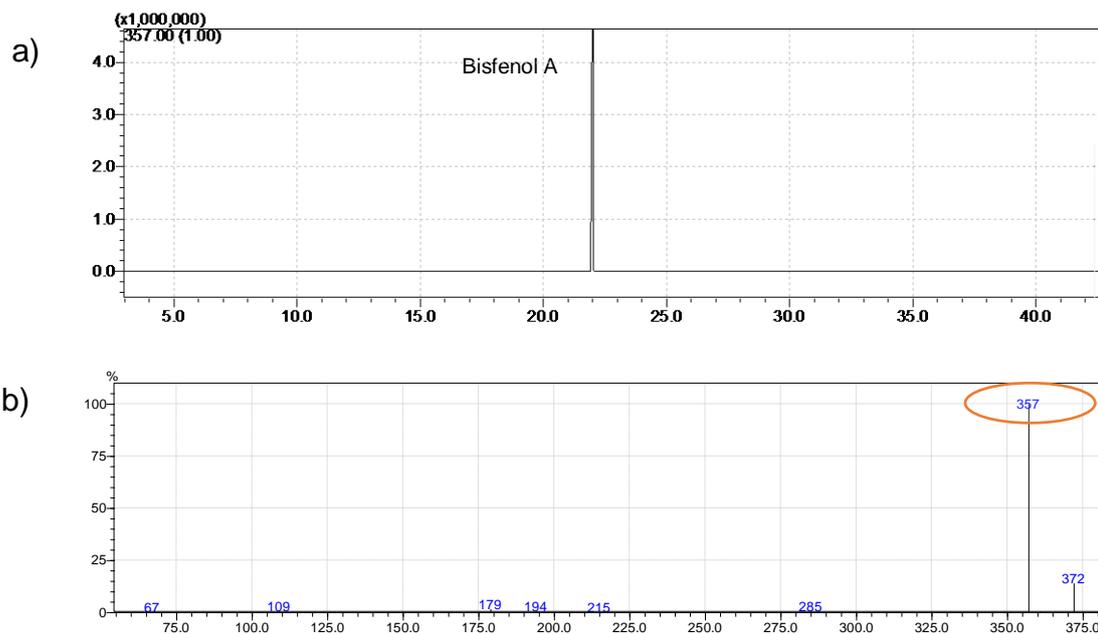


Figura 27: a) Cromatograma e b) espectro de massas com o íon mais abundante da substância Bisfenol A

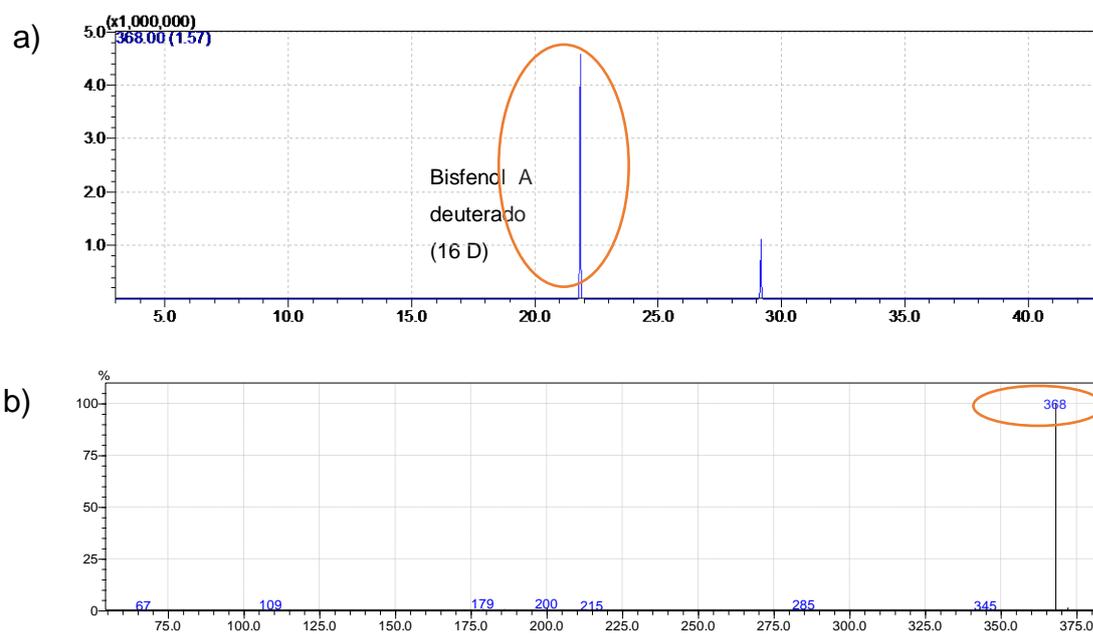


Figura 28: a) Cromatograma e b) espectro de massas com o íon mais abundante da substância Bisfenol A deuterado (16 D)

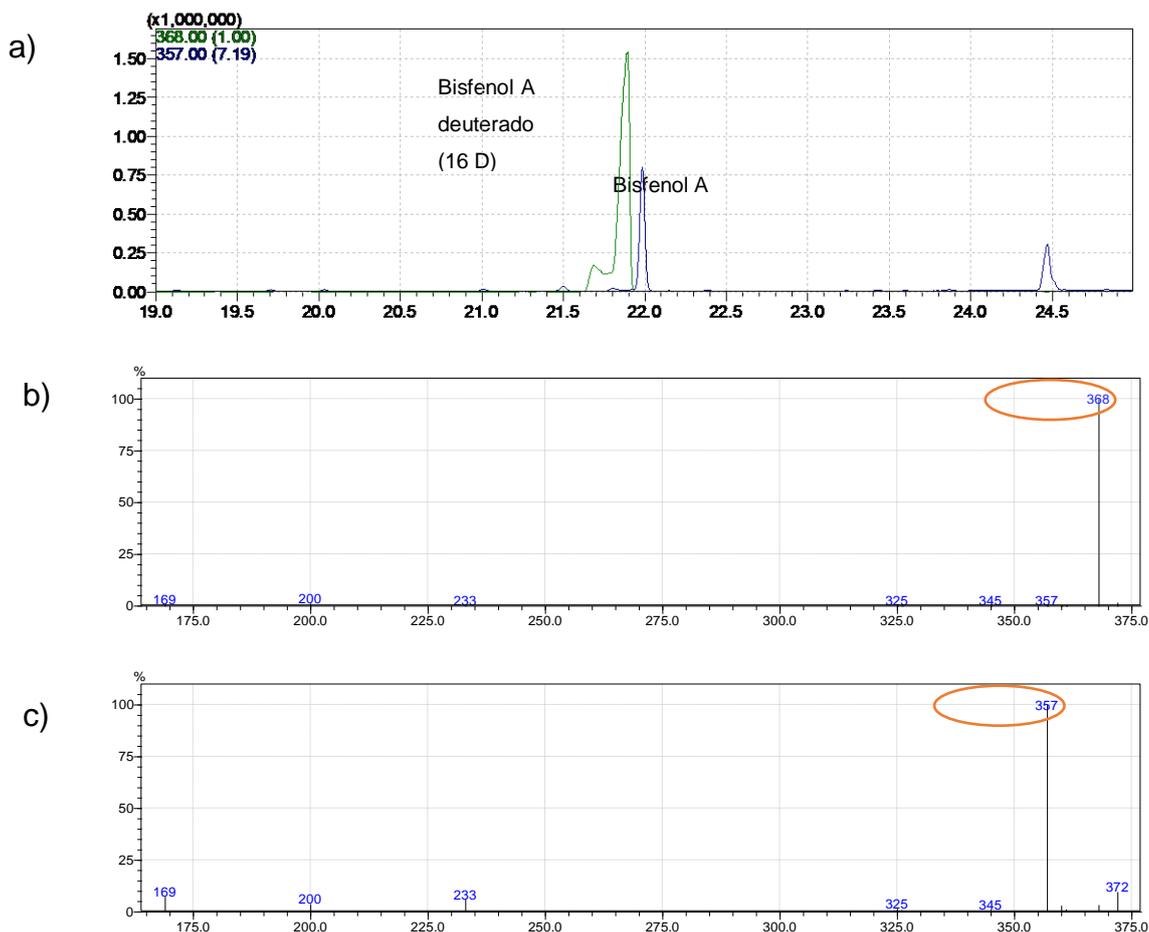


Figura 29: a) Cromatograma da amostra bruta coroa campanha 7, apresentado o Bisfenol A e o surrogate Bisfenol A 16 D. e b) Espectro na amostra do composto bisfenol A 16 D e c) Espectro de massas do composto bisfenol A nas amostras brutas.

- **Linearidade, $LD_{\text{Instrumental}}$ e $LQ_{\text{Instrumental}}$**

A linearidade de um método analítico é a capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do composto de interesse na amostra, dentro de um dado intervalo (ANVISA, 2011). A linearidade deve ser determinada através da construção da curva analítica que deve conter no mínimo 5 pontos. A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais é realizada através do modelo matemático de regressão linear. Além dos coeficientes da regressão, o coeficiente linear (a) e o coeficiente angular (b), também deve ser calculado o coeficiente de correlação (r) que permite uma estimativa da qualidade da curva obtida. Quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto

de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão calculados (CHUI; ZUCCHINI, 2001).

A linearidade do método proposto foi avaliada através da construção de curvas analíticas dos padrões listados na tabela 4 através da análise da equação da reta e do coeficiente de correlação para cada um dos compostos estudados, pelo método da padronização externa, com curvas de 7 pontos analisados em duplicata. As curvas analíticas foram obtidas a partir do procedimento de extração, descrito no item 2.6.3. Os dados relativos às curvas analíticas são apresentados na tabela 9. Os gráficos das curvas analíticas, assim como as suas respectivas equações da regressão linear para composto estudado são apresentados no apêndice.

A ANVISA estabelece que o critério mínimo aceitável para o coeficiente de correlação (r) deve ser 0,99. Portanto, o método proposto apresenta linearidade, pois todos os compostos analisados apresentaram valores para esse parâmetro acima do valor preconizado.

Outros parâmetros importantes para a confiabilidade de um método instrumental, sobretudo em concentrações muito baixas, como em análise de traços é o Limite de Deteção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ). O primeiro é a menor concentração da substância que pode ser detectada, mas não precisa necessariamente ser quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. Com relação ao Limite de quantificação (LQ) esta é considerada a menor concentração da substância que pode ser medida utilizando um dado procedimento experimental. Tanto o LD quanto o LQ podem ser calculados de diferentes formas, através do método visual, método da relação sinal-ruído e método baseado nos parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

Para a determinação do $LQ_{\text{Instrumental}}$ e $LD_{\text{Instrumental}}$ do método proposto foi calculado utilizando o método baseado nos parâmetros da curva analítica. Para essa finalidade foram construídas curvas analíticas de acordo com os parâmetros otimizados pelo planejamento fatorial nas concentrações que foram escolhidas de acordo com as concentrações encontradas no ambiente, conforme descrito no item (2.6.4). As equações 1 e 2, mostradas abaixo, foram usadas para calcular o $LD_{\text{Instrumental}}$ e $LQ_{\text{Instrumental}}$, respectivamente.

- Limite de Detecção

$$LD = 3,3 \times \frac{S}{S} \quad \text{(Equação 7)}$$

- Limite de Quantificação

$$LD = 10 \times \frac{s}{S} \quad \text{(Equação 8)}$$

Sendo:

s = estimativa do desvio padrão do branco

S = Coeficiente angular da curva analítica

Os valores de Limite de Detecção e Quantificação para os compostos estudados são apresentados na tabela 14. Os limites de detecção e quantificação encontrados são compatíveis com as concentrações em ambientes naturais e em água tratada, conforme descrito na literatura (MACHADO, 2015; MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017; RAIMUNDO, 2011; RIVA et al., 2018).

Tabela 13: Parâmetros da curva analítica

Substância	Faixa de trabalho (ng L ⁻¹)	Linearidade (r)	Equação da Regressão Linear	LD _{Instrumental} (ng L ⁻¹)	LQ _{Instrumental} (ng L ⁻¹)
NON	2,5 - 123	0,9957	y = 686.99x - 3737.5	3,21	9,72
EE2	63 - 450	0,9964	y = 100.4x - 4125.6	0,66	2,01
ATZ	12,6 - 210	0,9928	y = 221.93x - 3695.1	0,12	0,61
BPA	2,5 - 123	0,9943	y = 992.74x - 7988.6	0,75	2,27
CAF	63 - 450	0,9954	y = 167.77x - 3301.3	1,38	4,17
SIM	12,6 - 210	0,9933	y = 48.237x - 615.41	0,77	2,35
TCS	12,6 - 210	0,9954	y = 419.89x - 7794.8	2,44	7,39

- Precisão e Exatidão

A precisão representa o grau de dispersão de resultados entre ensaios independentes repetidos de uma mesma amostra, padrão ou amostras semelhantes. Esse parâmetro pode ser expresso como Desvio Padrão relativo (DPR) e também através do Intervalo de Confiança (IC), conforme apresentado nas equações 9, 10 e 11.

- Coeficiente de Variação ou Desvio Padrão relativo

$$\text{DPR} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{(Equação 9)}$$

Sendo:

\bar{x} = é a média das medidas

s = representa a Desvio Padrão dado por:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{(Equação 10)}$$

Sendo:

x_i = valor individual da medida

\bar{x} = média do conjunto de medidas

n = é o número de medições

- Intervalo de confiança da média:

$$\text{IC} = \bar{x} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{(Equação 11)}$$

Sendo:

t_{n-1} = valor crítico da distribuição de *Student* com n-1 graus de liberdade

\bar{x} = média do conjunto de medidas

n = é o número de medições

s = desvio padrão

A precisão é considerada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A precisão intermediária foi aplicada para avaliar a precisão do método proposto. Ela é a aconselhada para ser adotada na rotina do laboratório por ser mais indicada para representar a variabilidade dos resultados em um mesmo laboratório. Dessa forma, a precisão intermediária visa verificar se no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados.

Para avaliar a precisão intermediária foram calculados os DPR para 3 níveis da curva analítica realizados em triplicata. Os níveis foram escolhidos por representarem a

faixa de trabalho em nível baixo, médio e alto (N1, N4 e N7). Os resultados referentes à precisão intermediária são apresentados na **figura 30**:

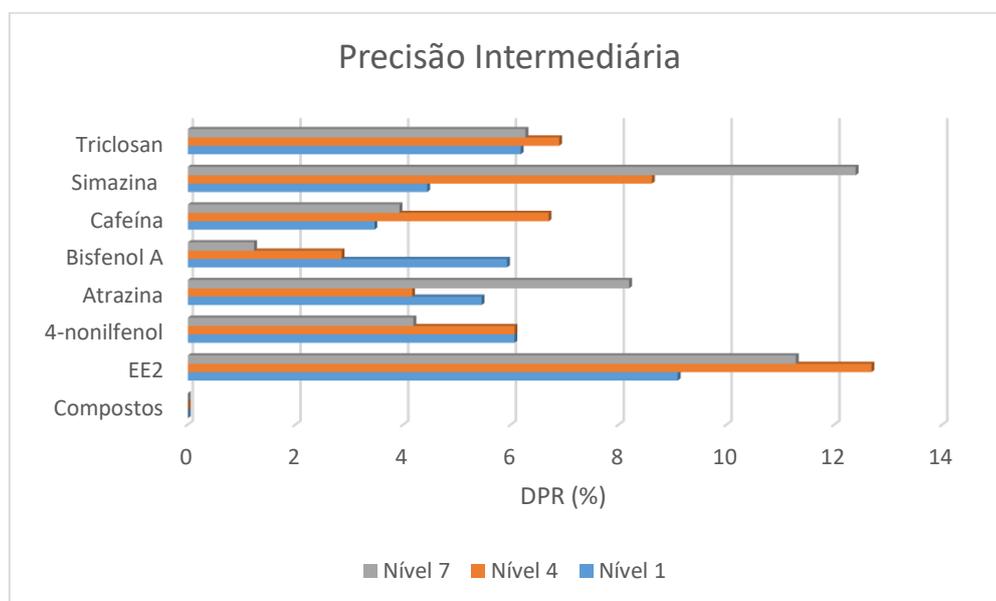


Figura 30: Resultados de precisão intermediária expresso em DPR para (n = 3).

Segundo a ANVISA o DPR não deve ultrapassar o valor de 15 %. Conforme verificado na figura 22, os valores obtidos para os três níveis avaliados não ultrapassaram esse valor. Portanto, com relação à precisão intermediária, o parâmetro está dentro do limite preconizado por essa legislação.

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados no experimento e um valor de referência aceito como verdadeiro. Esse valor verdadeiro é resultado de uma medição perfeita e é um valor indeterminado por natureza (INMETRO, 2011). A exatidão de um método pode ser determinada através dos ensaios de recuperação, que podem ser definidos como a proporção de substância de interesse presente ou adicionada à uma matriz, que ao passar pelo procedimento de extração é passível de ser quantificada (THOMPSON et al., 1999).

A eficiência de extração e exatidão do método proposto foi avaliada por meio do ensaio de recuperação, assim como a precisão com intervalo de confiança de 95% de probabilidade. Esse ensaio foi realizado em triplicata através da fortificação da água ultrapura (Tipo 1) com uma mistura de padrões na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Nesse teste, $1 \mu\text{L}$ do padrão foi injetado no GC-MS e sua área foi comparada com a área dos extratos obtidos a partir do procedimento de extração descrito no item 2.6.3. Os

resultados referentes à avaliação da exatidão dos COE estudados nesse trabalho referentes aos ensaios de recuperação é apresentado na Figura 31.

