



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA HIDRÁULICA E AMBIENTAL**  
**CURSO DE PÓS - GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL**

**SARAH DE ABREU MOREIRA ARAÚJO**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO (SPE –  
HPLC) PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS EMERGENTES EM  
ÁGUAS SUPERFICIAIS.**

**FORTALEZA**  
**2014**

SARAH DE ABREU MOREIRA ARAÚJO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO (SPE –  
HPLC) PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS EMERGENTES EM  
ÁGUAS SUPERFICIAIS.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título: Doutor em Engenharia Civil – Área de Concentração: Saneamento Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento.

Co-orientadora: Prof. Dra. Helena Becker.

FORTALEZA  
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Pós-Graduação em Engenharia - BPGE

---

A691d Araújo, Sarah de Abreu Moreira.

Desenvolvimento e validação de um método analítico (SPE-HPLC) para determinação de compostos emergentes em águas superficiais / Sarah de Abreu Moreira Araújo. – 2014.

167 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Fortaleza, 2014.

Área de Concentração: Saneamento Ambiental.

Orientação: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento.

Coorientação: Profa. Dra. Helena Becker.

1. Saneamento. 2. Extração por solvente. 3. Cromatografia líquida de alta pressão. 4. Abastecimento de água. I. Título.

SARAH DE ABREU MOREIRA ARAÚJO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO (SPE –  
HPLC) PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS EMERGENTES EM  
ÁGUAS SUPERFICIAIS.**

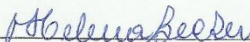
Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da  
Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos necessários para a  
obtenção do título: Doutor em Engenharia Civil – Área de Concentração:  
Saneamento Ambiental.

Tese defendida e aprovada em 31/ 01/2014.

BANCA EXAMINADORA



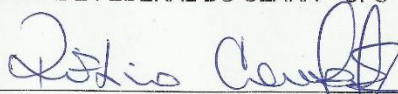
Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC




Profa. Dra. Heilena Becker  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – UFC



Prof. Dr. Ronaldo Stefanutti  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – UFC



Prof. Dr. Rivelino Martins Cavalcante  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – UFC



Profa. Dra. Glória Maria Marinho Silva  
INSTITUTO FEDERAL DO CEARÁ – IFCE

## DEDICATÓRIA

Ao bom Deus, a minha família  
querida e meu companheiro André Luiz.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida e por todas as bênçãos que Ele tem me proporcionado;

Agradeço muito ao meu esposo André Luiz e minhas irmãs, Rebeca e Sabrina pela paciência, tolerância e força nos momentos difíceis;

Aos meus pais, pelo apoio e conselhos nos momentos de dúvidas;

Ao meu professor e orientador Ronaldo, por todo conhecimento, paciência, disponibilidade e confiança;

A minha professora e orientadora Helena pelo incentivo, conhecimento e apoio no Laboratório de Química Ambiental e nas análises físico-químicas realizadas;

Aos meus amigos de longas datas de LAT; Wagner, Jefferson, André Henrique, Aparecida, Carla, Gisele e Cláudio pelos momentos de troca de conhecimentos e alegrias;

Ao amigo André Gadelha, pelo apoio, paciência e disponibilidade no manuseio com o HPLC;

Aos colegas Paula Luciana e Thiago Correia por toda ajuda dada na parte inicial do trabalho;

Ao colega Ari Clecius por todo conhecimento e ajuda com as análises do planejamento fatorial;

Ao colega Pablo Gordiano nos esclarecimentos dos estudos estatísticos;

Ao professor Rivelino por todo conhecimento transmitido nos estudos de SPE e pela disponibilidade de padrões;

A colega Natan, do LANAGUA, o Anderson, do LAQA, por toda logística proporcionada;

A todos os colegas do LAT; Allen, Cícero, Clêrton, Diego, Itana, Jhonyson, Juliene, Nonato, Renata, Rouse, Vicente, Vitor, Poliana (Labomar), Max e Crisiana pelos momentos de descontração, desabafos e ajuda;

A colega Germana, do LABOSAN, pela disponibilidade de materiais quando necessário;

Ao colega Deilton, da COGERH, que muito ajudou na coleta das amostras e disponibilidade dos dados;

A COGERH por toda a logística proporcionada na coleta das amostras;

A CAPES e o POSDEHA pela bolsa concedida no início do curso;

Aos amigos professores do IFCE-Sobral pelos momentos de apoio e descontração: Danilo, Marcos Erick, Germário, Glendo, Michael, Socorro, Aline, Cristiane, Danielle, Edirsana, Josenir, Kleber e Eliano;

A todos, que de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

***“Deus nos concede, a cada dia, uma  
página de vida no livro do tempo.  
Aquilo que colocamos nela corre por  
nossa conta”.***

***Francisco Cândido Xavier (Chico Xavier)***

## RESUMO

Poluentes orgânicos emergentes (POEs) ou simplesmente contaminantes emergentes referem-se a qualquer composto químico presente numa variedade de produtos comerciais como medicamentos, produtos de uso veterinário, embalagens de alimentos, produtos de higiene, agrotóxicos, ou alguns microrganismo. Os POEs podem ser encontrados em matrizes ambientais e biológicas, não são usualmente monitorados ou ainda não possuem legislação regulatória correspondente, e apresentam risco potencial à saúde humana e ao meio ambiente. Neste trabalho, foi desenvolvido e validado um método para a determinação de cafeína, ciprofloxacina,  $17\beta$ -estradiol,  $17\alpha$ -etinilestradiol e dietilestilbestrol, considerados interferentes endócrinos. O método desenvolvido utilizou extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos. Foram estabelecidas condições cromatográficas com eluição por gradiente utilizando acetonitrila e água ultrapura pH 2,0. O planejamento fatorial realizado por SPE indicou que melhores respostas são alcançadas quando utiliza-se o cartucho C18, 500 mL de volume de amostra, pH 3,0 e volume de eluição igual a 2,0 mL de metanol 100%. As figuras de mérito de validação do método indicaram seletividade, sensibilidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez satisfatórias para a maioria dos compostos estudados. Os limites de detecção (LD) variaram entre 0,283 e 1,543  $\mu\text{g/L}$  (ppb) e os limites de quantificação (LQ) variaram entre 0,944 e 5,142  $\mu\text{g/L}$  (ppb). Foi proposta uma nova estratégia de controle de qualidade utilizando padrão *surrogate*, e estabelecido um fator de relação ( $F_R$ ) a fim de corrigir as concentrações dos compostos de interesse em amostras reais. O método validado foi aplicado nas análises de água superficial dos açudes que fazem parte do abastecimento de água da Região Metropolitana de Fortaleza/CE. Os compostos  $17\beta$ -estradiol,  $17\alpha$ -etinilestradiol foram detectados numa concentração máxima de 989 e 980 ng/L, respectivamente.

**Palavras-chave:** Contaminantes emergentes. SPE. HPLC-DAD. Água superficial.



## ABSTRACT

Emerging organic pollutants (EOP), or Emerging Contaminants, is a term that is used to refer any chemical compound insert in variety of comercial products such as medicines, veterinary products, food packaging, pesticides, or any microorganism. The EOP can be found in environmental and ecological arrays not usually monitore or government unregulated, and poses risks to human health na environment. The methodological approach of this thesis included a developed and validated method to determine caffeine, ciprofloxacin,  $17\beta$ -estradiol,  $17\alpha$ -ethinylestradiol and diethylstilbestrol, considered endocrine disruptors. The method uses a Solid-Phase Extraction (SPE) and high performance liquid cromatography coupled to a diode array detector. Chromatografic conditions were established by gradiente elution using acetonitrile and ultrapure water (pH = 2). The experimental design performed by SPE showed that better responses are achieved when it is used the cartridge C18, 500 mL sample volume, pH 3,0 and 2,0 mL 100% methanol elution volume. The method validation parameters indicated satisfactory selectivity, sensitivity, linearity, precision, accuracy and robustness. Detection limits (DL) ranged from 0,283 to 1,543  $\mu\text{g/L}$  (ppb) and quantification limits (QL) ranged from 0,944 e 5,142  $\mu\text{g/L}$  (ppb). A new quality control strategy using surrogate standard was proposed, and a relation factors (RF) was established to correct of concentrations of compounds of interest in real samples. The validated method was applied to the analysis of surface waters reservoirs from water supply system in metropolitan region of Fortaleza. The compounds  $17\beta$ -estradiol,  $17\alpha$ -ethynyl estradiol was detected in a maximum concentration of 989 to 980 ng / L, respectively.

**Keywords:** Emerging pollutants. SPE. HPLC-DAD. Surface water.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Algumas glândulas, órgão e tecidos que enviam e recebem mensagens hormonais no corpo. ....	27
Figura 2 - Disfunções endócrinas – (a) resposta natural, (b) efeito agonista, (c) efeito antagonista. ....	29
Figura 3 – Níveis de hidrofiliabilidade e hidrofobicidade dos compostos farmacêuticos..	34
Figura 4 – Possíveis rotas de interferentes endócrinos no meio ambiente.....	40
Figura 5 – Faixa de aplicação da HPLC e GC para determinação de poluentes orgânicos emergentes baseados em suas propriedades físico-químicas de polaridade e volatilidade. ....	47
Figura 6 – Posição de alguns dos poluentes orgânicos emergentes no diagrama de polaridade e volatilidade. ....	48
Figura 7 - Esquema óptico de um espectrofotômetro com detector de arranjo de diodos.....	50
Figura 8 – Esquema da extração em fase sólida (SPE). ....	53
Figura 9 – Estrutura molecular dos compostos estudados. ....	63
Figura 10– HPLC/DAD (SHIMADZU) utilizado na determinação dos compostos. ....	65
Figura 11 – Desenvolvimento e otimização das condições cromatográficas. ....	66
Figura 12 – Extração em fase sólida (SPE). ....	68
Figura 13 – Sistema de filtração utilizado para amostra. ....	70
Figura 14 – Esquema dos procedimentos realizados na validação da extração por SPE. ....	83
Figura 15 – Mapa com os 15 municípios que formam a Região Metropolitana de Fortaleza.....	87
Figura 16 – Características dos reservatórios da Região Metropolitana.....	90
Figura 17 – Esquema de abastecimento da Região Metropolitana de Fortaleza.....	93
Figura 18 – Vista aérea do ponto de amostragem de água superficial do açude Acarape do Meio.....	96
Figura 19 – Pontos de amostragem de água superficial dos açudes estudados. ....	96
Figura 20 – Vista aérea dos pontos de amostragem de água superficial do açude Gavião. ....	97

Figura 21 - Sonda multiparamétrica utilizada na análise de alguns parâmetros físico-químicos. ....	99
Figura 22 – Metodologia adotada na análise dos IEs nas amostras de água superficial. ....	100
Figura 23 – Cromatogramas dos compostos padrão nos diferentes valores de pH da fase móvel estudados. 1 = CAF, 2 = CIPRO, 3 = E2, 4 = EE2 e 5 = DES. ....	103
Figura 24 – Eficiência de recuperação (%) dos cinco compostos na avaliação dos materiais adsorventes. ....	106
Figura 25 - Gráficos de interação entre os cartuchos de extração e o pH da amostra para cada composto estudado. ....	109
Figura 26 – Gráficos de interação entre os cartuchos de extração e os volumes de amostra (va) para cada composto estudado. ....	110
Figura 27 – Gráficos de interação entre os cartuchos de extração e os volumes de eluente (ve) para cada composto estudado. ....	111
Figura 28 – Estrutura e equilíbrio de ionização das piperazinil (fluoro) quinolona. ....	113
Figura 29 – Eficiência de recuperação da CIPRO nos dois cartuchos estudados em pH 3. ....	113
Figura 30 – Diagramas de Pareto do planejamento fatorial da SPE para os compostos estudados. ....	115
Figura 31 – Gráficos de superfície de resposta do planejamento fatorial da SPE para a cafeína. ....	117
Figura 32 – Gráficos de superfície de resposta do planejamento fatorial da SPE para a ciprofloxacina. ....	117
Figura 33 – Gráficos de superfície de resposta do planejamento fatorial da SPE para a 17 $\beta$ -estradiol. ....	118
Figura 34 – Gráficos de superfície de resposta do planejamento fatorial da SPE para a 17 $\alpha$ -etinilestradiol. ....	118
Figura 35 – Gráficos de superfície de resposta do planejamento fatorial da SPE para o dietilestilbestrol. ....	119
Figura 36 – Diagramas de especificação dos compostos em estudo em diferentes valores de pH. ....	121
Figura 37 – Eficiência de recuperação dos compostos estudados com as condições de otimização de SPE estabelecidas (concentração de 50 $\mu$ g/L). ....	123
Figura 38 – Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD para uma amostra padrão multi 500 $\mu$ g/L dos cinco compostos, e duas amostras do açude Pacoti, uma natural e	

uma dopada com 500 µg/L dos cinco compostos. 1: Cafeína; 2: Ciprofloxacina; 3: 17β-estradiol; 4: 17α-etinilestradiol; 5: Dietilestilbestrol.....	124
Figura 39 – Espectro de absorção no UV dos compostos nos padrões e na amostra do açude Pacoti dopada. ....	126
Figura 40 – Curvas analíticas obtidas para os compostos por padronização externa sem superposição de matriz e por padronização externa com superposição de matriz.....	128
Figura 41 – Curvas analíticas obtidas com solução padrão multi para os cinco compostos. ....	130
Figura 42 – Precisão do método cromatográfico por meio da repetibilidade intradia. Condições: amostra do açude Gavião dopada com solução padrão multi de 50 µg/mL, (n =10). ....	132
Figura 43 – Cromatograma da análise do ponto GAV-14.....	145
Figura 44 – Espectro do compostos identificados nos pontos de amostragem. ....	146

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas dos compostos estudados em função de suas classes. ....	33
Tabela 2 – Excreção diária ( $\mu\text{g}$ ) de $17\beta$ -estradiol (E2) e $17\alpha$ -etinilestradiol (EE2) em seres humanos. ....	38
Tabela 3 – Identificação dos cinco padrões analíticos utilizados no estudo. ....	63
Tabela 4 – Característica dos adsorventes empregados no estudo do tipo de material adsorvente. ....	69
Tabela 5 - Propriedades físicas de caracterização das partículas dos cartuchos C-18 e HLB. ....	70
Tabela 6 – Condições utilizadas na extração do estudo do material adsorvente. ....	71
Tabela 7 - Recuperação de analitos em diferentes concentrações. ....	72
Tabela 8 – Fatores e níveis adotados para o planejamento fatorial ( $2^4$ ). ....	73
Tabela 9 – Fatores e níveis adotados para o planejamento fatorial ( $2^3$ ). ....	73
Tabela 10 – Planejamento fatorial ( $2^4$ ) para SPE. ....	74
Tabela 11 – Planejamento fatorial ( $2^3$ ) com adição do ponto central para SPE. ....	74
Tabela 12 - Concentração do analito vs Precisão. ....	77
Tabela 13 - Parâmetros analíticos selecionados para a análise de robustez e suas respectivas variações. ....	78
Tabela 14 – Identificação e localização dos pontos amostrados para análise dos interferentes endócrinos. ....	95
Tabela 15 - Metodologia utilizada para as análises físico-químicas. ....	98
Tabela 16 - Gradiente de eluição do método empregado para análise dos 5 compostos de interesse. ....	102
Tabela 17 - Tempo de retenção ( $T_R$ ) dos cinco compostos de acordo. ....	104
Tabela 18 - Eficiência de recuperação dos cinco compostos na avaliação dos materiais adsorventes, ( $n = 4$ ). ....	106
Tabela 19 – Matriz para o planejamento fatorial ( $2^4$ ) e áreas dos picos cromatográficos (referente aos compostos estudados) obtidos para o método de extração dos compostos de interesse por SPE e análise por HPLC-DAD. ....	108