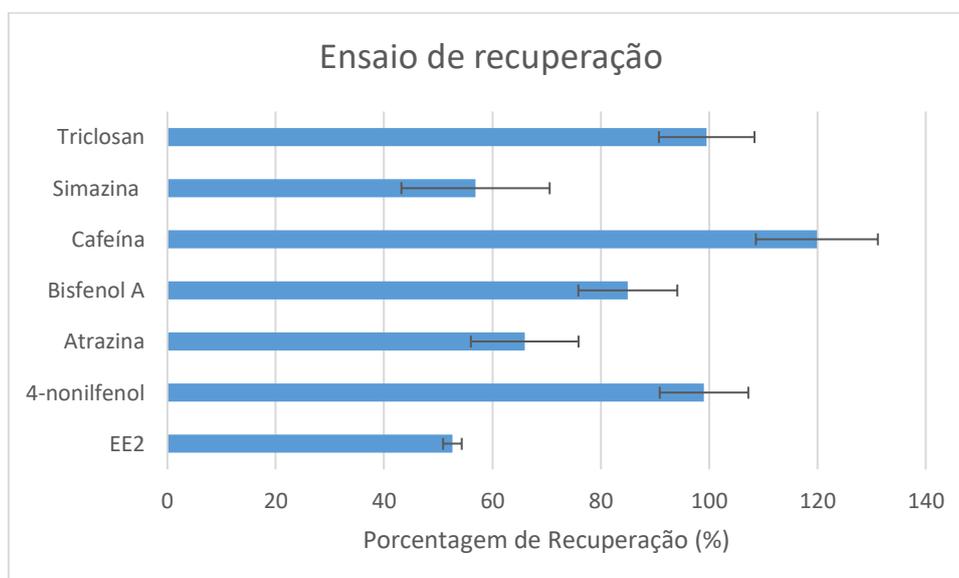
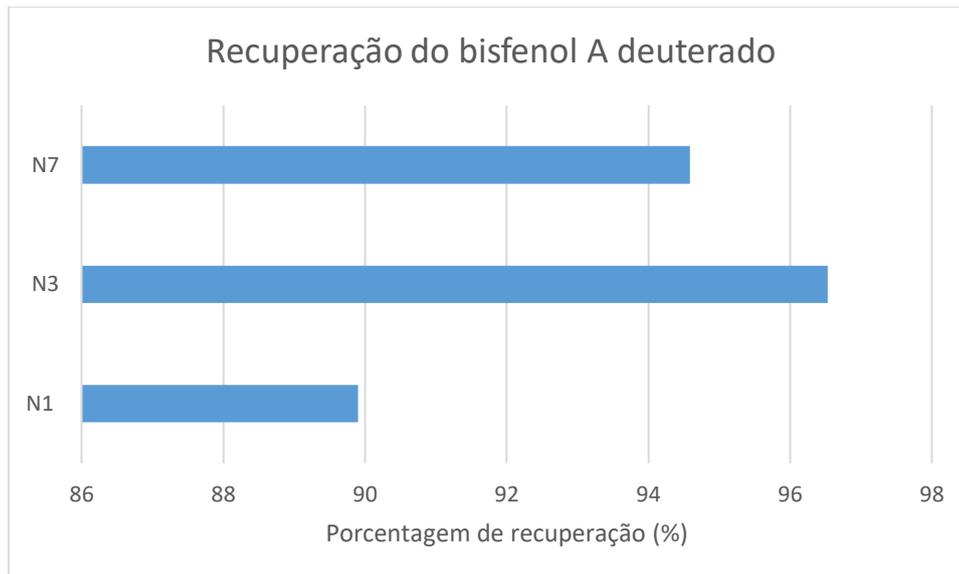


Figura 31: Resultado do ensaio de recuperação utilizando o método otimizado em água ultrapura (Tipo I) fortificada com os COE abordados nesse estudo.

A análise de surrogate padrão de bisfenol A deuterado (bisfenol A 16 D) corrobora os resultados para o teste de recuperação foi usada uma concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. A **figura 32** mostra a recuperação desse padrão que monitorada em três pontos da curva analítica. Esse padrão é adicionado numa concentração conhecida, 10 ppb no extrato final, à curva analítica e às amostras antes do processo de extração e tem a função de identificar qualquer alteração que possa ocorrer durante os processos de extração.



*N1, N3 e N7 correspondem aos níveis da curva analítica.

Figura 32: Recuperação do Surrogate na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Relativo aos pontos da curva N1, N3 e N7.

A ANVISA estabelece que a faixa de intervalo de ensaios de recuperação deve estar entre 70 a 120% com precisão analítica de ± 20 . No entanto, para matrizes complexas, como a matriz de águas superficiais e água tratada, podem ser aceitos valores de porcentagem na faixa de 50 a 120%, com precisão de ± 15 (GARP, 1999 apud RIBANI et al., 2004). Dessa forma, os valores encontrados são adequados para garantir a exatidão e precisão do método analítica proposto. A eficiência de extração foi avaliada diante de um planejamento fatorial, visando uma única condição que fosse a melhor para a extração de todos os compostos conforme apresentado no item 1.7.1. As precisões representadas pelas barras de erros variam entre ($\pm 1,72$ a $13,69$).

A determinação simultânea de compostos que apresentam características muito diferentes pode resultar em baixas porcentagens de recuperação. As diferentes características físico-químicas de cada composto que influenciam sua interação com o sorbente, além das baixas concentrações de destes contaminantes, podem levar a perdas dos compostos alvo durante e etapa de extração e concentração e aumento da imprecisão, justificando as recuperações obtidas. (MONTAGNER; JARDIM, 2011; MACHADO, 2015) .

CAPÍTULO 3 – PRESENÇA DOS COE EM AMBIENTES AQUÁTICOS E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

3

3.1 3.1 Ocorrência de Compostos Orgânicos Emergentes em águas naturais

Os contaminantes emergentes abrangem uma ampla gama de produtos químicos que estão em uso em todo o mundo e são indispensáveis para a sociedade moderna. Segundo dados do WWF (do inglês *World Wide Fund for Nature*), entre os anos de 1930 e 2000 a produção global de produtos químicos aumentou de 1 milhão para 400 milhões de toneladas por ano (WWF, 2010). Estatísticas publicadas pelo EUROSTAT mostram que entre os anos de 2002 a 2011, cerca de 50% do total da produção de compostos químicos incluem compostos potencialmente perigosos para o ambiente e cerca de 70% desses químicos apresentam um impacto significativo no ambiente (EUROSTAT, 2013).

Além do crescimento na produção de novos compostos químicos, também houve uma expansão dos centros urbanos e da prática agrícola intensiva, impactando nos recursos hídricos da região e a contaminação do solo. A lixiviação através das águas das chuvas, por sua vez, também leva a inserção desses compostos nos mananciais e águas subterrâneas (GAVRILESCU et al, 2015).

Os corpos hídricos são os principais receptores da maior parte dos poluentes liberados no ambiente. O aporte desses compostos ocorre por fontes difusas, sendo difícil a sua identificação, como deposições atmosféricas, lixiviação e drenagem de águas pluviais de centros urbanos e ambientes rurais. Em muitos casos, o aporte destes compostos ocorre através de fontes pontuais, como lançamento de esgoto bruto diretamente nos corpos hídricos e efluentes de ETE nas águas superficiais, sendo esses dois últimos, as principais fontes de contaminantes emergentes nos ambientes aquáticos (ORT et al, 2010).

A presença de contaminantes emergentes em ambientes aquáticos e a concentração encontrada estão relacionadas com fatores como sorção, diluição, reações de degradação biológica e química e fotólise. No entanto, dados mostram que as concentrações de COE em águas residuais das ETE apresentam concentrações que variam muito, isso ocorre principalmente devido à característica e comportamento de

consumo da população assim como devido as inconsistentes eficiências de remoção desses contaminantes nas ETE (BOLONG et al., 2009; AQUINO; BRANDT; CHERNICHARO, 2013; GRANDCLÉMENT et al., 2017). No caso do Brasil, outro efeito agravante é a falta de saneamento básico, ou seja, de tratamento adequado do esgoto doméstico ou mesmo a alta incidência de descarte de esgotos clandestinos nos ambientes aquáticos (CANELA et al, 2014).

Dessa forma, as informações sobre a natureza, variabilidade, transporte e destino desses contaminantes é importante, uma vez que o conhecimento nessa área de estudo ainda é limitado. A presença de COE nas águas destinadas ao abastecimento público consiste em um problema de saúde pública, uma vez que são comprovados seus efeitos nocivos à saúde humana e ao ambiente, sendo necessário o desenvolvimento de novas tecnologias tanto nas estações de tratamento de esgoto quanto no tratamento da água para abastecimento público.

Diante do exposto, a remoção e prevenção do aporte de COE nos corpos hídricos é ainda uma questão difícil de intervenção em curto prazo. Nesse sentido, o monitoramento desses compostos e avaliação dos seus efeitos tanto no ambiente como na saúde humana é importante como forma de constatação de frequência de detecção, toxicidade e nível de concentrações detectadas para futuras intervenções e mudanças nas legislações vigentes. Portanto, esse estudo busca verificar a ocorrência de alguns COE em importantes mananciais que abastecem o centro urbano e rural da região de Campos dos Goytacazes no Norte Fluminense, assim como, as águas tratadas a partir destas fontes de captação. Também foi objeto de estudo a relação da presença desses contaminantes e seus efeitos na atividade estrogênica, como estudo inicial de como esses compostos podem interferir na saúde humana e no ambiente.

3.2 Efeitos à saúde humana e Avaliação da atividade estrogênica

Diante da grande variedade de fontes de exposição aos contaminantes emergentes, a avaliação dos seus efeitos sobre a saúde humana é complexa. No entanto, estudos apontam danos causados tanto por efeitos crônicos como agudos. Tratando-se dos efeitos agudos, pessoas expostas aos pesticidas, por exemplo, podem apresentar os seguintes efeitos: ardência nos olhos, erupções cutâneas, cegueira, náuseas, asma e diarreia. Por outro lado, os efeitos da exposição crônica incluem: defeitos congênitos,

câncer, danos no sistema reprodutivo e toxicidade nos sistemas neurológico, imunológico e no desenvolvimento dos organismos expostos aos COE (DE COSTER e VAN LAREBEKE, 2012). Porém, as causas específicas destes efeitos crônicos são mais difíceis de identificar.

Muitos COE apresentam efeitos sobre o sistema endócrino de animais e seres humanos, sendo considerados interferentes endócrinos (IE), mimetizando ou bloqueando a ação dos hormônios nos organismos (efeito antagônico ou agônico) (Figura 31) (ANKLEY et al, 1998; GHISELLI e JARDIM, 2007). Esta ação sobre os hormônios pode causar disfunções reprodutivas e endócrinas, abortos espontâneos, distúrbios metabólicos, incidência de neoplasias malignas, alteração nos processos de homeostase e indução de bactérias mais resistentes (NEWBOLD et al, 2007; SCOGNAMIGLIO et al, 2016; LINTELMANN et al, 2003; HAYES et al, 2010; RAIMUNDO, 2011).

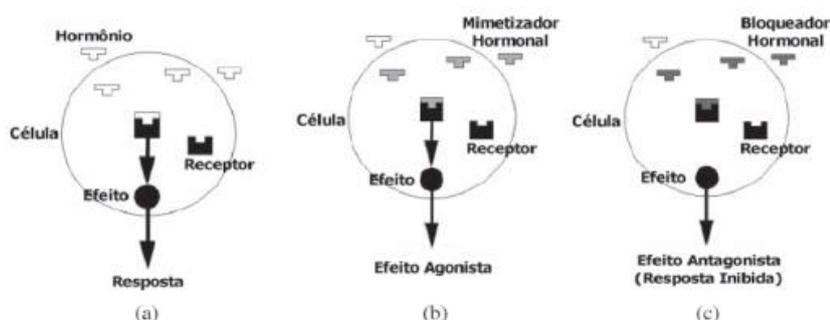


Figura 33: Mecanismo de ação dos (DEs) nos organismos. a) Efeito natural; b) Efeito agonista; c) Efeito antagonista. Fonte: Ghiselli e Jardim (2007)

Atualmente, novas preocupações têm sido expressas pelos cientistas, sobre o potencial desses compostos com efeito de interferentes endócrinos no organismo, tais como puberdade precoce em meninas, obesidade e diabetes tipo II que estão relacionadas a alterações hormonais induzidas (HOTCHKISS et al, 2008).

Diante do exposto, existe a necessidade de avaliação dos efeitos dos interferentes endócrinos nos organismos. Uma das formas de medir a capacidade de desregulação endócrina é por meio da atividade estrogênica. Um dos mecanismos de ação de uma substância considerada como interferente endócrino consiste no seu acoplamento em determinado receptor de estrogênio humano (REh), gerando uma resposta estrogênica, passível de ser medida (BARCELLOS, 2016).

Dessa forma, têm sido desenvolvidos testes que permitem avaliar a atividade estrogênica de compostos ou amostras ambientais. Dentre eles estão os testes *in vivo* e *in vitro*. Os primeiros apresentam resultados interessantes do comportamento em longo prazo e a toxicidade crônica, no entanto, demandam elevado tempo de resposta e elevado custo. Dessa forma, os testes *in vitro* se destacam por apresentar uma resposta em curto prazo e fornecem resultados rápidos de quais substâncias apresentam atividade estrogênica, para posterior estudo mais detalhado (BISTAN, LOGAR E TISLER, 2011).

Os ensaios *in vitro* mais usados para avaliar o potencial de substâncias que apresentam atividade estrogênica incluem: a) ensaios de ligação de receptores (baseado na habilidade das substâncias de se ligarem diretamente ao receptor hormonal), b) ensaios de proliferação de células (mede a capacidade da substância teste em estimular o desenvolvimento das linhagens celulares dependentes do hormônio estrogênio e c) ensaios de gene repórter (avalia a habilidade da substância para ativar a transcrição de um promotor sensível a hormônios em organismos eucarióticos, geralmente células de mamíferos ou levedura) (BAKER, 2001).

Os ensaios de gene repórter recombinante são muito usados para avaliar substâncias químicas que são suspeitas de apresentarem atividade estrogênica através da interação com receptores de estrogênio. Esses ensaios apresentam vantagens devido a sua simplicidade molecular e biológica, fácil manipulação e baixo custo (WU et al., 2002). Esses ensaios com leveduras podem ser usados para avaliar a interação de substâncias químicas com vários receptores de hormônios esteroides como o receptor de estrogênio, receptor de androgênio, e receptor de progesterona (BILA, 2005).

Alguns exemplos de ensaios baseados na avaliação da atividade estrogênica por meio do gene repórter recombinante são: BLYES (sistema bioluminescente da levedura com estrogênio induzido, do inglês *Bioluminescent Yeast Estrogen Assay*), BLYAS (sistema bioluminescente da levedura com androgênio induzido, do inglês *Bioluminescent Yeast Androgen Assay*), YAS (sistema de expressão da levedura com androgênio induzido, do inglês *Yeast androgen-inducible Expression System*) e YES (sistema de expressão da levedura com estrogênio induzido, do inglês *Yeast estrogen-inducible Expression System*) (BILA, 2005; ELDRIDGE et al., 2007; DI DEA BERGAMASCO et al., 2011).

O teste YES (do inglês *Yeast Estrogen Screen*), desenvolvido por Routledge e Sumpter (1996) tem sido descrito com sucesso para avaliar a atividade estrogênica em

matrizes ambientais por ser um método rápido e sensível (detecta até 2 ng L^{-1}) (FISHER, 2013; DIAS et al, 2015; BARCELLOS, 2016). Esse teste se baseia em uma cepa modificada de *Saccharomyces cerevisiae* para identificar possíveis substâncias que possam interagir com o receptor humano (hER). A levedura é modificada para conter esse receptor, porém elas ainda contem plasmídeos com o gene de resposta Lac-Z, que ao ser expressado produz uma enzima chamada β -galactosidase, que é usada para medir a atividade dos receptores. Esta enzima, ao ser excretada no meio, metaboliza o CPRG (clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosida) em lactose e vermelho de clorofenol, que causa a alteração da cor do meio de amarelo para vermelho e pode ser quantificado através da espectrofotometria a 540 nm. Portanto, é possível estimar a concentração de substância que apresenta comportamento estrogênico no meio (ROUTLEDGE E SUMPTER, 1996; FISHER, 2013).

A figura 34 representa o mecanismo de resposta do sistema de expressão da atividade estrogênica por meio do ensaio YES, utilizando o ensaio de gene repórter da levedura modificada *Saccharomyces cerevisiae*. 1) Forma de acoplamento para geração de resposta; 2) a ativação do receptor; 3) Ligação das substâncias com afinidade de acoplar-se ao receptor de estrogênio, causando a expressão do gene receptor Lac-Z; 4/5) Produção da enzima β -galactosidase excretada no meio; 6) Transformação do CPRG (amarelo) em CPRG (vermelho) possível de medição espectrofotometria colorimétrica ($\lambda = 540 \text{ nm}$).