Tabela 20 – Resultados das condições de otimização de SPE adotada para compostos estudados.....	122
Tabela 21 – Comprimentos de onda, tempos de retenção e pureza dos picos dos compostos estudados.....	127
Tabela 22 - Curvas de calibração dos analitos, faixa linear e coeficientes de correlação.....	129
Tabela 23 - Limite de detecção e limite de quantificação dos cinco compostos determinados por HPLC-DAD.....	131
Tabela 24 - Valores de efeitos obtidos a partir dos resultados da área do pico dos compostos de interesse de acordo com o teste de Youden e Steine (1975). ....	133
Tabela 25 - Valores de efeitos obtidos a partir dos resultados do tempo de retenção dos compostos de interesse de acordo com o teste de Youden e Steine (1975). ....	133
Tabela 26 – Teste de linearidade das curvas analíticas preparadas em metanol. Utilizando 95% de confiança e $F_{\text{crítico}} = 6,61$ .....	135
Tabela 27 - Resultados do teste estatístico de significância dos parâmetros das equações das curvas de calibração (do tipo $y = ax + b$ ). $a$ = coeficiente angular; $s_a$ = desvio do coeficiente angular; $IC_a$ = intervalo de confiança do coeficiente angular; $b$ = coeficiente linear; $s_b$ = desvio do coeficiente linear; $IC_b$ = intervalo de confiança do coeficiente linear; $t_{\text{calc},a}$ = valor de $t$ calculado para coef. angular ; $t_{\text{calc},b}$ = valor de $t$ calculado para coef. linear. ....	137
Tabela 28 – Figuras de mérito do método de extração ( $n = 3$ ). ....	140
Tabela 29 – Eficiência de recuperação dos compostos em estudos relatados na literatura.....	141
Tabela 30 – Recuperação (%) dos analitos e do padrão <i>surrogate</i> (PS) estudados nas duas matrizes. ....	142
Tabela 31 – $F_R$ dos analitos de interesse com o padrão <i>surrogate</i> . ....	142
Tabela 32 – Dados das concentrações dos compostos de interesse detectados nas amostras.....	144
Tabela 33 – Parâmetros físico-químicos dos pontos amostrados. ....	147

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**ACN** Acetonitrila

**CIPRO** Ciprofloxacina

**DAD** Diode Array Detection

**DES** Dietilestilbestrol

**E2** 17 $\beta$ -estradiol

**EDCs** Endocrine Disrupting Compounds or Chemicals

**EDs** Endocrine Disruptors

**EDSTAC** Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee

**EE2** 17 $\alpha$ -etinilestradiol

**ETA** Estação de Tratamento de Água

**ETE** Estação de Tratamento de Esgotos

**FM** Fase Móvel

**GC** Gas Chromatography

**HPLC** High Pressure Liquid Chromatography

**IE** Interferente Endócrino

**K<sub>ow</sub>** Coeficiente de Partição octanol/água

**LAT** Laboratório de Análise de Traços

**MeOH** Metanol

**pKa** Constante de Dissociação Ácida

**POE** Poluentes Orgânicos Emergentes

**POPs** Poluentes Orgânicos Persistentes

**RMF** Região Metropolitana de Fortaleza

**SPE** Solid Phase Extraction

**STPs** Substâncias Tóxicas Persistentes

**USEPA** United States Environmental Protection Agency

**VTG** Vitelogenina

**φ** Solubilidade em Água



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>22</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 INTERFERENTES ENDÓCRINOS.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 O SISTEMA ENDÓCRINO E MODOS DE AÇÃO DOS INTERFERENTES ENDÓCRINOS..</b>	<b>26</b>
<b>3.3 SUBSTÂNCIAS CLASSIFICADAS COMO INTERFERENTES ENDÓCRINOS .....</b>	<b>30</b>
<b>3.4 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS CARACTERÍSTICAS E DOS COMPOSTOS DE INTERESSE.....</b>	<b>31</b>
3.4.1 <i>Cafeína .....</i>	34
3.4.2 <i>Ciprofloxacina .....</i>	36
3.4.3 <i>Hormônios.....</i>	37
<b>3.5 FONTES DOS INTERFERENTES ENDÓCRINOS NO MEIO AMBIENTE.....</b>	<b>38</b>
<b>3.6 REMOÇÃO DOS INTERFERENTES ENDÓCRINOS EM ÁGUAS.....</b>	<b>41</b>
<b>3.7 EFEITOS CAUSADOS PELA EXPOSIÇÃO AOS INTERFERENTES ENDÓCRINOS.....</b>	<b>43</b>
<b>3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS E ESTROGÊNIOS EM MATRIZES AMBIENTAIS .....</b>	<b>46</b>
3.8.1 <i>Funcionamento do detector de arranjo de diodos.....</i>	49
3.8.2 <i>Método de extração e concentração dos analitos.....</i>	51
<b>3.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....</b>	<b>54</b>
3.9.1 <i>Seletividade .....</i>	54
3.9.2 <i>Linearidade e faixa de aplicação .....</i>	54
3.9.3 <i>Sensibilidade.....</i>	56
3.9.4 <i>Limite de detecção (LD) .....</i>	56
3.9.5 <i>Limite de quantificação (LQ).....</i>	57
3.9.6 <i>Precisão.....</i>	57
3.9.7 <i>Exatidão.....</i>	58
3.9.8 <i>Robustez.....</i>	59
<b>3.10 QUALIDADE DAS ÁGUAS.....</b>	<b>60</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>62</b>
<b>4.1 PRIMEIRA ETAPA – DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO ...</b>	<b>62</b>
4.1.1 <i>Padrões e solventes utilizados .....</i>	62
4.1.2 <i>Equipamento utilizado.....</i>	64
4.1.3 <i>Otimização das condições cromatográficas .....</i>	65
4.1.4 <i>Otimização do método de extração em fase sólida (SPE).....</i>	67
4.1.4.1 <i>Tipo de material adsorvente .....</i>	69
4.1.4.2 <i>Planejamento Fatorial para SPE .....</i>	72
<b>4.2 SEGUNDA ETAPA – VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....</b>	<b>75</b>
4.2.1 <i>Validação do método cromatográfico .....</i>	75
4.2.2 <i>Validação da curva de calibração do método analítico.....</i>	79
4.2.2.1 <i>Teste de validação da análise de regressão linear (significância da regressão).....</i>	80

4.2.2.2	Teste de significância dos parâmetros de calibração .....	81
4.2.3	Validação do método de extração por SPE .....	82
4.2.4	Controle de qualidade aplicado no estudo dos IEs nas amostras dos açudes estudados.....	83
<b>4.3</b>	<b>TERCEIRA ETAPA – ANÁLISE DAS AMOSTRAS DOS AÇUDES QUE ABASTECEM A RMF</b>	<b>86</b>
4.3.1	Descrição da área de estudo - A Região Metropolitana de Fortaleza .....	86
4.3.2	Bacia Metropolitana de Fortaleza .....	87
4.3.3	Sistema de abastecimento da Região Metropolitana de Fortaleza .....	91
4.3.4	Aplicação do método analítico nas amostras coletadas dos açudes .....	93
4.3.4.1	Amostragem.....	94
4.3.4.2	Análise dos compostos endócrinos nas amostras estudadas.....	99
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>101</b>
<b>5.1</b>	<b>DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGÁFICAS .....</b>	<b>101</b>
<b>5.2</b>	<b>OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE) .....</b>	<b>105</b>
5.2.1	Planejamento fatorial para SPE .....	107
<b>5.3</b>	<b>VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....</b>	<b>123</b>
5.3.1	Figuras de mérito do método cromatográfico .....	123
5.3.1.1	Seletividade .....	123
5.3.1.2	Linearidade e sensibilidade .....	128
5.3.1.3	Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	130
5.3.1.4	Precisão.....	131
5.3.1.5	Robustez.....	132
5.3.2	Validação das curvas de calibração .....	134
5.3.2.1	Teste de validação da análise de regressão linear (significância da regressão).....	134
5.3.2.2	Teste de significância dos parâmetros de calibração .....	135
5.3.3	Figuras de mérito do método de extração .....	138
5.3.3.1	Precisão e exatidão.....	138
5.3.4	Controle de qualidade aplicado no estudo dos IEs nas amostras dos açudes estudados.....	142
<b>5.4</b>	<b>ANÁLISE DAS AMOSTRAS DOS AÇUDES QUE ABASTECEM A RMF .....</b>	<b>143</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>149</b>
<b>7</b>	<b>RECOMENDAÇÕES .....</b>	<b>151</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>152</b>
<b>ANEXO A</b>	<b>.....</b>	<b>167</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, frente à percepção do homem sobre a necessidade de se preservar o ambiente e da busca incessante pelo desenvolvimento sustentável, a proteção das fontes de água natural é de longe um dos fatores mais preocupantes para a conservação da vida.

O uso de águas superficiais para tratamento e fornecimento para consumo humano, e também como receptores de esgotos, tratados ou não, têm sido os principais motivos de preocupação acerca da contaminação das fontes de água (RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2004).

Muitos produtos químicos são amplamente utilizados na sociedade moderna, sendo produzidos mundialmente em larga escala para as mais variadas aplicações. No entanto, uma das desvantagens da produção e utilização destes está nos resíduos que são gerados, sejam eles derivados diretamente das atividades industriais ou produzidos após seu consumo pela sociedade, que podem impactar de forma negativa o meio ambiente (SILVA e COLLINS, 2011).

Poluentes orgânicos emergentes (POE) ou simplesmente contaminantes emergentes referem-se a qualquer composto químico presente numa variedade de produtos comerciais como medicamentos, produtos de uso veterinário, embalagens de alimentos, produtos de higiene, agrotóxicos, etc., ou ainda qualquer micro-organismo, que podem ser encontrados em matrizes ambientais e biológicas, que não são usualmente monitorados ou que ainda não possuem legislação regulatória correspondente, mas que apresentam risco potencial à saúde humana e ao meio ambiente (KUSTER *et al.*, 2008).

Dessa forma os poluentes orgânicos emergentes (POE) têm sido determinados nas mais variadas matrizes ambientais como águas, efluentes industriais, solos, sedimentos, emissões gasosas, amostras biológicas (urina, sangue, leite, saliva, tecidos, etc), alimentos e até ovos de pássaros (KOESTER, 2005), sendo que as matrizes aquosas são as mais analisadas (RICHARDSON e TERNES, 2005; RICHARDSON, 2009).

Alguns compostos classificados como contaminantes emergentes, também são conhecidos como interferentes endócrinos, e estão incluídos alguns

fármacos de diferentes classes como: analgésicos, antiinflamatórios, drogas psiquiátricas, antilipêmicos, antibióticos (de uso humano e veterinário), contrastes de raios-X, hormônios e esteróides, além de componentes presentes em protetores solares, produtos de higiene pessoal como fragrâncias contendo grupos nitro e ftalatos, inseticidas repelentes e anti-sépticos, bem como os surfactantes amplamente utilizados no consumo doméstico (GHISELLE, 2006).

Os compostos chamados interferentes endócrinos (IEs), são substâncias com propriedades que podem provocar alterações no sistema endócrino de animais e humanos. Eles constituem uma classe de substâncias não definidas pela sua natureza química, mas pelo seu efeito biológico. São compostos orgânicos hormonalmente ativos que podem causar distúrbios no sistema endócrino mesmo em baixas concentrações (RAIMUNDO, 2007).

Por apresentarem estruturas químicas distintas, o comportamento destes compostos no meio ambiente também é divergente. Muitos dos produtos químicos industriais são considerados poluentes orgânicos persistentes (POPs), e por permanecerem no ambiente por grande período de tempo podem ser transportados por longas distâncias, o que faz com que sejam encontrados em todas as regiões do planeta, além de serem bioacumuláveis nos níveis tróficos em função da característica lipofílica. Outros compostos sofrem degradação ambiental facilmente ou são metabolizados pelo nosso organismo de forma rápida, como os estrógenos naturais ou fármacos, porém, a introdução destes interferentes no ambiente é contínua (SOUZA, 2011).

O aumento de sensibilidade na detecção de poluentes químicos e seus efeitos biológicos têm chamado a atenção da comunidade científica. O grande progresso na instrumentação analítica nos últimos anos e o desenvolvimento de técnicas de extração mais robustas possibilitaram a detecção e identificação de novos compostos em faixas de concentração mais baixas, contribuindo, assim, para o melhor entendimento do problema de contaminação do meio ambiente (KUSTER *et al.*, 2008; SODRÉ *et al.*, 2010).

Os analitos que mais têm chamado a atenção da comunidade científica e, por isso, são os mais estudados, são os princípios ativos de fármacos, substâncias classificadas como interferentes endócrinos e substâncias contidas em produtos de higiene pessoal, devido ao fato de que até

as mais modernas estações de tratamento de água e efluentes não apresentam processos de tratamento capazes de degradá-los ou eliminá-los completamente, principalmente os POE que apresentam alta solubilidade em água ou são pouco degradáveis, como fármacos polares (BILA e DEZOTTI, 2003; GHISELLI e JARDIM, 2007; PETROVIC *et al.*, 2005).

Portanto, diante dessa contextualização e tendo em vista a crescente preocupação ambiental dedicada aos interferentes endócrinos, este trabalho tem por objetivo desenvolver e validar um método cromatográfico (HPLC-DAD) para determinação de cafeína, ciprofloxacina,  $17\beta$ -estradiol,  $17\alpha$ -etinilestradiol e dietilestilbestrol em águas superficiais utilizando as técnicas de extração em fase sólida (SPE).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar um método cromatográfico para determinação da cafeína e compostos endócrinos em águas superficiais utilizando as técnicas de extração em fase sólida (SPE).

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Estabelecer condições cromatográficas para a determinação simultânea dos compostos cafeína, ciprofloxacina, 17 $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -etinilestradiol e dietilestilbestrol por HPLC-DAD;
- b) Desenvolver um método de extração para cafeína, ciprofloxacina, 17 $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -etinilestradiol e dietilestilbestrol avaliando o desempenho dos cartuchos comerciais C18 e HLB;
- c) Otimizar, através de planejamento fatorial, o método de extração por SPE;
- d) Estudar os principais parâmetros (pH, volume de eluente e volume de amostra) que influenciam na eficiência da extração da cafeína e dos compostos endócrinos por SPE;
- e) Validar o método de extração por SPE e o método cromatográfico através das figuras de mérito de validação;
- f) Realizar o ajuste estatístico das curvas de calibração;
- g) Propor um controle de qualidade analítica utilizando como estratégia um padrão *surrogate* e um fator de relação ( $F_R$ );

h) Aplicar a método validado em análise de amostras dos açudes que participam do sistema de abastecimento da Região Metropolitana de Fortaleza/CE.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Interferentes endócrinos

Alguns pesquisadores definem um interferente endócrino com base nos seus efeitos, ou seja, trata-se de uma substância química que, mesmo presente em concentração extremamente baixa, é capaz de interferir no funcionamento natural do sistema endócrino causando câncer, prejudicando os sistemas reprodutivos (por ex., reduzindo a produção de espermatozoides) e causando outros efeitos adversos. Por isso, tais substâncias são mundialmente denominadas “endocrine disruptors” (EDs) ou ainda “endocrine disrupting compounds or chemicals” (EDCs) (GHISELLI e JARDIM, 2007; LINTELMANN *et al.*, 2003).