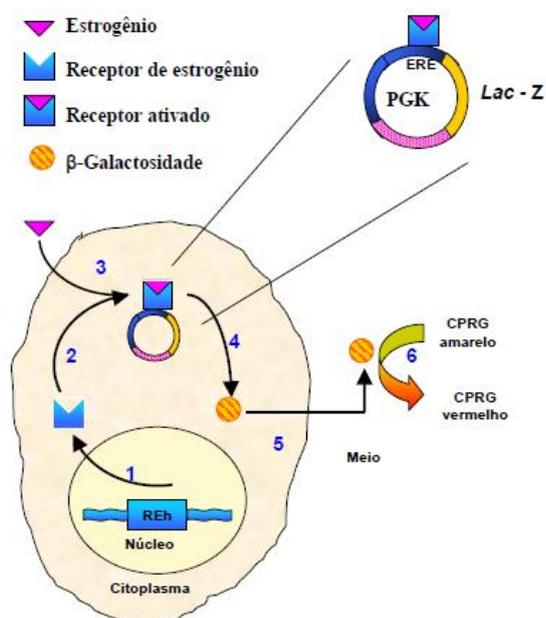


Figura 34: Representação da resposta de atividade estrogênica das substâncias e hormônios. Fonte: DA SILVA, 2015

O teste *YES* mede a potência estrogênica relativa a determinada substância comparada ao estrogênio padrão humano 17- β estradiol. Portanto, a resposta é dada em equivalente desse hormônio que é considerada a molécula mais abundante e potente dentre os hormônios estrogênicos, sendo considerado o controle positivo no teste *YES*. Dessa forma, o ensaio *YES* mede a atividade estrogênica total de uma amostra, negligenciando quais compostos são responsáveis por essa resposta (BILA, 2005).

Dias e colaboradores (2015) avaliaram a atividade estrogênica em águas no Rio Paraíba do Sul e Rio Guandu, dois importantes mananciais no Rio de Janeiro, usando o ensaio *YES*. As amostras são provenientes de águas superficiais e tratadas e os resultados apontaram atividade estrogênica em níveis maiores 1 ng L⁻¹ EQ E2 em amostras ambientais. Os resultados mostraram que o tratamento convencional de água não é eficiente para remoção da atividade estrogênica.

No trabalho desenvolvido por Bistan e colaboradores (2011) foi avaliado o potencial estrogênico em afluentes e efluentes em estações de tratamento de esgoto na Eslovênia utilizando o teste *YES*. Os resultados mostraram que foi observada atividade estrogênica em quase todas as amostras e apontaram esse teste como uma ferramenta adequada para monitoramento de atividade estrogênica em efluentes.

3.3 Mananciais de Abastecimento e sistemas de tratamento de água em Campos dos Goytacazes

O estado do Rio de Janeiro pertence à Região hidrográfica do Atlântico Sudeste e as bacias hidrográficas do Rio Paraíba do Sul (RPS) e do Rio Itabapoana (RI) são compartilhadas entre o Rio de Janeiro e seus estados vizinhos (Minas Gerais e São Paulo). O território fluminense está à jusante dos outros estados e, portanto, recebe, em suas águas, os impactos dos territórios vizinhos (IBGE, 2015).

Visando o planejamento e gestão das águas e meio ambiente, o território fluminense foi dividido em 10 regiões hidrográficas (RH) conforme a figura 1. Campos dos Goytacazes faz parte da RH IX – Baixo Paraíba do Sul e Itabapoana. Uma visão geral da região e o uso do solo podem ser observados na **Figura 35a) e b)**, mostrando que o

uso da terra na região de Campos dos Goytacazes está baseado na agricultura de cana-de-açúcar e pastagem como importantes vocações regionais (BRASIL, 2013).

a

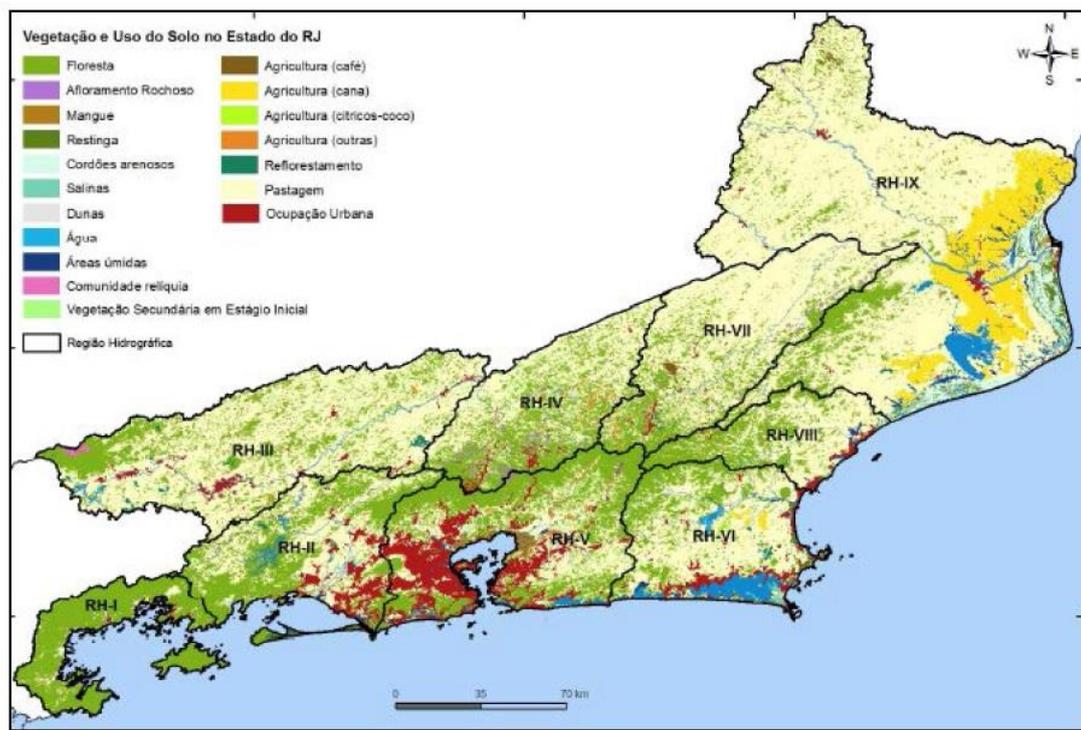
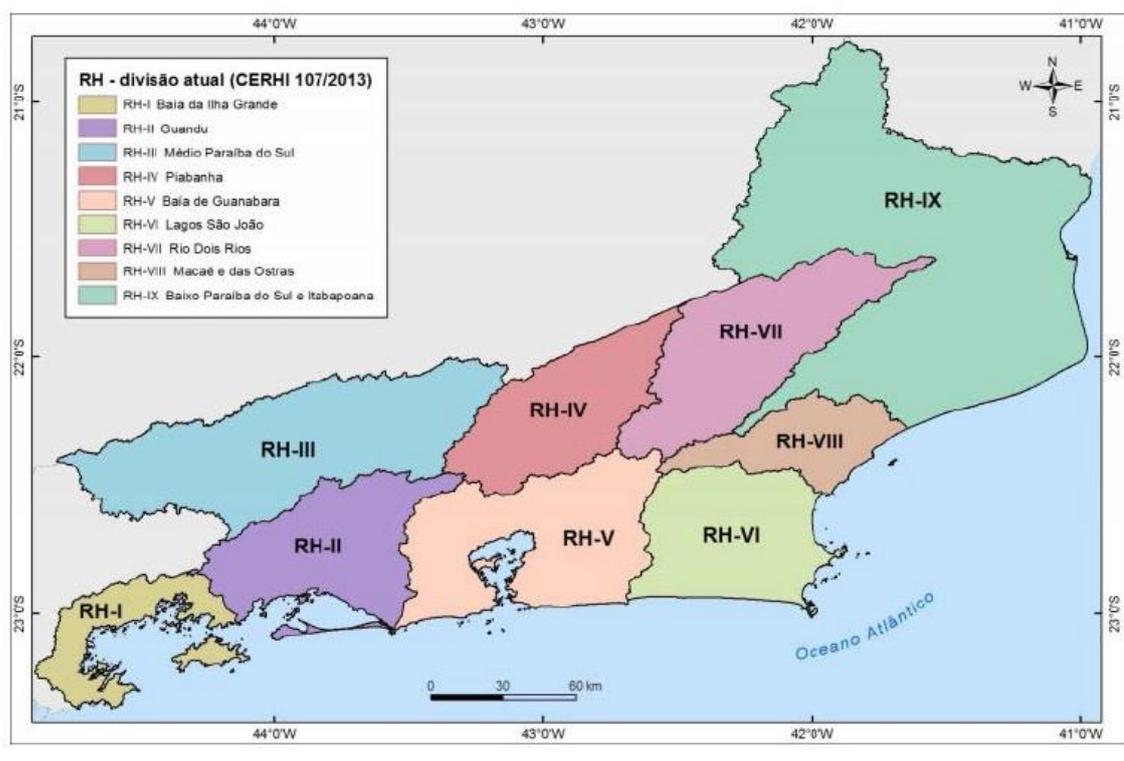


Figura 35: a) Divisão das regiões Hidrográficas no estado do RJ; b) Principais formas de uso do solo no estado do RJ.

O enquadramento do rio RPS e RI é de classe dois (2), considerando a Legislação que classifica os corpos d'água de acordo com os usos preponderantes (BRASIL, 2005). O RPS (**Figura 36**) tem área aproximada de 62.000 Km² e abrange 184 municípios de 3 estados, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, com uma vazão mínima de 190 m³ s⁻¹. O Rio Itabapoana (**Figura 33**) tem 264 km de extensão e uma vazão média 49,3 m³ s⁻¹. Este rio nasce na Serra do Caparaó, passando pelos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo, sendo que ao norte divide dois últimos estados e desagua no Oceano Atlântico (COELHO E FREIRE, 2014).

A região de Campos dos Goytacazes é abastecida principalmente pelo RPS e pelo RI (Rio Itabapoana), cuja participação no abastecimento do município é de 92% e 1%, respectivamente (ANA, 2010), sendo os outros 7% de rios menores e aquíferos. Campos dos Goytacazes pertence à Região Norte Fluminense com uma população estimada em 487.186 habitantes (IBGE, 2016). A concessionária responsável pelo tratamento da água e do esgoto é a empresa Águas do Paraíba que possui 15 ETA (Estações de Tratamento de Água) e 6 ETE (Estações de Tratamento de Esgoto) na região.

As ETA responsáveis pelo tratamento de água da região são apresentadas na **Tabela 12** com o tipo de tratamento, número de habitantes atendidos, capacidade de tratamento e a fonte de captação para abastecimento público.

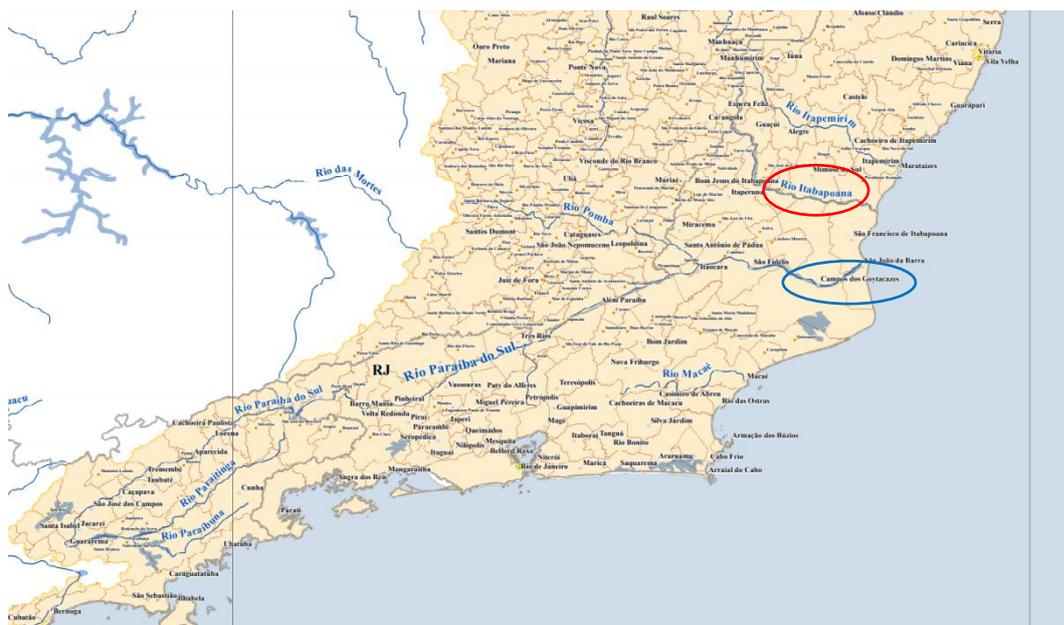


Figura 36: Mapa de Rios no Norte Fluminense RIO PARAÍBA DO SUL (azul) e ITABAPOANA (vermelho) (Adaptada de ANA, acessado dia 19/11/2018)

Tabela 14: ETAs em Campos dos Goytacazes

<i>Nome da ETA</i>	<i>População atendida (habitantes)</i>	<i>Capacidade de Tratamento (L s⁻¹)</i>	<i>Fonte de captação</i>	<i>Tipo de Tratamento</i>
<i>Beco de Santo Antônio</i>	15.000	40	Poço profundo	Tipo 1*
<i>Boa Vista</i>	25.000	60	Poço profundo	Tipo 1*
<i>Conselheiro Josino</i>	1.500	3	Córrego da Penha	Tipo 2**
<i>Coroa (Central)</i>	350.000	1.200	RPS	Tipo 2**
<i>Donana</i>	25.000	70	Poço profundo	Tipo 1*
<i>Macabu</i>	1.300	3	Poço profundo	Tipo 3***
<i>Morangaba</i>	1.000	5	Rio Preto	Tipo 2**
<i>Morro do Côco</i>	1.000	2	Poço profundo	Tipo 3***
<i>Murundu</i>	500	1	Poço profundo	Tipo 3***
<i>Ponta Grossa</i>	2.000	3	Lagoa feia	Tipo 2**
<i>Sto Eduardo e Sta Maria</i>	6.000	20	Rio Itabapoana	Tipo 2**
<i>São Sebastião/Poço Gordo</i>	4.000	15	Poço profundo	Tipo 1*
<i>Saturnino Braga</i>	3.500	15	Poço profundo	Tipo 3***
<i>Três Vendas</i>	1.000	5	Rio Muriaé	Tipo 2**
<i>Vila Nova</i>	1.200	5	Poço profundo	Tipo 1*

Tipo* 1: Pré-oxidação, filtro ascendente de areia, filtro ascendente de zeólitos, desinfecção e fluoretação. **Tipo 2: Convencional (Calha Parshall, floculador, decantador, filtro ascendente de areia, desinfecção e fluoretação. ***Tipo 3: Simples desinfecção e fluoretação.

Dentro deste cenário, este estudo visou avaliar como está a qualidade da água dos mananciais usados pela concessionária de água de Campos dos Goytacazes (Águas do Paraíba) e a sua qualidade após o tratamento, considerando que são mananciais altamente impactados por esgoto doméstico, efluentes industriais e agricultura.

3.4 Materiais e métodos

3.4.1 Amostragem, preservação, preparação da amostra e determinação dos COE nas amostras de água superficial e tratada

Os locais de coleta foram escolhidos de acordo com as ETA que abastecem o maior número de habitantes e utilizam corpos hídricos de águas superficiais para captação nas ETA da cidade de Campos dos Goytacazes: ETA de Coroa e ETA Sto Eduardo/Sta Maria. Somente um local de coleta foi oriundo de ponto de captação de águas de poços profundos, a ETA Donana. Todas as campanhas foram realizadas em pontos no manancial de captação e após tratamento na ETA. Essas últimas foram coletadas de torneiras antes do hidrômetro (antes de chegar à caixa d'água das residências).

As informações a respeito dos pontos e datas de coleta são apresentadas na **Tabela 16**.