A tradução para a língua portuguesa tem gerado algumas denominações diferentes, uma vez que há poucos grupos de pesquisadores brasileiros trabalhando com esta temática. Podem ser encontradas as seguintes denominações: “perturbadores endócrinos” (BILA e DEZOTTI, 2003), “disruptivos ou disruptores endócrinos” (GEROLIN, 2008), “desreguladores endócrinos” (PESSOA, 2012), “interferentes endócrinos” (GHISELLI, 2006), “estrogênios ambientais” (BAIRD, 2002), dentre outras. Embora a tradução exata para a palavra “disrupt” seja desfazer, perturbar, interromper, decidiu-se adotar, neste trabalho, o termo “interferentes endócrinos” (IE) para se referir às tais substâncias, já que as mesmas interferem ou alteram, de alguma forma, o funcionamento natural do sistema endócrino de espécies animais.

Em maio de 1997, a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (“U.S. Environmental Protection Agency – USEPA”), através do seu comitê consultivo responsável pela avaliação e diagnóstico de interferentes endócrinos (“Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee – EDSTAC”), propôs uma definição mais detalhada que considerava também a ampla diversidade de mecanismos envolvidos nas disfunções do sistema endócrino. O EDSTAC descreve um interferente endócrino como sendo uma substância ou mistura química exógena que altera uma ou mais funções do



sistema endócrino, bem como a sua estrutura, causando efeitos adversos tanto sobre um organismo e sua descendência, como em populações ou subpopulações de organismos, tendo como base estudos científicos, dados, evidências de peso e princípios de precaução (GHISELLI e JARDIM, 2007; LINTELMANN *et al.*, 2003; USEPA, 2013a).

Os interferentes endócrinos podem exibir tanto um comportamento estrogênico como androgênico. Estrogênios são esteroides hormonais que regulam e sustentam o desenvolvimento sexual feminino e suas funções reprodutivas. Já os androgênios são esteroides hormonais responsáveis pelo desenvolvimento das características sexuais secundárias masculinas (SHIMADA *et al.*, 2001).

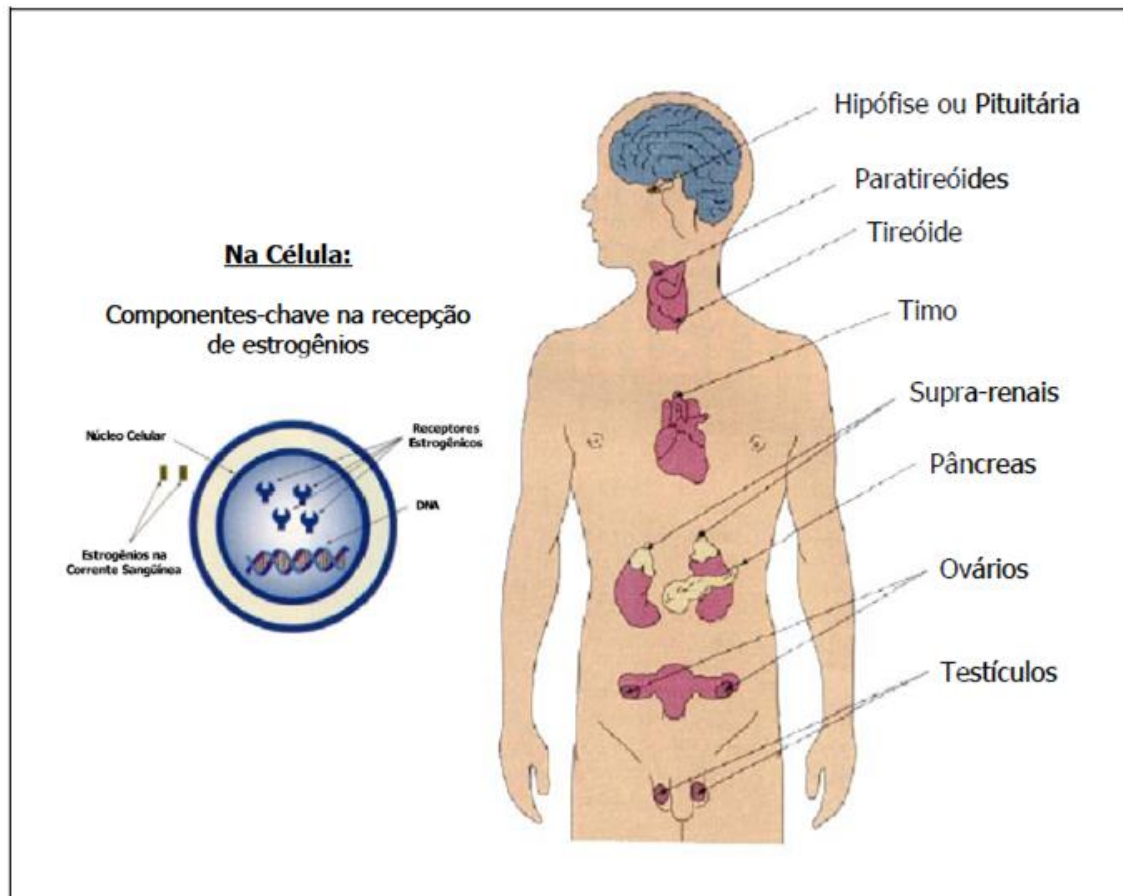
A origem da hipótese da ação dos interferentes endócrinos deve-se a acontecimentos importantes, tais como, o aparecimento de câncer no sistema reprodutivo de filhas de mulheres que usaram DES (dietilestilbestrol) na gravidez, entre os anos de 1940 a 1970 (BIRKETT e LESTER, 2003); anomalias no sistema reprodutivo observadas em jacarés que habitavam um lago na Flórida contaminado com o pesticida DDT e seu metabólito DDE3 (GUILLETTE *et al.*, 1996) e um estudo na Dinamarca que relata o declínio na concentração e mobilidade dos espermatozoides nos homens durante aproximadamente 50 anos (CARLSEN *et al.*, 1992).

De acordo com Bila e Dezotti (2007), as maiores preocupações em relação à exposição de humanos e outros animais aos interferentes endócrinos são: se essas substâncias podem produzir efeitos tóxicos em baixas concentrações; quais substâncias estão associadas aos efeitos tóxicos a baixas concentrações; se essas substâncias estão presentes em concentrações ambientalmente relevantes que possam ser uma ameaça à saúde de humanos e animais; se existe uma concentração limiar abaixo da qual essas substâncias químicas podem ser consideradas como seguras; se os novos tipos de ensaios, usados para prever os efeitos causados em organismos expostos, podem realmente fornecer ferramentas para o entendimento do mecanismo de ação dessas substâncias e, se esses ensaios podem ser facilmente usados em larga escala para monitorar seus efeitos no meio ambiente.

### **3.2 O Sistema endócrino e modos de ação dos interferentes endócrinos**

O sistema endócrino ou hormonal do homem é formado por um conjunto de glândulas posicionadas em todo corpo que inclui a hipófise ou pituitária, a tireoide, as paratireoides, as adrenais (ou supra-renais), as gônadas (testículos e ovários) e o pâncreas. Hormônios são substâncias químicas produzidas e excretadas pelas glândulas e liberados para a corrente sanguínea e os receptores, nos vários órgãos e tecidos, reconhecem e respondem aos mesmos. Através dos hormônios, o sistema endócrino promove uma delicada integração entre diferentes tecidos do corpo humano e é responsável por regular o crescimento e o desenvolvimento, o metabolismo corporal, a reprodução, o sono, a sede, a fome e a imunidade (COLBORN *et al.*, 1997; GEROLIN, 2008). A Figura 1 ilustra as glândulas que mais tradicionalmente estão relacionadas ao sistema endócrino no homem e na mulher.