Tabela 15: Locais de amostragem em Campos dos Goytacazes

	ORIGEM (ETA)	CAPTAÇÃO
1ª CAMPANHA (06/2017)	Coroa – Bruta (Rio)	Rio Paraíba do Sul (RPS)
	Coroa – Tratada (Torneira)	Rio Paraíba do Sul (RPS)
	Donana – Bruta (Poço)	Poço profundo
	Donana – Tratada (Torneira)	Poço profundo
2ª CAMPANHA (10/2016)	Coroa – Bruta (Rio)	Rio Paraíba do Sul (RPS)
	Coroa – Tratada (Torneira)	Rio Paraíba do Sul (RPS)
3ª CAMPANHA (03/2017)	Coroa – Bruta (Rio)	Rio Paraíba do Sul (RPS)
	Coroa – Tratada (Torneira)	Rio Paraíba do Sul (RPS)
	Sto Eduardo/Sta Maria – Bruta (Rio)	Rio Itabapoana
	Sto Eduardo/Sta Maria – Tratada (Rio)	Rio Itabapoana
4ª CAMPANHA (07/2017)	Coroa – Bruta (Rio)	Rio Paraíba do Sul (RPS)
	Coroa – Tratada (Torneira)	Rio Paraíba do Sul (RPS)
	Sto Eduardo/Sta Maria – Bruta (Rio)	Rio Itabapoana

5ª CAMPANHA (10/2017)	Sto Eduardo/Sta Maria – Tratada (Rio)	Rio Itabapoana
	Coroa – Bruta (Rio)	Rio Paraíba do Sul (RPS)
	Coroa – Tratada (Torneira)	Rio Paraíba do Sul (RPS)
6ª CAMPANHA (12/2017)	Sto Eduardo/Sta Maria – Bruta (Rio)	Rio Itabapoana
	Sto Eduardo/Sta Maria – Tratada (Rio)	Rio Itabapoana
	Coroa – Bruta (Rio)	Rio Paraíba do Sul (RPS)
	Coroa – Tratada (Torneira)	Rio Paraíba do Sul (RPS)
	Sto Eduardo/Sta Maria – Bruta (Rio)	Rio Itabapoana
	Sto Eduardo/Sta Maria – Tratada (Rio)	Rio Itabapoana
7ª CAMPANHA (03/2018)	Donana – Bruta (Poço)	Poço profundo
	Donana – Tratada (Torneira)	Poço profundo
	Coroa – Bruta (Rio)	Rio Paraíba do Sul (RPS)
	Coroa – Tratada (Torneira)	Rio Paraíba do Sul (RPS)
	Sto Eduardo/Sta Maria – Bruta (Rio)	Rio Itabapoana
8ª CAMPANHA (05/2018)	Sto Eduardo/Sta Maria – Tratada (Rio)	Rio Itabapoana
	Coroa – Bruta (Rio)	Rio Paraíba do Sul (RPS)
	Coroa – Tratada (Torneira)	Rio Paraíba do Sul (RPS)
	Sto Eduardo/Sta Maria – Bruta (Rio)	Rio Itabapoana
	Sto Eduardo/Sta Maria – Tratada (Rio)	Rio Itabapoana

Em cada ponto de coleta, foram coletados 4 litros de amostra em frasco de vidro de cor âmbar, nos quais os frascos foram previamente lavados com Extran e ambientados com a própria amostra. As amostras tratadas foram coletadas através da abertura da torneira por alguns segundos antes do início da coleta. Nas amostras de água superficial, a coleta foi realizada utilizando balde de alumínio e corda, sobre pontes, onde se buscou sempre locais de coleta mais distantes das margens do rio (**Figura 38**). Nos poços na região de Donana, as amostras foram coletadas com balde e corda e a água tratada foi retirada da torneira.



Figura 37: Ponte Alair Ferreira em Campos dos Goytacazes, ponto de coleta de água bruta.

Após a coleta, as amostras foram imediatamente levadas para o laboratório e iniciou-se o procedimento de filtração e extração em um prazo de 24 horas.

Antes do início da extração foi realizada a filtração das amostras de águas superficiais para remoção de material particulado usando lã de vidro em um funil de haste longa, também de vidro. Posteriormente, seguiu-se para a etapa de extração cujas melhores condições de análise foram obtidas através do planejamento fatorial. Portanto, o procedimento de extração ocorreu conforme o descrito no item 4.6.2: ajuste de pH = 3; metanol e acetonitrila como solventes; e filtração em 2 cartuchos (para composição de amostra)..

Posteriormente, as amostras foram evaporadas até a secura e ressuspensas com metanol e injetadas, juntamente com a curva analítica extraída de padrões em fase aquosa. Na primeira coleta, as amostras tiveram um volume final de 0,5 mL e na segunda campanha, as amostras foram ressuspensas em um volume final de 0,1 mL, buscando maior concentração do analito.

A partir da segunda coleta, as amostras foram submetidas a extração e uma parte delas foi utilizada para a realização do teste YES, para avaliação da estrogenicidade

desses compostos emergentes conforme será descrito no próximo item. Na terceira coleta, as amostras foram filtradas à vácuo em filtros de celulose (Nalgon, porosidade 3 µm). Antes da filtração, os filtros foram previamente lavados com água tipo 1 a fim de evitar contaminação. Nessa coleta, não houve ajuste de pH para extração e a partir dessa campanha todas as amostras foram derivatizadas de acordo com as condições otimizadas pelo planejamento fatorial, conforme descrito no item 4.7. Exceto as modificações citadas acima, a extração ocorreu conforme o item 2.7.2.

Na sexta campanha as amostras foram submetidas à análise por LC-ESI-MS/MS na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) no laboratório de Química Ambiental no Departamento de Química Analítica. Para esse procedimento foram coletados 2 L de amostra e extraídos seguindo o procedimento já adotado para análise de COE estabelecido nesse trabalho no laboratório da UENF (Etapa de condicionamento e passagem de amostra pelo cartucho). Após a extração com a SPE, os cartuchos foram secos e armazenados em freezer para serem transportados para a UNICAMP.

No laboratório da UNICAMP seguiram-se as etapas de eluição, evaporação e ressuspensão dos extratos em 500 µL de metanol para análise em método já validado para esses compostos. A etapa de preparo de amostra que ocorreu no laboratório da UNICAMP seguiu os mesmos procedimentos que foram realizados nas demais amostras no UENF.

Para a análise foi utilizado um Cromatografo Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em tandem com analisador de massas triplo quadrupolo (QqQ) e fonte de ionização por *vaporização* (do inglês *Eletrospray Ionization-ESI*). A coluna usada foi Eclipse Plus C18 da empresa Agilent (30 x 2,1 mm e tamanho de partícula de 3,5 µm) e a fase móvel foi constituída de água ultrapura e metanol, com adição do aditivo 0,01% (v/v) de NH₄⁺, que facilita a formação dos íons. Na **tabela 17** está representado o gradiente da fase móvel. Os compostos cafeína, atrazina e simazina foram analisados no modo positivo e triclosan, bisfenolA, 17- α -etinilestradiol e 4-nonilfenol foram analisados no modo negativo. Foi utilizado o modo de aquisição de dados MRM (do inglês, *Multiple Reaction Monitoring*), onde cada sistema precursor-produto é específico para cada composto.

Tabela 16: Gradiente de composição da fase móvel para análise de LC-ESI-MS/MS

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)	Fluxo (mL/min)
0,00	50,0	50,0	0,300
0,00	50,0	50,0	0,300
4,00	10,0	90,0	0,300
10,00	10,00	90,0	0,300

3.4.2 A avaliação da Estrogenicidade por meio do ensaio YES

A partir da segunda campanha, com exceção da terceira campanha, uma parte das amostras foi separada e enviada para avaliação da atividade estrogênica por meio do teste YES para o laboratório de Engenharia Sanitária (LES) do Departamento de Saneamento e Meio Ambiente (DESMA) da UERJ (Universidade Estadual do Rio de Janeiro) em colaboração com a professora Dr^a Daniele Maia Bila.

Previamente, realizou-se uma coleta para envio das amostras para o teste YES de três formas diferentes com o objetivo de avaliar qual a forma de transporte haveria a menor perda dos analitos: a) Parte do extrato obtido para injeção no GC-MS foi enviado para o ensaio, seguindo as condições otimizadas de extração; b) Cartuchos para eluição na UERJ, onde foi realizado todo o procedimento posterior até a obtenção do extrato final usando etanol; c) Passagem de apenas um litro de amostra pelo cartucho. A atividade estrogênica das amostras foi determinada usando um ensaio de gene receptor recombinante conhecido como *Yeast Estrogen Screen* (do inglês *Yeast estrogen-inducible Expression System* - (YES)), cuja metodologia foi desenvolvida por Routledge e Sumpter (1997).

Esse ensaio utiliza uma cepa modificada de *Saccharomyces cerevisiae* para identificar compostos que possam interagir com o receptor humano (hER). A levedura modificada possui o gene receptor de estrogênio humano ligado a um gene receptor que codifica a β -galactosidase. Na presença de compostos que apresentam atividade estrogênica, ou seja, que interferem no sistema endócrino, essa enzima é produzida e secretada no meio onde quebra o substrato cromogênico CPRG, havendo alteração de cor e, portanto, sendo quantificado por espectrofotometria (FISHER, 2013; DIAS *et al*, 2015; BARCELLOS, 2016).

O procedimento foi realizado conforme apresentado no trabalho realizado por Silva e colaboradores (DA SILVA, 2015). Para o ensaio foram realizadas as diluições seriadas

do controle positivo de 17- β -estradiol nas amostras e padrões estudados. As análises foram realizadas em microplacas de 96 poços, todo o material foi esterilizado e todos os ensaios foram feitos em duplicata.

Após a realização dos procedimentos referentes ao preparo dos meios de análise para o ensaio YES, os extratos são diluídos e transferidos para a placa de análise, no volume de 10 μ L para cada poço. Posteriormente evapora-se até a secura. A disposição da colocação das amostras e dos brancos na placa é apresentada na figura 41 e foi realizada sempre de forma intercalada. O preparo das placas de ensaio envolve a análise da curva e das amostras na mesma placa. O ensaio requer a utilização de dois tipos de placas: placas de diluição e placas de ensaio. A curva de controle positivo abrangeu concentrações 1,3301 a 2724 ng L⁻¹ de 17- β -estradiol.

Após as diluições das amostras e da curva, as placas foram lacradas e agitadas por 2 minutos em um agitador de placas. Em seguida, as amostras foram encubadas em estufa a 30°C por 72 horas. Decorrido o tempo de encubação já é possível a observação da alteração da coloração nas placas, de amarelo para vermelho, quando há atividade estrogênica. Então é feita a leitura das placas no comprimento de onda de 575 nm, para avaliação da cor e 620 nm para análise de turbidez.

Todo o procedimento adotado para os brancos e curva também foi realizado nas amostras. Além das amostras, foram enviadas soluções dos padrões (17- β -etinilestradiol, 4-nonilfenol, atrazina, simazina, bisfenol A, cafeína e triclosan) nas concentrações 0,1 e 1 μ g L⁻¹ para verificar o potencial estrogênico individual de cada composto analisado. A análise dos dados referentes ao ensaio YES é realizado através de curvas de dose-resposta.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Avaliação da presença de Compostos Orgânicos Emergentes em águas superficiais e tratadas

O método desenvolvido e validado nesse trabalho foi utilizado para a determinação de 7 Compostos Orgânicos Emergentes, abrangendo diferentes classes de substâncias em águas superficiais e tratadas de Campos dos Goytacazes e regiões próximas.

Os pontos amostrais selecionados para monitoramento dos COE e avaliação da atividade estrogênica, como relatado anteriormente, foram Rio Paraíba do Sul, na qual as amostras foram coletadas na ponte Alair Ferreira (água bruta). A ponte fica próxima a mais importante ETA que abastece a maior parte da região urbana de Campos dos Goytacazes (350.000 habitantes). A água tratada desta ETA foi coletada em uma residência em torneira direta, sem passar pela caixa d'água. Outro ponto amostral foi na localidade de Santo Eduardo, onde se localiza a ETA que abastece as regiões de Santo Eduardo, Santa Maria e Espírito Santinho (6.000 habitantes). Nessa localidade a amostra bruta foi coletada na ponte do Rio Itabapoana e a água tratada em uma residência próxima à ETA.

A ETA de Donana capta água para abastecimento público de poços profundos. Nesse sentido, foram realizadas coletas nesse ponto, visando avaliar a presença de COE nesse tipo de corpo hídrico, o qual a princípio, não está impactado por descarte de águas residuais. A amostra de água tratada foi coleta em torneira direta de uma escola próxima à ETA Donana. Devido à dificuldade de achar um manancial que seja representativo para ausência desses compostos para o branco amostral, foi utilizada água deionizada (Tipo 1) que passou pelo mesmo procedimento que as amostras.

Conforme descrito no item 3.4.1, na primeira campanha as amostras foram ressuspendidas, na etapa final a 500 μL e não foi possível a quantificação de nenhum dos COE abordados nesse estudo. Apenas foram detectados os compostos: cafeína e bisfenol A nas amostras brutas do RPS. A partir da segunda campanha todas as amostras foram ressuspendidas em 100 μL , concentrando as em 5 vezes e potencializando a capacidade do método analítico e alcançando LQ e LD menores e, dessa forma, conseguindo quantificar os analitos nas demais campanhas. Todavia, o melhor desempenho do método proposto foi alcançado após o procedimento de derivatização, realizado a partir da terceira campanha, que favoreceu, conforme é apresentado na **figura 25** a sensibilidade do método e o alcance de LD e LQ compatíveis com as concentrações encontradas no ambiente para esses compostos.

A presença de COE foi investigada no Rio Paraíba do Sul e Rio Itabapoana e em suas respectivas ETA durante os anos 2016 a 2018. Na primeira coleta também foi analisado o fármaco diclofenaco, no entanto, devido à dificuldade para aquisição do padrão não foi possível manter o custeio para análise desse contaminante. Nas duas primeiras coletas, as quais esse fármaco foi analisado, sua presença não foi detectada.

Com relação aos demais compostos estudados, a tabelas **18 e 19** mostram as concentrações encontradas nas amostras de águas bruta e água tratada nas oito campanhas realizadas. Todos os compostos avaliados foram detectados pelo menos uma vez em alguma amostra. As frequências de detecção são apresentadas no gráfico apresentado na **figura 40**.

Tabela 17: Resultados dos COE em amostras de água Bruta dos Rios Paraíba do Sul e Itabapoana

Amostras Brutas							
Campanha/Manancial	NON (ng L⁻¹)	ATZ (ng L⁻¹)	BPA (ng L⁻¹)	CAF (ng L⁻¹)	SIM (ng L⁻¹)	TCS (ng L⁻¹)	EE2 (ng L⁻¹)
2ª Coleta (RPS)	<LD	<LD	450,0	<LD	<LD	<LD	<LD
3ª Coleta (RPS)	1200,0	<LD	90,0	360,0	<LD	460,0	<LD
3ª Coleta (RI)	780,0	<LD	<LD	290,0	<LD	170,0	<LD
4ª Coleta (RPS)	20,4	62,7	49,6	127,8	<LD	80,3	<LD
4ª Coleta (RI)	32,9	56,1	77,0	<LD	<LD	<LD	<LD
5ª Coleta (RPS)	18,1	<LD	34,7	170,5	<LD	<LD	106,8
5ª Coleta (RI)	38,8	<LD	111,3	593,6	<LD	<LD	258,0
6ª Coleta (RPS)	11,4	<LD	53,9	<LD	<LD	<LD	<LD
6ª Coleta (RI)	27,9	<LD	129,9	91,6	<LD	<LD	<LD
6ª Coleta (Donana)	14,4	<LD	128,2	<LD	<LD	<LD	<LD
7ª Coleta (RPS)	22,5	<LD	252,7	76,7	<LD	<LD	21,0
7ª Coleta (RI)	171,5	<LD	524,4	1781,8	<LD	15,2	182,1
8ª Coleta (RPS)	<LD	77,7	172,9	948,0	56,7	42,3	1831,4
8ª Coleta (RI)	15,6	<LD	21,9	273,6	20,8	<LD	94,9

Tabela 18: Resultados dos COE em amostras de água tratada das ETA Coroa e Sta Maria/Sto Eduardo referentes às fontes de captação Rios Paraíba do Sul e Itabapoana, respectivamente.

Amostras Tratadas							
Campanha/Manancial	NON (ng L⁻¹)	ATZ (ng L⁻¹)	BPA (ng L⁻¹)	CAF (ng L⁻¹)	SIM (ng L⁻¹)	TCS (ng L⁻¹)	EE2 (ng L⁻¹)
2ª Coleta (RPS)	<LD						
3ª Coleta (RPS)	<LD	<LD	<LD	90,0	<LD	<LD	<LD
3ª Coleta (RI)	<LD	<LD	<LD	110,0	<LD	<LD	<LD
4ª Coleta (RPS)	17,6	85,4	6,2	39,3	<LD	40,3	<LD
4ª Coleta (RI)	22,7	210,7	48,7	<LD	<LD	<LD	<LD
5ª Coleta (RPS)	12,2	<LD	18,6	96,0	<LD	<LD	<LD
5ª Coleta (RI)	29,9	<LD	37,8	211,7	<LD	<LD	211,5
6ª Coleta (RPS)	9,2	<LD	46,0	<LD	<LD	<LD	<LD
6ª Coleta (RI)	18,5	<LD	61,2	65,9	<LD	<LD	<LD
6ª Coleta (Donana)	5,7	<LD	117,5	<LD	<LD	<LD	<LD
7ª Coleta (RPS)	<LD	<LD	<LD	22,6	<LD	<LD	<LD
7ª Coleta (RI)	66,2	<LD	57,4	804,8	<LD	<LD	<LD

8ª Coleta (RPS)	<LD	<LD	28,2	<LD	39,5	11,7	315,2
8ª Coleta (RI)	6,2	<LD	<LD	83,2	25,3	<LD	85,3

Os compostos com maior frequência de detecção foram o Bisfenol A (79%), Cafeína (75%) e Nonilfenol (79%). Estudos realizados com relação à presença de cafeína apontam que esse composto é frequentemente detectado em diferentes ambientes aquáticos. Dessa forma, a cafeína tem sido considerada um indicador confiável de poluição em ambientes aquáticos urbanos (SIEGENER; CHEN, 2002; FERREIRA, 2005; HILLEBRAND et al., 2012; CANELA et al., 2014b). A presença de cafeína em amostras de água bruta indica que possivelmente existe uma contaminação por esgoto e que da mesma forma que essa substância está presente, outros compostos orgânicos podem estar também.

A cafeína também foi detectada com frequência (75%) nas amostras de água tratada. No trabalho realizado por Raimundo (2011), a autora aponta a presença de cafeína em amostras de água tratada dos rios Atibaia e Capivari, localizados na cidade de Campinas, São Paulo. A faixa de concentração dessa substância variou de 47 - 4324 ng L⁻¹. Na avaliação da presença de cafeína em águas tratadas das principais capitais brasileiras também foi observada uma alta frequência de detecção (93%) para essa substância. (CANELA et al., 2014). As concentrações de cafeína nesse trabalho variaram na faixa de 2,0 a 2769 ng L⁻¹, onde a concentração mais alta foi encontrada na região Sul do país.

Também foram identificadas concentrações altas de 17-β-etinilestriadiol em amostras de água tratada (Concentração máxima encontrada = 315 ng L⁻¹) e bruta (Concentração máxima encontrada = 1831 ng L⁻¹). A presença dessa substância sinaliza a possibilidade de potencial para atuar como interferente endócrino. No trabalho desenvolvido por Ghiselli (2006), analisando a presença de contaminantes emergentes em esgoto, águas superficiais e águas tratadas de mananciais usados para captação de água para abastecimento da região de Campinas foi quantificado etinilestradiol em concentrações variando de 1-3,5 µg L⁻¹, ou seja, mais alto do que os valores obtidos neste trabalho

O nonilfenol e Bisfenol A também apresentam alta porcentagem de frequência nas amostras de águas brutas e tratadas. Esses compostos integram a lista de compostos de prioridade da União Europeia para fiscalização e aprofundamento dos seus

efeitos tóxicos ao ambiente e na saúde humana. No trabalho realizado por Beraldo (2012) foram determinados nonilfenol e bisfenol A em amostras de águas superficiais e efluente de estação de tratamento de esgoto em concentrações que variaram entre 5,028 a 10,524 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 5,645 a 295,225 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Os demais compostos triclosan, atrazina e simazina, embora tenham sido detectados com menor frequência também são considerados preocupantes com relação à qualidade de águas. A atrazina é o único composto contemplado pela legislação que controla a qualidade da água destinada ao consumo humano, através da Portaria 2914 do Ministério da Saúde. Essa portaria estabelece que os valores de atrazina não devem ultrapassar 2 $\mu\text{g L}^{-1}$. Não foram encontrados valores que ultrapassassem esse limite em nenhuma das amostras analisadas. No entanto, a legislação brasileira apresenta valores superestimados para os poucos compostos orgânicos que ela abrange. A legislação de outros países, como a União Europeia estabelece que um pesticida individual possa estar presente em uma amostra de água com uma concentração máxima de 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ e a concentração total de vários pesticidas não pode ultrapassar 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (COUNCIL DIRECTIVE, 1998). No caso da atrazina, ela é proibida em vários países e seus efeitos como interferente endócrino é conhecido na literatura (GHISELLI; JARDIM, WILSON, 2007).

A simazina apresenta estrutura muito semelhante à atrazina e também é considerada interferente endócrino por órgãos internacionais como UKEA (do inglês *United Kingdom Environmental Agency*), USEPA (do inglês *United States Environmental Protection Agency*) e OSPAR (do inglês *Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic*).

A cafeína, considerada um marcador de contaminação ambiental teve sua concentração avaliada com a pluviosidade durante o período amostral. A figura 38 apresenta o gráfico referente à variação da concentração de cafeína no Rio Paraíba do Sul. Através da análise do gráfico é possível concluir que a cafeína apresenta um aumento de concentração em períodos de estiagem, podendo ser melhor observado, principalmente na 8 campanha. Os valores para cafeína no Rio Paraíba do Sul variaram de 18 a 948 ng L^{-1} .

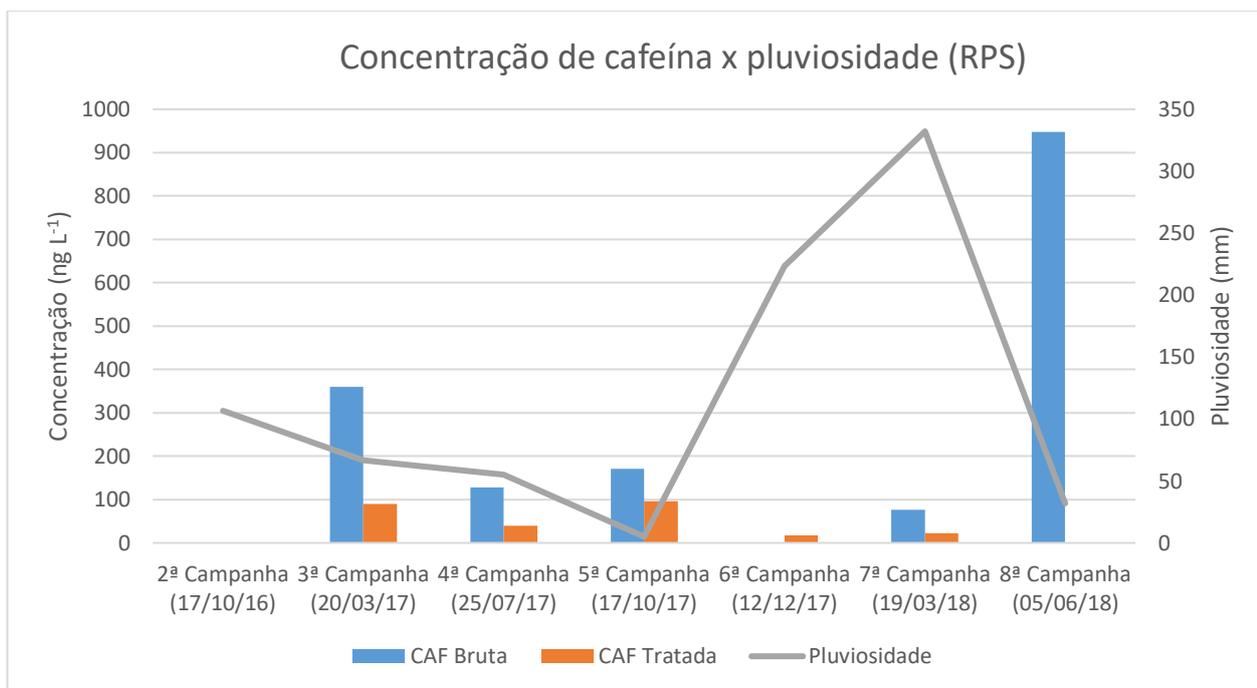


Figura 38: Resultados da variação da concentração de cafeína em relação à pluviosidade do período amostral nos anos 2016 a 2018 no Rio Paraíba do Sul.

O Rio Itabapoana apresentou concentrações maiores de cafeína em suas águas, em períodos de cheia, indicando um comportamento inverso ao obtido no RPS, conforme apresentado na figura 39, atingindo os maiores valores de concentração para essa substância na sétima campanha, período que EM apresentou a maior concentração de precipitação de chuvas. Isso pode ter ocorrido porque é um rio que apresenta uma dimensão menor, então fica mais susceptível a contaminação em decorrência do efeito de escoamento das águas da chuva carregando a contaminação para o Rio. Nesse manancial as concentrações de cafeína variaram em de 83 a 1782 ng L⁻¹.

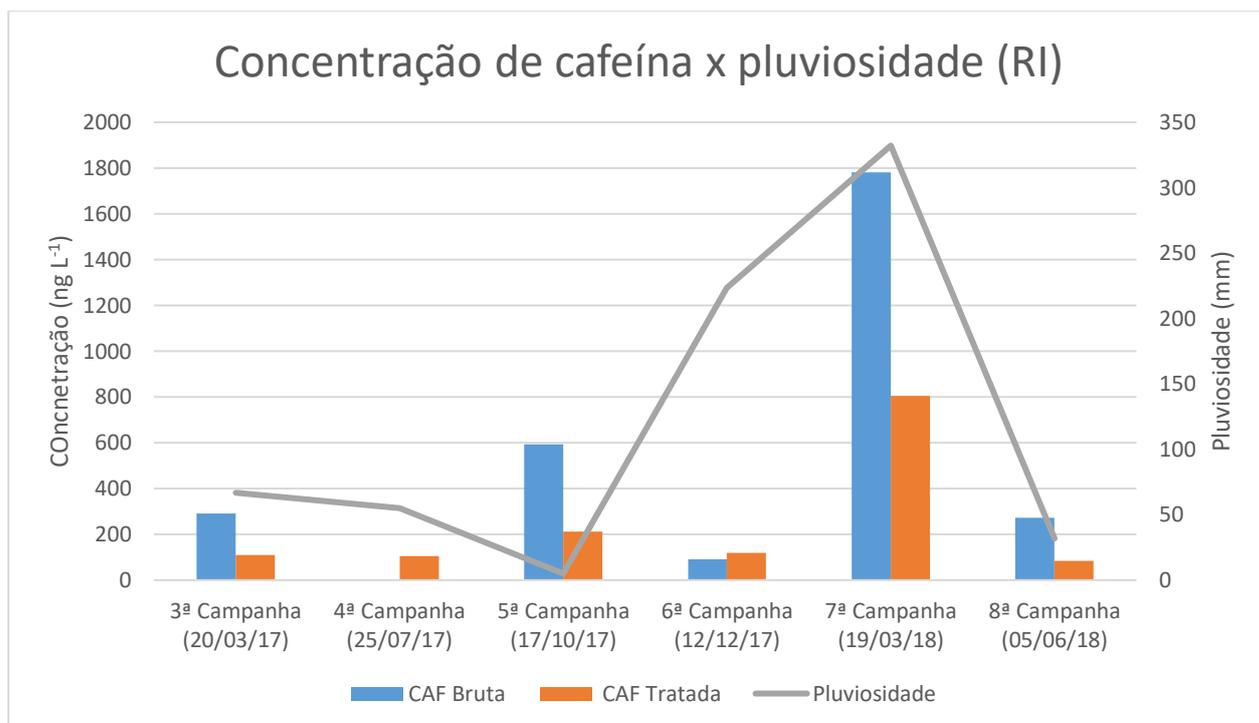


Figura 39: Resultados da variação da concentração de cafeína em relação à pluviosidade do período amostral nos anos 2016 a 2018 no Rio Paraíba do Sul.

A faixa de concentração mais alta para cafeína coincidiu com os resultados de maior presença de COE no Rio Itabapoana, comparado com o Rio Paraíba do Sul, conforme apresentado na figura 40. A avaliação com relação ao padrão de consumo e características do uso da terra também influencia consideravelmente no impacto dos recursos hídricos e espelham o padrão de consumo da comunidade em suas margens. Ao compararmos a presença dos COE nos diferentes mananciais, podemos concluir que o Rio Itabapoana apresenta maior concentração e frequência de detecção dos COE abordados nesse estudo. Também é possível observar que os compostos simazina e atrazina são mais detectados no Rio Itabapoana. Estes resultados podem estar relacionados ao fato desse rio cortar regiões do interior do Estado, onde as culturas agrícolas são mais presentes quando comparados com as regiões próximas das margens do RPS.

Representação da frequência de detecção dos COE no RPS e RI

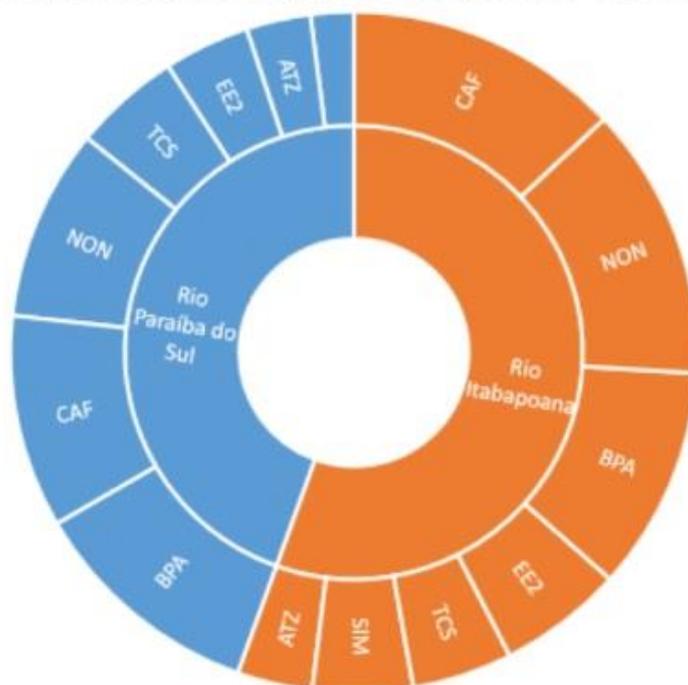


Figura 40: Representação da frequência de detecção dos COE analisados em amostras brutas e tratadas nos Rios Paraíba do Sul e Itabapoana.

Na sexta campanha, as amostras foram submetidas à quantificação utilizando LC-ESI-MS/MS na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) no Laboratório de Química Ambiental que pertence ao Departamento de Química Analítica em colaboração com a professora Dr^a Cassiana Carolina Montagner Raimundo.

Os parâmetros das regressões lineares para cada composto são apresentados na tabela 20. Os compostos apresentaram valores de coeficiente de correlação (r) maiores que 0,99, conforme estabelece a ANVISA, exceto para o triclosan e 4-nonilfenol. O INMETRO recomenda que o coeficiente de correlação seja maior que 0,90. Dessa forma, esses dois compostos estão adequados nessa legislação.

Os resultados referentes às análises de GC-MS e LC-ESI-MS/MS são apresentados na **tabela 21**. Podemos concluir que o triclosan foi detectado nas amostras brutas dos três pontos coletados. Ao se analisar e comparar com os resultados obtidos pela análise de GC-MS, vemos que para esse composto a técnica de LC-ESI-MS/MS apresenta maior sensibilidade do que a análise por GC-MS. O mesmo pode ser observado para a atrazina que não foi detectada por GC-MS, no entanto, por LC-ESI-MS/MS foi possível detectar essa substância.

Vale destacar que variabilidade nos resultados em análises interlaboratórios é comum, ocorrendo até quando se trata da mesma amostra (RIBANE et al, 2004). Essas variações podem estar associadas às diferenças no procedimento de evaporação, ocorrendo perdas, interação com o solvente na ressuspensão, forma de ionização e até mesmo interação do composto com a coluna por se tratar de técnicas analíticas diferentes.

Tabela 19: Parâmetros da Curva analítica para os compostos estudados

Compostos	Curvas analíticas	R
Atrazina	$y = 5017,2x + 11124$	0,9918
Simazina	$y = 2791,2x - 22042$	0,9927
Triclosan	$y = 93,663x - 19981$	0,9750
Bisfenol A	$y = 39,798x - 2569$	0,9891
Nonilfenol	$y = 7100,3x - 7480,2$	0,9349
Cafeína	$y = 554,73x - 47190$	0,9894
17-β-etinilestradiol	$y = 36,257x - 1121,6$	0,9933

Tabela 20: Resultados das análises de GC-MS e LC-ESI_MS/MS referentes à sexta campanha**COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS GC-MS X LC-MS/MS**

AMOSTRAS	GC-MS com Reação de Derivatização							LC-MS/MS						
	NON (ng L ⁻¹)	CAF (ng L ⁻¹)	ATZ (ng L ⁻¹)	TCS (ng L ⁻¹)	SIM (ng L ⁻¹)	BPA (ng L ⁻¹)	EE2 (ng L ⁻¹)	NON (ng L ⁻¹)	CAF (ng L ⁻¹)	ATZ (ng L ⁻¹)	TCS (ng L ⁻¹)	SIM (ng L ⁻¹)	BPA (ng L ⁻¹)	EE2 (ng L ⁻¹)
AMOSTRA TRATADA DONANA	5,7	<LD	<LD	<LD	<LD	117,5	<LD	2,3	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
AMOSTRA TRATADA STA MARIA	18,5	65,9	<LD	<LD	<LD	61,2	<LD	<LD	81,8	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
AMOSTRA TRATADA COROA	9,2	<LD	<LD	<LD	<LD	46,0	<LD	<LD	109,3	45,5	<LD	<LD	<LD	<LD
AMOSTRA BRUTA DONANA	14,4	<LD	<LD	<LD	<LD	128,2	<LD	5,5	<LD	<LD	386,2	<LD	47,8	<LD
AMOSTRA BRUTA STA MARIA	27,9	91,6	<LD	<LD	<LD	129,9	<LD	3,9	561,5	38,9	274,7	<LD	<LD	<LD
AMOSTRA BRUTA COROA	11,4	<LD	<LD	<LD	<LD	53,9	<LD	5,6	175,2	<LD	384,0	<LD	121,5	<LD

3.5.2 Avaliação da atividade estrogênica das amostras

O ensaio YES permite avaliar o potencial estrogênico das amostras ou substâncias padrões por meio da espectroscopia colorimétrica. O ensaio avalia a alteração de cor através da degradação do CPRG (coloração amarelo) pela enzima β -galactosidase, que é produto da ligação da substância estrogênica com o receptor de estrogênio humano (REh) que degrada formando como produto o CPRG (coloração vermelha).

A determinação da atividade estrogênica envolve a realização de concentração das amostras e diluição do controle positivo com o objetivo de garantir que as concentrações das amostras estejam dentro da faixa de trabalho da curva do controle positivo. Esse procedimento foi realizado através de diluições seriadas, conforme apresentado na figura 41.