Figura 1 Algumas glândulas, órgão e tecidos que enviam e recebem mensagens hormonais no corpo.



Fonte: GHISELLI (2006).

Os hormônios servem como mensageiros químicos que circulam no sangue, fazendo a ligação entre vários órgãos do sistema reprodutivo, coordenam o trabalho sincronizado dos órgãos e tecidos para manter o funcionamento do corpo. O hipotálamo monitora constantemente os níveis de hormônios no sangue. Se os níveis de um determinado hormônio estiverem muito altos ou baixos, o hipotálamo manda uma mensagem à pituitária; esta indica para a glândula produtora desse hormônio se deve acelerar a produção, trabalhar mais devagar ou interromper as atividades. Assim, as mensagens vão e vêm continuamente. Sem esse constante *feedback*, o corpo humano seria uma multidão de, mais ou menos, 50 trilhões de células, ao invés de um organismo integrado, operando com um roteiro único. Qualquer interferência neste sistema extremamente balanceado pode levar a um desenvolvimento inapropriado do

mesmo e alterações significativas dos vários processos que ali ocorrem (COLBORN *et al.*, 1997; GEROLIN, 2008).

Embora as moléculas dos hormônios entrem em contato com os tecidos do corpo, apenas células que contenham receptores específicos para um hormônio particular são afetadas por ele. A quantidade de hormônio produzida por uma glândula endócrina geralmente é pequena e diluída no sangue e no líquido intersticial. Dessa forma os hormônios devem ser eficientes em concentrações muito baixas, tipicamente entre  $10^{-8}$  e  $10^{-12}$  M. A alta sensibilidade da sinalização hormonal é oriunda de alta afinidade dos receptores de células alvos pelos hormônios (ECKERT *et al.*, 2008; PESSOA, 2012).

Os estrógenos e andrógenos são importantes em ambos os sexos em vários aspectos do crescimento, do desenvolvimento e da diferenciação morfológica, bem como no desenvolvimento e na regulação do comportamento e dos ciclos sexual e reprodutivo (ECKERT *et al.*, 2008).

Os andrógenos são hormônios masculinos dos quais o mais importante é a testosterona. São essenciais para a espermatogênese normal (produção de espermatozoides), mas também mantêm a integridade normal dos órgãos sexuais tais como: próstata, vesícula seminal e epidídimo. Os androgênios também determinam o desenvolvimento físico e psíquico das características do homem. Os estrógenos são os hormônios femininos que estimulam o desenvolvimento dos órgãos sexuais femininos, das mamas e de várias características sexuais secundárias. Os três principais hormônios sexuais presentes em quantidade significativa no plasma feminino humano, chamados estrogênios, são: Estradiol: secretado pelo ovário, é o principal estrógeno; Estrona: pequena quantidade, mais fraco que o estradiol; Estriol: estrógeno fraco. A potência estrogênica do estradiol é 12 vezes a do estrona e 80 vezes a do estriol (GEROLIN, 2008; GUYTON *et al.*, 1996).

Quanto à ação biológica, os interferentes endócrinos (IE) também podem ser classificados em: agonista (mimetização de um hormônio natural) ou antagonista (bloqueio de hormônio).

A interferência dos IE no funcionamento do sistema endócrino pode ocorrer, no mínimo, por três formas (GHISELLI, 2006; LINTELMANN *et al.*, 2003; PESSOA, 2012):

a) Imitando a ação de um hormônio natural produzido pelo organismo: um composto exógeno liga-se ao receptor como uma substância natural e o ativa, essa ligação depende da afinidade do exógeno com o receptor. A ativação desse hormônio receptor causa os mesmos efeitos do que causaria um hormônio endógeno;

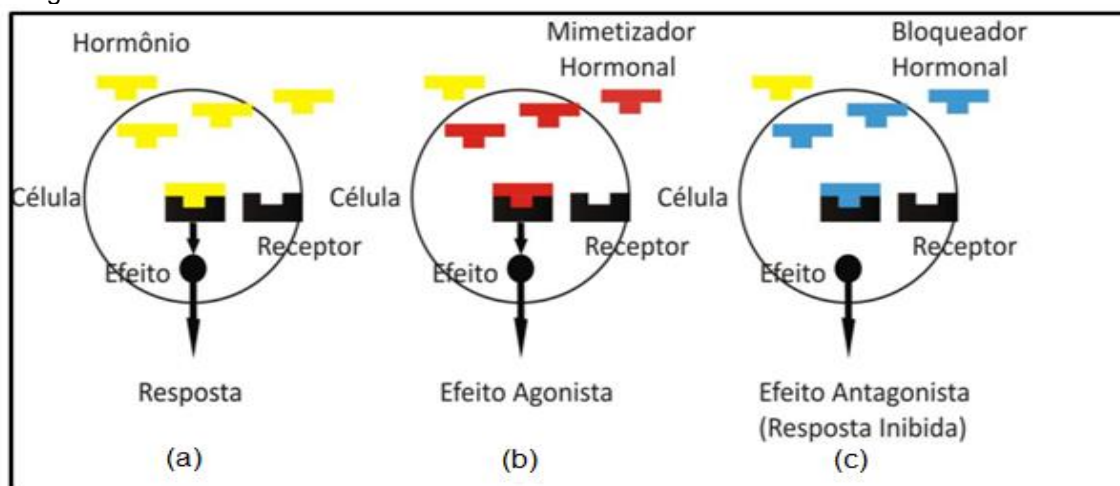
b) Bloqueio dos receptores das células: um composto liga-se ao hormônio receptor bloqueando ou diminuindo as respostas normais porque o receptor não pôde ser ativado normalmente;

c) Afeta a síntese, transporte, metabolismo e excreção dos hormônios naturais no organismo, alterando dessa forma a concentração dos mesmos, dependendo da fase na qual um determinado organismo se encontra (há fases mais suscetíveis, por exemplo, durante o desenvolvimento do feto).

Tanto para agonista e antagonista a concentração do composto que estiver se ligando ao hormônio receptor tem um papel importante, pois as concentrações dos hormônios endógenos são normalmente muito baixas, então se a concentração dos xenobióticos no organismo for alta, os efeitos da desregulação endócrina podem ser causados mesmo se a afinidade dos xenobióticos com o hormônio receptor for baixa (LINTELMANN *et al.*, 2003; PESSOA, 2012).

A Figura 2 apresenta os mecanismos de ação dos interferentes endócrinos.

Figura 2 - Disfunções endócrinas – (a) resposta natural, (b) efeito agonista, (c) efeito antagonista.



Fonte: GHISELLI, (2006); PESSOA, (2012).

### 3.3 Substâncias classificadas como interferentes endócrinos

Os compostos considerados interferentes endócrinos são também classificados como micropoluentes orgânicos, substâncias tóxicas persistentes (STPs) ou poluentes orgânicos persistentes (POPs). A relação de compostos hormonalmente ativos abrange um extenso número de substâncias que estão presentes nos bens de consumo da sociedade contemporânea, seja direta ou indiretamente, como, por exemplo, em alimentos, cosméticos, produtos de higiene pessoal, produtos de limpeza e brinquedos infantis (GHISELLI e JARDIM, 2007; SOUZA, 2011).

Vários grupos de substâncias têm sido considerados interferentes endócrinos, incluindo, novos agrotóxicos, drogas ilícitas, fármacos, produtos de higiene pessoal, protetores solares, estrogênios, alquilfenóis e seus derivados, alguns subprodutos provenientes dos processos de desinfecção da água, retardantes de chama bromados, compostos perfluorados, siloxanos, benzotriazóis, ácidos naftênicos, percloratos, líquidos iônicos, dioxinas, o antimônio, dentre os adoçantes a sucralose, além dos nanomateriais e alguns microrganismos e toxinas de algas (RICHARDSON e TERNES, 2005; RAIMUNDO, 2011).