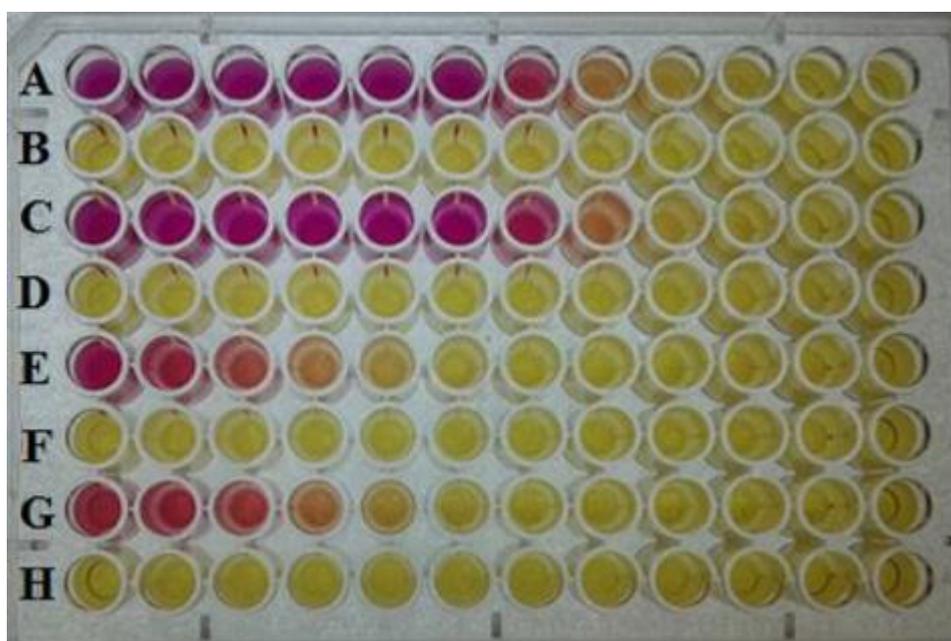


Figura 41: Placa de ensaio de 96 poços. Fileiras A e C referentes à curva de 17- β -estradiol em duplicata. Fileiras E e G referentes à amostra e as fileiras B, D, F e H são brancos.

Através das leituras das diluições seriadas é possível a construção da curva dose-resposta conforme apresentado na figura 41. As concentrações abrangidas pela curva dose-resposta de 17- β -estradiol variaram de 1,3301 a 2724 ng L⁻¹ (fileiras A e C) O controle negativo é o branco e o positivo o padrão de 17- β -estradiol (fileiras B, D, F e H).

O gráfico da figura 42 apresenta no eixo y as absorvâncias corrigidas e no eixo x, as concentrações da amostra ou do padrão expressas em ng L^{-1} em escala logarítmica. Dessa forma, a porção ascendente da curva é linear e os pontos que compõem essa reta equivalem à máxima e mínima produção da enzima β -galactosidase nesse ensaio.

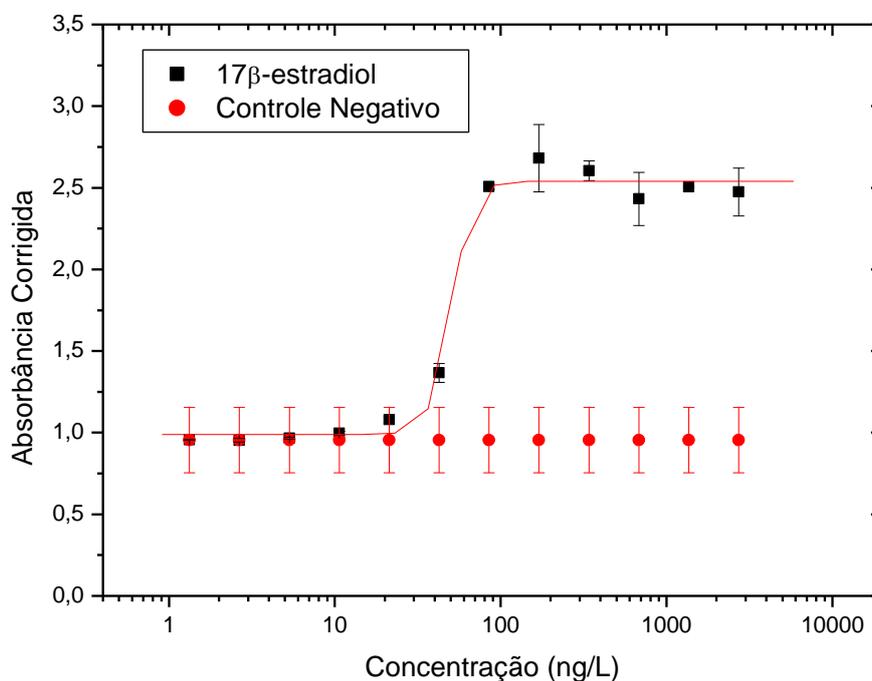


Figura 42: Curva dose-resposta do controle positivo (17- β -estradiol) na faixa de concentração 1,330 a 2724 ng L^{-1} .

Através do ensaio YES é possível o cálculo do CE_{50} de acordo com o proposto por Alexander e colaboradores (1999). Esse valor corresponde à concentração que elucida 50% da maior resposta (absorvância) obtida da β -galactosidase em relação à curva padrão (controle positivo) no ensaio YES. O valor de CE_{50} para o 17- β -estradiol foi calculado com base no método proposto por Alexander e corresponde a 33 ng L^{-1} .

O ensaio YES foi realizado pelo Laboratório de Engenharia Sanitária (LES) da UERJ em colaboração com a professora Dr^a Daniele Maia Bila. Para avaliar questões relacionadas à forma de envio e armazenagem das amostras foram testadas condições de envio das amostras. As condições extração I, envolveu a extração no laboratório da UENF, extraíndo cada litro de amostra em um cartucho, totalizando 2 L e unindo as

frações no final e ressuspensando em 500 µL. A Extração II o processo de extração foi realizado no laboratório da UENF e foram enviados 2 cartuchos tendo passado 1 L de amostra em cada e enviados para eluição e ressuspensão no laboratório da UERJ e o processo de extração III envolveu a extração no laboratório da UENF através da passagem de 2 L de amostra em um único cartucho, eluição e ressuspensão para envio das amostras já preparadas. A tabela 17 apresenta os resultados obtidos para avaliação dos processos de extração para a melhor forma de envio das amostras para análise de atividade estrogênica.

Tabela 21: Resultados para avaliação da melhor condições de envio das amostras para Ensaio YES

TIPO DE EXTRAÇÃO	TIPO DE AMOSTRA	RESULTADOS EXPRESSOS EM EQ-E2 (NG L ⁻¹)
EXTRAÇÃO I	Bruta	13,50
		13,07
	Tratada	1,47
		0,44
EXTRAÇÃO II	Bruta	<LD
		<LD
	Tratada	<LD
		<LD
EXTRAÇÃO III	Bruta	2,5
		7,12
	Tratada	<LD
		1,28

Os resultados apontam que a melhor forma para envio das amostras foi através da extração I, na qual são usados 2 cartuchos para extração das amostras, onde as amostras são extraídas e todo o procedimento de preparo de amostra é realizado no laboratório da UENF. As amostras são enviadas prontas para análise para o laboratório da UERJ. Essas amostras são armazenadas em recipientes herméticos, conservadas em gelo e enviadas por via expressa..

Após avaliação da melhor condição de extração, foi realizado o estudo dos efeitos individuais de cada padrão com relação ao seu potencial estrogênico. Os resultados são apresentados na figura 43. Dentre os compostos avaliados, o Bisfenol A ($CE_{50} = 363,7 \text{ ng L}^{-1}$), 17- α -etinilestradiol ($CE_{50} = 42,7 \text{ ng L}^{-1}$) e 4-nonilfenol ($CE_{50} = 101,2 \text{ ng L}^{-1}$) apresentam potencial estrogênico e suas curvas dose-resposta são apresentadas na figura 43. O LD e LQ para o ensaio YES obtidos foram 0,002 e 0,007 ng L⁻¹, respectivamente.

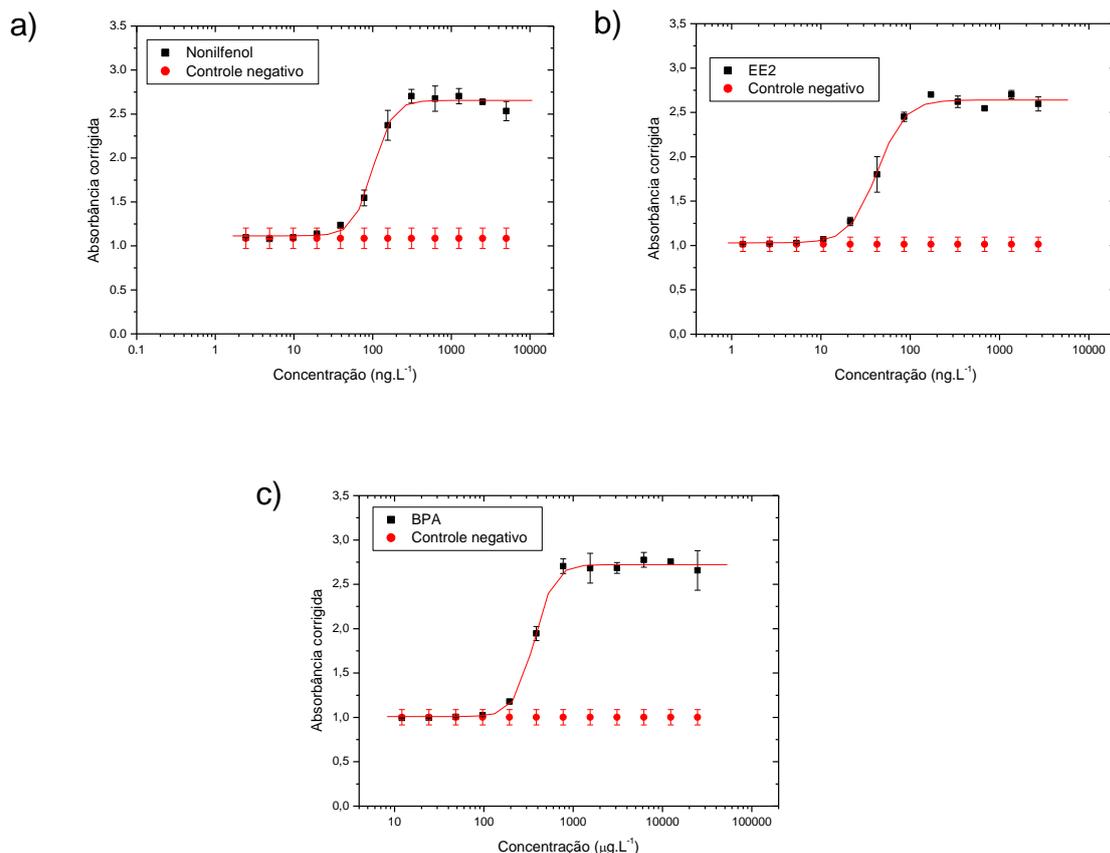


Figura 43: Curva dose-resposta do controle positivo para os compostos a) nonilfenol; b) 17- α -etinilestradiol e c) Bisfenol A.

As amostras, a partir da segunda campanha, com exceção da terceira campanha foram submetidas à análise por meio do ensaio YES. Os resultados, juntamente com as concentrações encontradas para os compostos analisados por GC-MS são apresentados na tabela 14. Os resultados são expressos em equivalente de 17- β -estradiol (E2) e do total de amostras analisadas verifica-se a presença predominante de amostras que apresentam atividade estrogênica, principalmente para as amostras de água bruta do RPS. Somente na sétima campanha, esse ponto amostral apresentou concentração abaixo do limite de detecção, coincidindo com o maior período de chuvas e a baixa concentração dos contaminantes emergentes.

As amostras de poço profundo apresentaram atividade estrogênica tanto para as amostras de água bruta quanto para água tratada. Esse resultado chama a atenção, pois esses mananciais são considerados mais protegidos das atividades antrópicas e não deveriam apresentar atividade estrogênica. No entanto, para avaliar a presença desses contaminantes nesse tipo de amostra deveria haver um estudo mais detalhado.

Tabela 22: Concentrações dos COE determinados por GC-MS em ng L⁻¹ e os resultados do teste YES que apresentaram resultados para atividade estrogênica.

Campanha	Ponto Amostral	Tipo de amostrta	EE2 (ng L ⁻¹)	NON (ng L ⁻¹)	BPA (ng L ⁻¹) ¹⁾	Resp. YES (EQ-E2 ng L ⁻¹)
2ª Campanha	Coroa	Bruta	<LD	<LD	450,0	1,69
		Tratada	<LD	<LD	<LD	<LD
4ª Campanha	Sta Maria/Sto Eduardo	Bruta	<LD	32,9	77,0	3
		Tratada	<LD	22,7	48,7	5,5
	Coroa	Bruta	<LD	20,4	49,6	3,5
		Tratada	<LD	22,0	6,2	1,4
5ª Campanha	Sta Maria/Sto Eduardo	Bruta	258,0	38,8	111,3	<LD
		Tratada	211,5	29,9	37,8	<LD
	Coroa	Bruta	106,8	18,1	34,7	0,3
		Tratada	<LD	12,2	18,6	<LD
6ª Campanha	Sta Maria/Sto Eduardo	Bruta	<LD	27,9	129,9	0,2
		Tratada	<LD	18,5	61,2	<LD
	Coroa	Bruta	<LD	11,4	53,9	0,4
		Tratada	<LD	9,0	30,1	<LD
	Donana	Bruta	<LD	14,4	128,2	0,3
		Tratada	<LD	12,3	117,5	0,2
7ª Campanha	Sta Maria/Sto Eduardo	Bruta	182,1	171,5	524,4	<LD
		Tratada	<LD	66,2	57,4	<LD
	Coroa	Bruta	21,0	22,5	252,7	<LD
		Tratada	<LD	<LD	<LD	<LD
8ª Campanha	Sta Maria/Sto Eduardo	Bruta	94,9	15,6	21,9	<LD
		Tratada	94,7	6,2	<LD	<LD
	Coroa	Bruta	1831,4	12,7	172,9	0,3
		Tratada	315,2	11,0	28,2	<LQ

Na campanha 4 é observado que a atividade estrogênica das amostras de água tratada Coroa e Stª Maria/Stº Eduardo apresentaram valores maiores do que as amostras de água bruta. Isso pode ter ocorrido em função da formação de subprodutos durante os processos de desinfecção das ETA formando compostos que apresentam características mais tóxicas do que a substância de origem. Alguns trabalhos apontam a presença de subprodutos formados após a etapa de desinfecção em águas tratadas,

principalmente com os desinfetantes mais usados como o cloro, ozônio, dióxido de cloro e cloraminas (NIEUWENHUIJSEN et al., 2009; PARVEZ; FROST; SUNDARARAJAN, 2017; RICHARDSON et al., 2007). Efeito similar foi encontrado para alguns pesticidas organosforados depois da cloração que também apresentaram maior toxicidade do que antes desta etapa, quando foi realizado um estudo usando o ensaio de toxicidade com Acetilcolinesterase (COSTA et al, 2018). Aliado a isso, também são avaliados os efeitos na saúde humana como consequência dessa exposição. Tem sido associado o consumo da água clorada a um aumento no risco de câncer. Trabalho realizado por Koivusalo e colaboradores (1994) mostrou que câncer na bexiga e no rim está associado à mutagenicidade da água consumida devido à presença de furanona clorada ou possivelmente outros subprodutos do processo de desinfecção.

Não houve uma correlação entre os resultados de YES e as concentrações encontradas nas amostras pela análise de GC-MS. Houve uma variação muito grande com relação aos resultados positivos obtidos no ensaio YES e as concentrações encontradas por GC-MS. No trabalho realizado por Raimundo (2011) também foi relacionada a atividade estrogênica por meio do ensaio BLYES com as concentrações encontradas nas amostras em análise por LC-MS. No entanto, também não foi possível estabelecer essa relação. Nesse estudo foi concluído que outros compostos que não foram abordados no estudo também contribuíram para potencializar esses efeitos.

É importante salientar que o ensaio YES é apenas um direcionamento para um estudo mais profundo a respeito da origem da atividade estrogênica. No entanto, o fato de ser observada a atividade estrogênica em água tratada é um ponto importante, relacionado à saúde pública. No que se refere ao ambiente, como observado na revisão da literatura, os efeitos dos COE que apresentam potencial estrogênico podem interferir no ecossistema e causar desequilíbrios ambientais.

No trabalho realizado por Dias e colaboradores (2015) foi avaliada a atividade estrogênica por meio do ensaio YES em amostras de águas superficiais dos Rios Paraíba do Sul e Guandu e as águas que passaram pelo tratamento de suas respectivas ETA. Os resultados mostraram que o processo de tratamento não é eficiente na remoção das substâncias e que há incidência de atividade estrogênica, em níveis maiores que 1 ng L^{-1} de equivalente de E2 (17- β -estradiol).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Rio Paraíba do Sul e o Rio Itabapoana são importantes mananciais usados para a captação de água para abastecimento público da região de Campos dos Goytacazes e municípios do interior. Diante dos resultados apresentados nesse trabalho ficou evidente a necessidade de monitoramento da qualidade desses corpos hídricos e que são necessários estudos mais profundos sobre os efeitos dos COE e seus impactos no ambiente.

Os processos de otimização do procedimento de extração e das condições ideais de derivatização dos COE analisados contribuíram para tornar a extração mais eficiente e permitiu o alcance de concentrações encontradas nos ambientes naturais, embora não tenha sido usado equipamentos mais sofisticados como os cromatógrafos líquidos de alta eficiência com tandem de massas (MS/MS) e tempo de voo.

Todos os COE analisados foram detectados em pelo menos uma amostra. Os principais compostos detectados foram bisfenol A, nonilfenol e cafeína e os compostos que apresentaram as maiores concentrações foram o nonilfenol (1200 ng L⁻¹), a cafeína (1781 ng L⁻¹) e a 17- α -etinilestradiol (1831 ng L⁻¹). Este último é considerado um marcador químico de contaminação por esgoto e foi detectado em 75% de um total de 28 amostras analisadas. Com relação ao teste YES, as amostras de água bruta apresentaram atividade estrogênica, com exceção de um ponto amostral, mostrando a maior incidência de COE nestas águas. Os compostos que apresentaram potencial estrogênico foram bisfenol A, 17- α -etinilestradiol e nonilfenol, representando uma situação de degradação do corpo hídrico. As amostras de água tratada apresentaram menor frequência de detecção em relação às amostras brutas. No entanto, quando se realiza uma análise mais detalhada dos resultados obtidos para concentrações de COE e resultados de YES, há baixa correlação que se possa concluir que a presença destes compostos está diretamente relacionada a efeitos positivos no teste YES. Sendo assim, uma investigação mais exaustiva deveria ser feita ou ainda outro teste de estrogenicidade que comprovasse estes resultados.

As amostras de água subterrânea, contrariando as expectativas, apresentaram os compostos nonilfenol e bisfenol A em amostras de água tratada e bruta, além de apresentarem potencial estrogênico. A presença destes compostos nestas águas pode ser advinda de materiais usados nos sistemas de bombeamento da água para

tratamento, já que para que pudesse ser relacionado à presença de infiltrações de esgoto doméstico, deveria aparecer algo de cafeína, que não foi detectada neste caso.

O perfil de contaminação varia de acordo com as características de cada região e o padrão de consumo reflete o tipo de contaminação do corpo hídrico. Conforme foi constatado, as amostras do Rio Itabapoana apresentaram maior frequência de detecção dos compostos estudados e em relação ao Rio Paraíba do Sul, onde também foram detectados os pesticidas atrazina e simazina. Os pesticidas poderiam ser em consequência da localização do rio, uma região do interior do Estado e onde as práticas agrícolas são mais comuns. Outra questão que poderia estar relacionada seria o efeito de matriz que poderia ser menos significativo em estas águas que recebem uma diversidade de outros poluentes, aumentando assim o limite de quantificação do método.

Finalmente, os resultados desse estudo mostraram que os efeitos da utilização intensiva de xenobióticos e incorporação de compostos sintéticos na indústria química têm sido refletidos na presença desses compostos nos ambientes aquáticos, interferindo nos ecossistemas e contribuindo para a degradação da qualidade da água nesses mananciais. Esse trabalho contribuiu para apresentação de um cenário que tem sido relatado na literatura científica e que se reforça a necessidade de criação de uma legislação que seja abrangente para esses compostos que tem seus efeitos tóxicos já comprovados e são frequentemente relatados. Nesse sentido, é importante destacar a necessidade de promover trabalhos que busquem elucidar os mecanismos e efeitos desses compostos em corpos hídricos, uma vez que os COE é uma classe ampla de compostos e que ainda são desconhecidos muitos dos efeitos na saúde humana e no ambiente, assim como seu comportamento em ambientes naturais.

5 REFERÊNCIAS

- ABRASCO – CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S.; RIZOLLO, A.; MULLER, N. M.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, V. P.; MELLO, M. S. C. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro, 2012, 98 p.
- ADOLFFSON-ERICI, M.; PETTERSSON, M.; PARKKONEN, J.; STURVE, J. Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere*, v. 46, p. 1485-1489, 2002.
- AGEVAP. Plano de Recursos Hídricos da Bacia do Rio Paraíba do Sul - Resumo Plano de Recursos Hídricos da Bacia do Rio Paraíba do Sul - Resumo. 2006.
- ANA (Agência Nacional de Águas), Brasil. Conjuntura dos recursos hídricos: Informe 2016 - Brasília, 2016.
- ALLMYR, M.; ADOLFSSON-ERICI, M.; MCLACHLAN, M. S.; SANDBORGH-ENGLUND, G. Triclosan in plasma and milk from Swedish nursing mothers and their exposure via personal care products. *Science of the Total Environment*, v. 372, n. 1, p. 87–93, 2006.
- ANUMOL, T.; SNYDER, S. A. Rapid analysis of trace organic compounds in water by automated online solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, v. 132, p. 77–86, 2015.
- ANVISA. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>>.
- AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. DE L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. *Revista Engenharia Sanitária*, v. 18, n. 3, p. 187–204, 2013.
- ARAUJO, P. W.; BRERETON, R. G. Experimental design II. Optimization. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 15, n. 2, p. 63–70, 1996.
- BAI, X. et al. Occurrence, distribution, and seasonality of emerging contaminants in urban watersheds. *Chemosphere*, v. 200, p. 133–142, 2018.
- BAIN & COMPANY. Potencial de diversificação da Indústria química brasileira (Relatório 4 - Tensoativos) Relatório BNDES, Rio de Janeiro, 2014.
- BAKER, V. A. Endocrine disrupters - testing strategies to assess human hazard. *Toxicology*

in vitro, v. 15, p. 413–419, 2001.

BALLESTEROS-GÓMEZ, A.; RUIZ, F.; RUBIO, S.; PÉREZ-BENDITO, D. Determination of bisphenols A and F and their diglycidyl ethers in wastewater and river water by coacervative extraction and liquid chromatography-fluorimetry. *Analytica Chimica Acta*, v. 603, n. 1, p. 51–59, 2007.

BALLESTEROS-GÓMEZ, A.; RUBIO, S.; PÉREZ-BENDITO, D. Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, n. 3, p. 449–469, 2009.

BARCELLOS, P. S. Degradação e transformação da atrazina em solução aquosa e com ácido húmico sob ação da radiação solar. Dissertação (Mestrado). UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro 2012.

BATT, A. L.; KIM, S.; AGA, D. S. Comparison of the occurrence of antibiotics in four full-scale wastewater treatment plants with varying designs and operations. *Chemosphere*, v. 68, n. 3, p. 428–435, 2007.

BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008.

BILA, D. M. Degradação e remoção da atividade estrogênica do desregulador endócrino 17 β -estradiol pelo procesos de ozonização. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. *Química Nova*, v. 26, n. 4, p. 523–530, 2003.

BOIX, C.; IBÁÑEZ, M.; FABREGAT-SAFONT, D.; MORALES, E.; PASTOR, L.; SANCHO, J. V.; SÁNCHEZ-RAMÍREZ, J. E.; HÉRNANDEZ, F. Analytical methodologies based on LC-MS/MS for monitoring selected emerging compounds in liquid and solid phases of the sewage sludge. *MethodsX*, v. 3, p. 333–342, 2016.

BOLONG, N. et al. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*, v. 239, n. 1–3, p. 229–246, 2009.

BRAUSCH, J. M.; RAND, G. M. A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere*, v. 82, n. 11, p. 1518–1532, 2011.

BUCHBERGER, W. W. Novel analytical procedures for screening of drugs residues in water, wastewater, sediment and sludge. *Analytica Chimica acta*, v. 593, n. 2, p.

129-139, 2007.

BUERGE, I. J.; POIGER, T.; MULLER, M. D.; BUSER, H. Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. *Environmental Science and Technology*, v. 37, n. 4, p. 691–700, 2003.

BUTT, M. S.; SULTAN, M. T. Coffee and its consumption: Benefits and risks, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 51, n. 4, p. 363-373, 2011.

CANELA, M. C.; JARDIM, W. J.; SODRÉ, F. F.; GRASSI, M. T. Cafeína em águas de abastecimento público no Brasil. INCTAA - Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas. Ed. Cubo, São Carlos, 96 p., 2014.

CELIZ, M. D.; PEREZ, S.; BARCELÓ, D.; AGA, D. S. Trace analysis of polar pharmaceuticals in wastewater by LC-MS-MS: Comparison of membrane bioreactor and activated sludge systems. *Journal of Chromatographic Science*, v. 47, n. 1, p. 19–25, 2009.

CHEN, Z.; PAVELIC, P.; DILLON, P.; NAIDU, R. Determination of caffeine as a tracer of sewage effluent in natural waters by on-line solid-phase extraction and liquid chromatography with diode-array detection. *Water Research*, v. 36, n. 19, p. 4830–4838, 2002.

CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. *Quimica Nova*, v. 24, n. 3, p. 374–380, 2001.

COVA, D.; MOLINARI, G. P.; ROSSINI, L. Focus on toxicological aspects of pesticides chemical interaction in drinking water contamination. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 20, p. 234-240, 1990.

CRAGIN, L. A.; KESNER, J. S.; BACHAND, A. M.; BARR, D. B.; MEADOWS, J. W.; KRIEG, E. F.; REIF, J. S. Menstrual cycle characteristics and reproductive hormone levels in women exposed to atrazine in drinking water. *Environmental Research*, v. 111, n. 8, p. 1293–1301, 2011.

CUNNINGHAM, V. L.; BINKS, S. P.; OLSON, M. J. Human health risk assessment from the presence of human pharmaceuticals in the aquatic environment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 53, n. 1, p. 39–45, 2009.

DA SILVA, G. G. M. Avaliação da qualidade de águas superficiais e de sedimentos quanto à toxicidade e atividade estrogênica. Tese (doutorado), UERJ, Rio de Janeiro, p.

118, 2015.

- DANESHVAR, A.; ABOULFADL, K.; VIGLINO, L.; BROSEÚS, R.; SAUVÉ, S.; MADOUX-HUMERY, A.; WEYHENMEYER, G. A.; PRÉVOST, M. Evaluating pharmaceuticals and caffeine as indicators of fecal contamination in drinking water sources of the Greater Montreal region. *Chemosphere*, v. 88, n. 1, p. 131–139, 2012.
- DAVIDIDOU, K. Sustainable photocatalytic oxidation processes for the treatment of emerging microcontaminants. [s.l.: s.n.].
- DI DEA BERGAMASCO, A. M. et al. Bioluminescent yeast estrogen assay (BLYES) as a sensitive tool to monitor surface and drinking water for estrogenicity. *Journal of Environmental Monitoring*, v. 13, n. 11, p. 3288–3293, 2011.
- DIOGO, J. S. G.; SILVA, L. S. O.; PENA, A.; LINO, C. M. Risk assessment of additives through soft drinks and nectars consumption on Portuguese population: A 2010 survey. *Food and Chemical Toxicology*, v. 62, p. 548-553, 2013.
- DIRECTIVE 2000/60/EC Of the European Parliament and of the council of 23 october 2000 establishing a framework for community action in the field of water policy. Off. J. Commun. p. 1-72.
- DO CARMO, D. A.; DO CARMO, A. P. B.; PIRES, J. M. B.; OLIVEIRA, J. L. M. Comportamento ambiental e toxicidade dos herbicidas atrazina e simazina. *Arquivos Brasileiros de Psicologia*, v. 8, n. 1, p. 133–143, 2013.
- DONG, S.; TERASAKA, S.; KIYAMA, R. Bisphenol A induces a rapid activation of Erk1/2 through GPR30 in human breast cancer cells. *Environmental Pollution*, v. 159, n. 1, p. 212–218, 2011.
- ELDRIDGE, M. L. et al. *Saccharomyces cerevisiae* BLYAS, a new bioluminescent bioreporter for detection of androgenic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 19, p. 6012–6018, 2007.
- ESTEBAN, S.; GORGA, M.; PETROVIC, M.; GONZÁLEZ-ALONSO, S.; BARCELÓ, D.; VALCÁRCEL, Y. Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in surface waters of Central Spain. *Science of the Total Environment*, v. 466-467, p. 939-951, 2014.
- FERREIRA, A. P. Cafeína como indicador ambiental prospectivo para avaliar ecossistemas aquáticos urbano. *Caderno de Saúde Pública*, v. 21, n. 6, p. 1884–1892, 2005.

- FONTENELE, E. G. P.; MARTINS, M. R. A.; QUIDUTE, A. R. P.; MONTENEGRO JR, R. M. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, V. 54, n. 1, p. 6–16, 2010.
- FRENICH, A. G.; MARTINEZ, V. J. L.; PABLOS, E. M. C.; GARCIA, G. M. D.; ARREBOLA, F. J. Comparison of gas chromatography with NPD, MS, and tandem MS-MS in multiresidue analysis of pesticides in environmental waters. *Chromatographia*. v. 52, p. 614-620, 2000.
- GAVRILESCU, M. et al. Emerging pollutants in the environment: Present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New Biotechnology*, v. 32, n. 1, p. 147–156, 2015.
- GHELFI, A. Efeitos toxicológicos do diclofenaco em peixes Rhamdia quelen ARIANE GHELFI Efeitos toxicológicos do diclofenaco em peixes Rhamdia quelen. Tese, 2014.
- GHISELLI, G.; JARDIM, WILSON, F. Interferentes endócrinos no ambiente. *Quimica Nova*, v. 30, n. 3, p. 695–706, 2007.
- GIESY, J. P.; HILSCHEROVA, K.; JONES, P. D.; KANNAN, K.; MACHALA, M. Cell bioassays for detection for aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. v. 25, p. 3-16, 2002.
- GLASSMEYER, S. T.; FURLONG, E. T.; KOLPIN, D. W.; BATT, A. L.; BENSON, R.; BOONE, J. S.; CONERLY, O.; DONOHUE, M. J.; KING, D. N.; KOSTICH, M. S.; MASH, H. E.; PFALLER, S. L.; SCHENCK, K. M.; SIMMONS, J. E.; VARUGHESE, E. A.; VESPER, A. J.; VILLEGAS, E. N.; WILSON, V. S. Nationwide reconnaissance of contaminants of emerging concern in source and treated drinking waters of the United States. *Science and the Total Environment*, v. 581-582, p. 909-922, 2017.
- GOGOI, A. et al. Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review. *Groundwater for Sustainable Development*, v. 6, n. September 2017, p. 169–180, 2018.
- GOLDSTONE, A. E.; CHEN, Z.; PERRY, M. J.; KANNAN, K.; LOUIS, G. M. B. Urinary bisphenol A and semen quality, the LIFE study. *Reproductive Toxicology*, v. 51, p. 7–13, 2015.
- GOLFINOPOULOS, S. K.; THOMAIDIS, N. S.; KOTRIKLA, A. M.; VAGI, M. C.; PETSAS,

- A. S.; LEKKAS, D. F. Determination of the priority substances regulated by 2000/60/EC and 2008/105/EC Directives in the surface waters supplying water treatment plants of Athens, Greece. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, v. 52, n. 4, p. 378–384, 2017.
- GOODSON, A.; SUMMERFIELD, W.; COOPER, I. Survey of bisphenol A e bisphenol F in canned foods. *Food Additives and Contaminants*, v. 19, n. 8, p. 796–802, 2002.
- GOULD, J. C.; LEONARD, L. S.; MANESS, S. C.; WAGNER, B. L.; CONNER, K.; ZACHAREWSKI, T.; SAFE, S.; MCDONELL, D. P.; GAIDO, K. W. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor α in a distinct manner from estradiol. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 142, n. 1–2, p. 203–214, 1998.
- GRANDCLÉMENT, C. et al. From the conventional biological wastewater treatment to hybrid processes, the evaluation of organic micropollutant removal: A review. *Water Research*, v. 111, p. 297–317, 2017.
- GRAZIELI, C.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. *Química Nova*, v. 34, n. 4, p. 665–676, 2011.
- HAYES, T. B.; KHOURY, V.; NARAYAN, A.; NAZIR, M.; PARK, A.; BROWN, T.; ADAME, L.; CHAN, E.; BUCHHOLZ, D.; STUEVE, T. GALLIPEAU, S. Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: Consistent effects across vertebrate classes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 127, n. 1–2, p. 64–73, 2011.
- HILLEBRAND, O. et al. Caffeine as an indicator for the quantification of untreated wastewater in karst systems. *Water Research*, v. 46, n. 2, p. 395–402, 2012.
- IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Estimativa da População Brasileira, 2018. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 18 set. 2018.
- INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf>.
- ISLAS-FLORES, H.; GÓMEZ-OLIVÁN, L. M.; GALAR-MATÍNEZ, M.; COLÍN-CRUZ, A.; NERI-CRUZ, N.; GARCÍA-MEDINA, S. Diclofenac-induced oxidative stress in

brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 92, p. 32–38, 2013.

JOBLING, S.; WILLIAMS, R.; JOHNSON, A.; TAYLOR, A.; GROSS-SOROKIN, M.; NOLAN, M.; TYLER, C. R.; AERLE, R. V.; SANTOS, E.; BRIGHTY, G. Predicted exposures to steroid estrogens in U.K. Rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. *Environmental Health Perspectives*, v. 114, n. SUPPL.1, p. 32–39, 2006.

JURADO, A.; VÁLQUEZ-SUNE, E.; CARRERA, J.; LOPEZ DE ALDA, M.; PUJADES, E.; BARCELÓ, D. Emerging organic contaminants in groundwater in Spain: A review of sources, recent occurrence and fate in European context. *Science of the Total Environment*. v. 440, p. 82-94, 2012.

KAPELEWSKA, J.; KOTOWSKA, U.; KARPINSKA, J.; KOWALCZUK, D.; ARCISZEWSKA, A.; SWIRYDO, A. Occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of emerging organic contaminants in leachates, groundwaters and wastewaters. *Microchemical Journal*, v. 137, p. 292–301, 2018.

KOMATSU, E. Desenvolvimento de metodologia para determinação de alguns pesticidas em águas empregando microextração em fase sólida (SPME). Dissertação (Mestrado), IPEN, São Paulo, 2004.

KOIVUSALO, M. et al. Drinking water mutagenicity and gastrointestinal and urinary tract cancers: An ecological Study in Finland. *American Journal of Public Health*, p. 1223–1228, 1994.

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 U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*, v. 36, n. 6, p. 1202–1211, 2002.