As substâncias classificadas como IE, incluindo substâncias naturais e sintéticas, usadas ou produzidas para uma infinidade de finalidades podem ser agrupadas em duas classes: 1. Substâncias sintéticas - utilizadas na agricultura e seus subprodutos, como pesticidas, herbicidas, fungicidas e moluscidas; utilizadas nas indústrias e seus subprodutos, como dioxinas, PCB, alquilfenóis e seus subprodutos, ftalatos, bisfenol A, entre outros; compostos farmacêuticos, como o antibiótico ciprofloxacina (CIPRO), estrogênios sintéticos dietilestilbestrol (DES) e 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) e, 2. Substâncias naturais - fitoestrogênios, tais como, genisteína e metaresinol e estrogênios naturais 17 $\beta$ -estradiol (E2), estrona e estriol (BILA e DEZOTTI, 2007).

Alguns agentes terapêuticos e farmacêuticos também estão na lista das substâncias classificadas como interferentes endócrinos. São estrogênios sintéticos usados como contraceptivos orais, na reposição terapêutica na menopausa ou na prevenção do aborto, tais como, DES e o 17 $\alpha$ -etinilestradiol.

A maior aplicação médica do  $17\alpha$ -etinilestradiol tem sido no desenvolvimento de pílulas contraceptivas, que contêm de 30 a 50  $\mu\text{g}$  de  $17\alpha$ -etinilestradiol por pílula (BEAUSSE, 2004). O DES foi muito usado nos anos 70 na prevenção do aborto (BIRKETT e LESTER, 2003). Os antibióticos têm sido discutidos na literatura, devido ao seu potencial de desenvolvimento de bactérias resistentes no meio ambiente (GUARDABASSI *et al.*, 2002; MIRANDA e CASTILLO, 1998) e por serem usados em grandes quantidades, tanto na medicina humana, quanto na medicina veterinária (crescimento do gado, na aquicultura e produção avícola e suína) (INGERSLEV *et al.*, 2001; LOKE *et al.*, 2000).

Estrogênios naturais fazem parte da classe dos interferentes endócrinos. Pesquisas demonstram que os estrogênios estrona e  $17\beta$ -estradiol são os maiores responsáveis pela atividade estrogênica nos efluentes de ETE (SOLÉ *et al.*, 2003). Estrogênios naturais também são encontrados em águas naturais, no solo e lodos biológicos em várias partes do mundo (TERNES *et al.*, 1999; ALDA e BARCELO, 2001). Esses estrogênios são naturalmente e diariamente excretados na urina humana e, assim, descartados no esgoto doméstico.

A maioria dos compostos que causam efeitos adversos no sistema endócrino de animais e de seres humanos são de origem antrópica. Essas substâncias são designadas de xenoestrógenos, substâncias sintetizadas pelo homem (xenobióticos) que não apresentam estrutura esteróide, mas possuem mecanismo de ação similar aos estrogênios endógenos (GOLOUBKOVA e SPRITZER, 2000; SOUZA, 2011).

### **3.4 Propriedades físico-químicas características e dos compostos de interesse**

Neste estudo foram abordados quatro compostos xenoestrógenos pertencem ao grupo dos IEs, a saber: o fármaco antibiótico ciprofloxacina (CIPRO), o estrogênio natural  $17\beta$ -estradiol (E2) e os estrogênios sintéticos  $17\alpha$ -etinilestradiol (EE2) e dietilestilbestrol (DES); e o fármaco estimulante cafeína, que embora não seja considerada uma substância suspeita de causar alteração

no sistema endócrino, e não se conheça efeitos causados a biota oriundas da exposição a este contaminante, será utilizada neste estudo como um indicador ou traçador da qualidade do manancial relacionado ao aporte de esgoto doméstico.

De acordo com Raimundo (2011) o destino e comportamento dos compostos no ambiente e nas ETE são influenciados por suas propriedades físico-químicas, as quais regem a partição na água, solo ou biota.

O coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ) é uma medida da lipofilicidade de um composto e é usado para determinar a sorção efetiva das substâncias pela fase líquida. São verificados dois mecanismos de sorção: a absorção que trata de interações hidrofóbicas caracterizadas pelo valor de  $\log K_{ow}$ ; e a adsorção que está relacionada com interações eletrostática e a tendência da substância de se ionizar ou dissociar no meio aquoso, a qual é caracterizada pela sua constante de dissociação ácida,  $pK_a$ . De acordo com essas propriedades, os contaminantes podem ser divididos em três grandes grupos: os lipofílicos, com alto valor de  $\log K_{ow}$ ; os básicos ou não-iônicos; e os compostos ácidos, que apresentam hidrofiliabilidade e são iônicos (RAIMUNDO, 2011).

O coeficiente de distribuição de carbono orgânico ( $K_{oc}$ ) mede a tendência que um composto tem de sofrer partição entre a fase sólida e a solução do solo no sistema solo-água. Assim, por meio do  $\log K_{oc}$  pode-se determinar a adsorção da substância ao material em suspensão na água, sendo esse valor crescente com o aumento do caráter apolar do composto. Há uma forte correlação direta entre os valores de  $\log K_{ow}$  e  $\log K_{oc}$ ; sendo a afinidade pelo octanol o indicativo do grau de lipofilicidade, sinalizando também a afinidade com a matéria orgânica do solo. A hidrofobicidade de uma molécula orgânica pode ser quantificada pela sua solubilidade em água ou pelo coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ) (SCHAFFER *et al.*, 2012).

A Tabela 1 apresenta as propriedades físico-químicas dos cinco compostos que foram estudados nesse trabalho.



Tabela 1 - Propriedades físico-químicas dos compostos estudados em função de suas classes.

Composto	Fórmula	MM (g/mol)	pKa	Log K <sub>OW</sub>	Log K <sub>OC</sub>	$\varphi_{\text{sat}}$ 25°C (mg/L)	Uso
Cafeína (CAF)	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	194,2	10,1	< 0,01	< 0,01	21700	Estimulante
Ciprofloxacina (CIPRO)	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	331,4	pK <sub>a1</sub> = 6,18 pK <sub>a2</sub> = 8,76	1,24	-	2000	Antibiótico
17β-Estradiol (E2)	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	272,4	10,4 – 10,7	3,94	3,52	13	Estrogênio natural
17α- Ethinilestradiol (EE2)	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	296,4	10,5	4,15	3,68	4,8	Estrogênio sintético
Dietilestilbestrol (DES)	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	268,4	9,73	5,07	3,90	12	Estrogênio sintético

Fonte: Raimundo (2011); Raimundo e Jardim (2011); Va'zquez *et al.* (2001); Sørensen *et al.* (2000), Lei *et al.* (2009), Yu - Chen Lin *et al.* (2010).

Os altos valores de log K<sub>OW</sub> apresentados pelos estrogênios E2, EE2 e DES indicam, por exemplo, que a interação com a matéria orgânica do solo é favorecida, tornando a infiltração ou a percolação limitadas. No entanto, os hormônios poderiam chegar aos corpos d'água por escoamento superficial (assoreamento), quando ocorre aplicação de biossólido ou excretas de animais no solo (LEE *et al.*, 2003).