KOMATSU, E. Desenvolvimento de metodologia para determinação de alguns pesticidas em águas empregando microextração em fase sólida (SPME). [s.l.] Universidade de São Paulo, 2004.

KÖRNER, W. et al. Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere*, v. 40, n. 9–11, p. 1131–1142, 2000.

KUCKA, M.; POGRMIC-MAJKIC, K.; FA, S.; STOJILKOVIC, S. S.; KOVACEVIC, R.

- Atrazine acts as an endocrine disrupter by inhibiting cAMP-specific phosphodiesterase-4. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 265, n. 1, p. 19–26, 2012.
- KUMAR, L. et al. Full factorial design for optimization, development and validation of HPLC method to determine valsartan in nanoparticles. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 23, n. 5, p. 549–555, 2015.
- LANGSRUD, YVIND; ELLEKJAER, M. R.; NAES, T. Identifying significant effects in fractional factorial experiments. *Journal of Chemometrics*, v. 8, n. 3, p. 205–219, 1994.
- LAPSWORTH, D. J.; BARAN, N.; STUART, M. E.; WARD, R. S. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environmental Pollution*, V. 163, p. 287-303, 2012.
- LARSSON, D. G. J.; ADOLFSSON-ERICI, M.; PARKKONEN, J.; PETTERSSON, M.; BERG, A. H.; OLSSON, P. E.; FORLIN, L. Ethinylloestradiol - an undesired fish contraceptive. *Aquatic Toxicology*, v. 45, p. 91-97, 1999.
- LASSEN, T. H.; FREDERIKSEN, H.; JENSEN, T. K.; PETERSEN, J. H.; JOENSEN, U. N.; MAIN, K. M.; SHAKKEBAEK, N. E.; JUUL, A.; JORGENSEN, N.; ANDERSSON, A. Urinary bisphenol a levels in young men: Association with reproductive hormones and semen quality. *Environmental Health Perspectives*, v. 122, n. 5, p. 478–484, 2014.
- LAWS, S. C. Estrogenic Activity of Octylphenol, Nonylphenol, Bisphenol A and Methoxychlor in Rats. *Toxicological Sciences*, v. 54, n. 1, p. 154–167, 2000.
- LEE, I. S.; LEE, S. H.; OH, J. E. Occurrence and fate of synthetic musk compounds in water environment. *Water Research*, v. 44, n. 1, p. 214–222, 2010.
- LEE, S. H.; S. H.; KANG, S. M.; CHOI, M. H.; JEONGAE, L.; PARK, M. J.; KIM, S. H.; LEE, W.; HONG, J.; CHUNG, B. C. Changes in steroid metabolism among girls with precocious puberty may not be associated with urinary levels of bisphenol A. *Reproductive Toxicology*, v. 44, p. 1–6, 2014.
- LI, C.; JIN, F.; SNYDER, S. A. Recent advancements and future trends in analysis of nonylphenol ethoxylates and their degradation product nonylphenol in food and environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018.
- LI, L.; ZHANG, Y.; ZHENG, L.; LU, S.; YAN, Z.; LING, J. Occurrence, distribution and

ecological risk assessment of the herbicide simazine: A case study. *Chemosphere*, v. 204, p. 442–449, 2018.

LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A. Commission on water and soil. Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, v. 75, n. 5, p. 631–681, 2003.

LÓPEZ-SERNA, R. et al. Multiresidue analytical method for pharmaceuticals and personal care products in sewage and sewage sludge by online direct immersion SPME on-fiber derivatization – GCMS. *Talanta*, v. 186, p. 506–512, 2018.

MA, X.; WAN, Y.; WU, M.; XU, Y.; XU, Q.; HE, Z.; XIA, W. Occurrence of benzophenones, parabens and triclosan in the Yangtze River of China, and the implications for human exposure. *Chemosphere*, v. 213, p. 517–525, 2018.

MACHADO, G. C. Contaminantes químicos emergentes em águas naturais e de abastecimento público: desenvolvimento analítico e estudo de caso envolvendo capitais estaduais do Brasil. Tese (doutorado), UNESPAR, Curitiba, 137 p., 2015.

MAGI, E.; DI CARRO, M.; MIRASOLE, C.; BENEDETTI, B. Combining passive sampling and tandem mass spectrometry for the determination of pharmaceuticals and other emerging pollutants in drinking water. *Microchemical Journal*, v. 136, p. 56–60, 2018.

MARQUES, I.; MAGALHÃES-MOTA, G.; PIRES, F.; SÉRIO, S.; RIBEIRO, P. A.; RAPOSO, M. Detection of traces of triclosan in water. *Applied Surface Science*, v. 421, p. 142–147, 2017.

MARTÍNEZ-URUÑUELA, A.; GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M.; PIZARRO, C. Optimisation of the derivatisation reaction and subsequent headspace solid-phase microextraction method for the direct determination of chlorophenols in red wine. *Journal of Chromatography A*, v. 1048, n. 2, p. 141–151, 2004.

MENEZES, C. T. Método para priorização de ações de vigilância da presença de agrotóxicos em águas superficiais: um estudo em Minas Gerais. Dissertação (Mestrado) UFMG, Belo Horizonte, 2006.

MONTAGNER, C. C.; UMBUZEIRO, G. A.; PASQUINI, C.; JARDIM, W. F. Caffeine as an indicator of estrogenic activity in source water. *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, v. 16, n. 8, p. 1866–1869, 2014.

MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals

- and endocrine disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, n. 8, p. 1452–1462, 2011.
- MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. D. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: Cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. *Quimica Nova*, v. 40, n. 9, p. 1094–1110, 2017.
- MOREIRA, D. S.; AQUINO, S. F.; AFONSO, R. J. C. F.; SANTOS, E. P. P. C.; PÁDUA, V. L. Occurrence of endocrine disrupting compounds in water sources of Belo Horizonte Metropolitan Area, Brazil. *Environmental Technology*, v. 30, n. 10, p. 1041–1049, 2009.
- MUNGER, R.; ISACSON, P.; HU, S.; BURNS, T.; HANSON, J.; LYNCH, C. F.; CHERRYHOMES, K.; DORPE, P. V.; HAUSLER JR, W. J. Intrauterine growth retardation in Iowa communities with herbicide-contaminated drinking water supplies. *Environmental Health Perspectives*, v. 105, n. 3, 1997.
- NIEUWENHUIJSEN, M. J. et al. Chlorination Disinfection By-Products in Drinking Water and Congenital Anomalies: Review and Meta-Analyses. *Environmental Health Perspectives*, v. 117, n. 10, p. 1486–1493, 2009.
- OKADA, H.; TOKUNAGA, T.; LIU, X.; TAKAYANAGI, S.; MATSUSHIMA, A.; SHIMAHIGASHI, Y. Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor- γ . *Environmental Health Perspectives*, v. 116, n. 1, p. 32–38, 2008.
- ORT, C. et al. Sampling for Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) and Illicit Drugs in Wastewater Systems: Are your conclusions valid? A critical review. *Environmental science & technology*, v. 44, n. February 2016, p. 6024–6035, 2010.
- PARVEZ, S.; FROST, K.; SUNDARARAJAN, M. Evaluation of drinking water disinfectant byproducts compliance data as an indirect measure for short-term exposure in humans. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 14, n. 5, 2017.
- PEREIRA, S. V.; POSTIGO, C.; LÓPEZ DE ALDA, M.; DANIEL, L. A.; BARCELÓ, D. Removal of estrogens through water disinfection processes and formation of by-products. *Chemosphere*, v. 82, p. 789-799, 2011.
- PERETZ, J.; VROOMAN, L.; RICKE, W. A.; HUNT, P. A.; EHRLICH, S.; HAUSER, R.; PADMANABHAN, V.; TAYLOR, H. S.; SWAN, S. H.; VANDEVOORT, C. A.;

- FLAWS, J. A. Bisphenol A and reproductive health: update of experimental and human evidence, 2017-2013. *Environmental Health Perspectives*, v. 122, n. 8, p. 775-786, 2014.
- PETROVIC, M.; GONZALEZ, S.; BARCELÓ, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, n. 10, p. 685-696, 2003.
- PETROVIC, M.; ELJARRAT, E.; LOPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELÓ, D. Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 378, n. 3, p. 549–562, 2004.
- POOJARY, M. M.; PASSAMONTI, P. Improved conventional and microwave-assisted silylation protocols for simultaneous gas chromatographic determination of tocopherols and sterols: Method development and multi-response optimization. [s.l.] Elsevier B.V., 2016. v. 1476
- POSTIGO, C.; BARCELÓ, D. Synthetic organic compounds and their transformation products in groundwater: Occurrence, fate and mitigation. *Science of the Total Environment*, v. 503-504, p. 32-47, 2015.
- PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; ESCARRONE, A. L. V. Multi-residue analytical methods for determination of pesticides and PPCPs in water by LC-MS-MS: a review. *Central European Journal of Chemistry*, v. 10, n.3, p. 876-899, 2012.
- RAIMUNDO, C. M. Contaminantes emergentes em água tratada e seus mananciais: sazonalidade, remoção e atividade estrogênica. Tese (doutorado), UNICAMP, São Paulo, 203 p., 2011.
- REEMTSMA, T.; ALDER, L.; BANASIAK, U. Emerging pesticide metabolites in groundwater and surface water as determined by application of a multimethod for 150 pesticides metabolites. *Water Research*, v. 47, p. 5535-5545, 2013.
- RELYEA, R. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia*. v. 159, p. 363-376, 2009.
- REZG, R.; EL-FAZAA, S.; GHARBI, N.; MORNAGUI, B. Bisphenol A and human chronic diseases: Current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environment International*, v. 64, p. 83–90, 2014.
- RIBANI, M. et al. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. v. 27, n. 5, p.

771–780, 2004.

RIBEIRO, F. A. D. L. et al. Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.

RICHARDSON, S. D. et al. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, v. 636, n. 1–3, p. 178–242, 2007.

RIVA, F.; CASTIGLIONE, S.; FATTORE, E.; MANENTI, A.; DAVOLI, E.; ZUCCATO, E. Monitoring emerging contaminants in the drinking water of Milan and assessment of the human risk. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 221, n. 3, p. 451–457, 2018.

RODRIGUES, K. L. T. et al. Chemometric approach to optimize the operational parameters of ESI for the determination of contaminants of emerging concern in aqueous matrices by LC-IT-TOF-HRMS. *Microchemical Journal*, v. 117, p. 242–249, 2014.

SAI, L.; LIU, Y.; QU, B.; YU, G.; GUO, Q.; BO, C.; XIE, L.; JIA, Q.; LI, Y.; LI, X.; NG, J. C.; PENG, C. The Effects of Simazine, a Chlorotriazine Herbicide, on the Expression of Genes in Developing Male *Xenopus laevis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 95, n. 2, p. 157–163, 2015.

SAJID, M.; PŁOTKA-WASYLKA, J. “Green” nature of the process of derivatization in analytical sample preparation. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 102, p. 16–31, 2018.

SAMARAS, V. G. et al. Fate of selected pharmaceuticals and synthetic endocrine disrupting compounds during wastewater treatment and sludge anaerobic digestion. *Journal of Hazardous Materials*, v. 244–245, p. 259–267, 2013.

SASS, J. B.; COLANGELO, A. European Union bans atrazine, while the United States negotiates continue use. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, v. 12, n. 3, p. 260–267, 2006.

SEILER, R. L.; ZAUGG, S. D.; THOMAS, J. M.; HOWCROFT, D. L. Caffeine and pharmaceuticals as indicators of waste water contamination in wells, *Groundwater*, v. 37, n. 3 p. 405–410, 1999.

- SHIMADA, K.; MITAMURA, K.; HIGASHI, T. Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids. *Journal of Chromatography A*, v. 935, p. 141-172, 2001.
- SIEGENER, R.; CHEN, R. F. Caffeine in Boston Harbor seawater. *Marine Pollution Bulletin*, v. 44, n. 5, p. 383–387, 2002.
- SILVA, A. R. M.; NOGUEIRA, J. M. F. New approach on trace analysis of triclosan in personal care products, biological and environmental matrices. *Talanta*, v. 74, n. 5, p. 1498–1504, 2008.
- SILVEIRA, M. A. K.; CALDAS, S. S.; GUILHERME, J. R.; COSTA, F. P.; GUIMARÃES, B. DE S.; CERQUEIRA, M. B. R.; SOARES, B. M.; PRIMEL, E. G. Quantification of pharmaceuticals and personal care product residues in surface and drinking water samples by SPE and LC-ESI-MS/MS. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 24, n. 9, p. 1385-1395, 2013.
- SIRACUSA, J. S.; YIN, L.; MEASEL, E.; LIANG, S.; YU, X. Effects of bisphenol A and its analogs on reproductive health: A mini review. *Reproductive Toxicology*, v. 79, n. April, p. 96–123, 2018.
- SOTO, A. M.; JUSTICIA, H.; WRAY, J. W.; SONNENSCHNEIN, C. p-Nonyl-phenol: An estrogenic xenobiotic released from “modified” polystyrene. *Environmental Health Perspectives*, v. 92, n. Cd, p. 167–173, 1991.
- SOUZA, M. DE O. et al. Análise exploratória das concentrações dos metais Na, Ca, Mg, Sr e Fe em extrato aquoso de petróleo, determinados por ICP OES, após otimização empregando planejamento de experimentos. *Química Nova*, v. 38, n. 4, p. 538–552, 2015.
- TAHERAN, M.; NAGHDI, M.; BRAR, S. K.; VERMA, M.; SURAMPALLI, R. Y. Emerging contaminants: Here today, there tomorrow! *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, v. 10, p. 122–126, 2018.
- TERNES, T. A.; MEISENHEIMER, M.; MCDOWELL, D.; SACHER, F.; BRAUCH, H.; HAIST-GULDE, B.; PREUSS, G.; WILME, U.; ZULEI-SEIBERT, N. Removal of Pharmaceuticals during Drinking Water Treatment. *Environmental Science & Technology*, v. 36, n. 17, p. 3855–3863, 2002.
- TERNES, T. A.; HERRMANN, N.; BONERZ, M.; KNACKER, T.; SIEGRIST, H.; JOSS, A. A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient (K_d) for

pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water Research*, v. 38, n. 19, p. 4075–4084, 2004.

THOMPSON, M.; et al. Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. *Pure and Applied Chemistry*, v. 71, n. 2, p. 337–348, 1999.

THOMSON, B. M.; GROUNDS, P. R. Bisphenol A in canned foods in New Zealand: An exposure assessment. *Food Additives and Contaminants*, v. 22, n. 1, p. 65–72, 2005.

UK, Food and environmental protection act, 1985. HMSO.

VALSECCHI, S.; POLESELLO, S.; MAZZONI, M.; RUSCONI, M.; PETROVIC, M. On-line sample extraction and purification for the LC-MS determination of emerging contaminants in environmental samples. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, v. 8, p. 27–37, 2015.

VELDHOEN, N.; SKIRROW, R. C.; OSACHOFF, H.; WIGMORE, H.; CLAPSON, D. J.; GUNDERSON, M. P.; AGGELEN, G. V.; HELBING, C. C. The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. *Aquatic Toxicology*, v. 80, p. 217-227, 2007.

VELISEK, J.; STARA, A.; MACHOVA, J.; SVOBODOVA, Z. Effects of long-term exposure to simazine in real concentrations on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 76, n. 1, p. 79–86, 2012.

VONBERG, D.; VANDERBORGHT, J.; CREMER, N.; PUTZ, T.; HERBST, M.; VEREECKEN, H. 20 years of long-term atrazine monitoring in a shallow aquifer in western Germany. *Water Research*, v. 50, p. 294-306, 2014.

WANG, C.; SHI, H.; ADAMS, C. D.; GAMAGEDARA, S.; STAYTON, I.; TIMMONS, T.; MA, YINFA. Investigation of pharmaceuticals in Missouri natural and drinking water using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Water Research*, v. 45, n. 4, p. 1818–1828, 2011.

WANG, Y.; HU, W.; CAO, Z.; FU, X.; ZHU, T. Occurrence of endocrine-disrupting compounds in reclaimed water from Tianjin, China. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 383, n. 5, p. 857–863, 2005.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), Antimicrobial Resistance, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/en/>. Acesso em: 28 ago. 2018.

WILKINSON, J.; HOODA, P. S.; BARKER, J.; BARTON, S.; SWINDEN, J. Occurrence,

fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field. *Environmental Pollution*, v. 231, p. 954–970, 2017.

WISE, A.; O'BRIEN, K.; WOODRUFF, T. Are oral contraceptives a significant contributor to the estrogenicity of drinking water? *Environmental Science and Technology*, v. 45, p. 51-60, 2011.

WU, W. Z. et al. Estrogenic Effects from Household Stoves. v. 53, p. 65–69, 2002.

YING, G.-G.; WILLIAMS, B.; KOOKANA, R. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - a review. *Environment International*, V. 28, p. 215-226, 2002.

YU, J.; LI, X.; YANG, J.; WU, Y.; LI, B. Effects of Simazine Exposure on Neuronal Development-Related Factors in MN9D Cells. *Medical Science Monitor*, v. 22, p. 2831–2838, 2016.

ZHANG, Z., L.; HIBBERD, A.; ZHOU, J. L. Optimisation of derivatisation for the analysis of estrogenic compounds in.pdf *Analytica Chimica Acta*, 2006.

APÊNDICE

CURVAS ANALÍTICAS DOS PADRÕES ABORDADOS NO ESTUDO