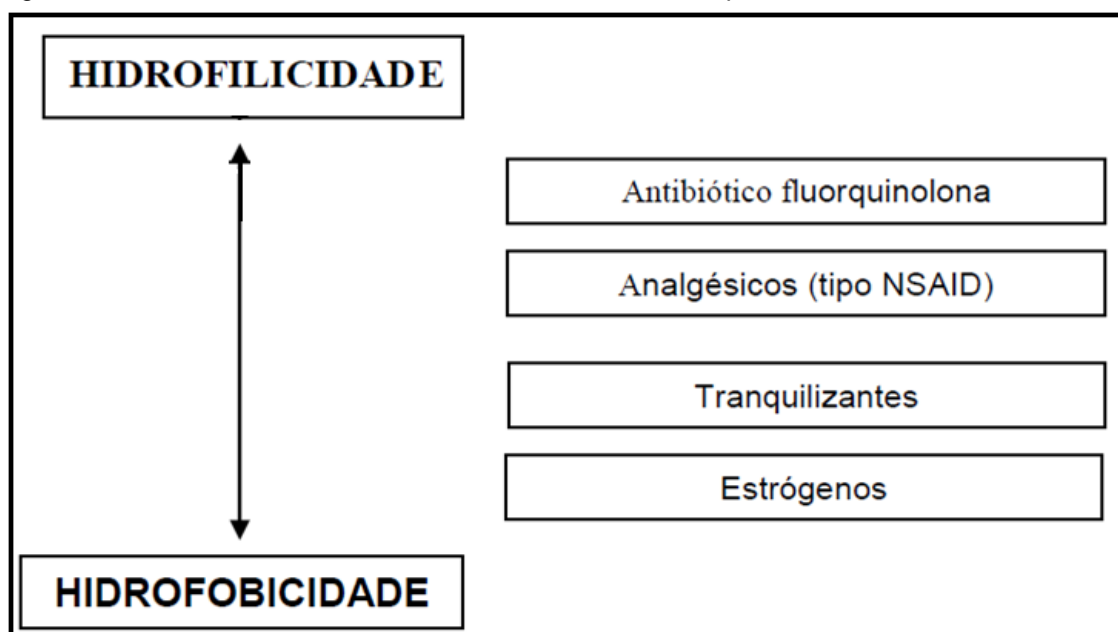
A cafeína é um composto básico com valores de pKa = 10,1 e apresenta alta solubilidade em água, log K<sub>OW</sub> < 0,01. A cafeína dificilmente se bioacumula, pois apresenta baixa afinidade com tecidos gordurosos.

A ciprofloxacina é caracterizada como sendo uma 7-piperazinilquinolonas (FQs), que incluem grupos amina adicionais, conferindo-lhe caráter básico. No entanto, em solução aquosa, as 7-piperazinilquinolonas apresentam três diferentes espécies, que são catiônicas, zwitteriônicas e aniônicas, enquanto as outras quinolonas podem somente ser neutras ou aniônicas (PASCHOAL, 2007).

As FQs com grupo piperazinil tem dois pKa, um perto de pH 6 e outro próximo de pH 8, existindo, majoritariamente, na forma catiônica a pH ácido e na forma aniônica em pH básico. Existem na forma zwitteriônica a pH neutro, tendo a molécula, na globalidade, carga zero, mas tendo zonas com carga positiva e outras com carga negativa. São solúveis em água, mas pouco solúveis em soluções orgânicas (PISTOS *et al.*, 2005).

Duas características importantes para o estudo das moléculas desses compostos são a hidrofiliabilidade e a hidrofobicidade. A Figura 3 apresenta os níveis dessas duas características dos fármacos.

Figura 3 – Níveis de hidrofiliabilidade e hidrofobicidade dos compostos farmacêuticos.



Fonte: Adaptado de Fatta *et al.* (2007).

Condições tais como, temperatura, pH, salinidade, existência de substâncias húmicas ou material particulado, influenciam significativamente na solubilidade e destino desses compostos, facilitando ou dificultando sua degradação no meio natural (RAIMUNDO, 2011).

### 3.4.1 *Cafeína*

A cafeína é um alcalóide, identificado como 1,3,7-trimetilxantina. Pertence ao grupo de compostos químicos chamados *metil-xantinas*, presentes em cerca de 60 espécies de plantas no mundo. Este alcaloide é encontrado em grande quantidade nas sementes de café (*Coffea sp.*) e nas folhas de chá verde (*Camellia sinensis*). Também pode ser achado em outros produtos vegetais, particularmente no cacau (*Theobroma cocoa*), no guaraná (*Paullinia cupana*) e na erva-mate (*Ilex paraguayensis*). Embora uma parcela pequena da população consuma cafeína na forma de fármacos, como por ex. antigripais, grande parte deste alcalóide é ingerida na forma de bebidas. Uma xícara de café pode conter em média cerca de 80 mg de cafeína, enquanto uma lata de coca-cola em torno de 34 – 41 mg. Também pode ser encontrada no tabaco, em alguns condimentos e inibidores de apetite (GARDINALI e ZHAO, 2002; MARIA e MOREIRA, 2007).

A cafeína é um dos alcalóides com atividade biológica mais ingeridos no planeta. Apresenta ação farmacológica variada provocando, dentre outros efeitos, alterações no sistema nervoso central, sistema cardiovascular e homeostase de cálcio (MARIA e MOREIRA, 2007). As xantinas são substâncias capazes de estimular o sistema nervoso, produzindo um estado de alerta de curta duração (GARDINALI e ZHAO, 2002).

A presença deste composto no ambiente, principalmente nas águas naturais, é, sobretudo de origem antrópica. Estudos têm mostrado que certa porcentagem de cafeína, entre 3 e 10 %, não é absorvida pelo organismo e é excretada na urina. Em ETE a cafeína é lentamente metabolizada pela bactéria *Pseudomonas putida*. Os produtos de degradação da cafeína incluem outros derivados das xantinas (GARDINALI e ZHAO, 2002).

Em países onde há tratamento de esgotos adequado, a cafeína tem sido usada como indicador de contaminação por esgoto doméstico em situações onde há vazamento na rede coletora capazes de atingir outros cursos d'água. É considerado um marcador químico sensível e específico que pode ser detectado rapidamente, pois se apresenta em altas concentrações nos esgotos, é estável e bastante solúvel em água (RAIMUNDO, 2011). E em alguns casos foi associada com elevadas concentrações de nitratos no meio aquático (CHEN *et al.*, 2002), em outros, à presença de coliformes totais, comumente usados como traçador de contaminação fecal (PIOCOS e CRUZ, 2000).

No trabalho de Raimundo (2007), os níveis de concentração encontrados para a cafeína nas águas superficiais da Região Metropolitana de Campinas- SP, na faixa de 0,2 a 127,1 µg/L, são compatíveis aos teores determinados em amostras de esgoto na Alemanha, com valores médios de 54,7 µg/L (WEIGEL *et al.*, 2004).

### **3.4.2 Ciprofloxacina**

Uma das classes de medicamentos mais utilizadas é a classe dos antibióticos, compostos que inibem o crescimento de determinados microrganismos e são utilizados para o tratamento de diversas infecções.

A ciprofloxacina é uma fluoroquinolona, derivada do ácido nalidíxico, principal grupo de antimicrobianos sintéticos com espectro de atividade que inclui ambos os patógenos Gram-negativo e Gram-positivo (PASCHOAL, 2007).

É muito utilizada em diversas infecções no homem: em pneumonias causadas por *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Branhamella*, *Legionella* e *Staphylococcus*, em infecções do ouvido médio (otite média), dos seios perinasais (sinusite), em especial quando causadas por agentes patogênicos Gram-negativos (incluindo *Pseudomonas* ou *Staphylococcus*), em infecções oftalmológicas, infecções dos rins e/ou do trato urinário, infecções dos órgãos genitais, incluindo anexite, gonorreia e prostatite, infecções da cavidade abdominal, infecções da pele e tecidos moles e infecções ósseas e articulares (BALL, 2000; PEREIRA, 2009).

Os fármacos são desenvolvidos para serem persistentes, mantendo suas propriedades químicas o bastante para servir a um propósito terapêutico. Porém, segundo Mulroy (2011), 50% a 90% de uma dosagem do fármaco é excretado inalterado e persiste no meio ambiente. O uso desenfreado de antibióticos acarreta dois problemas ambientais: um, é a contaminação dos recursos hídricos e o outro, é que alguns microrganismos criam resistência a esses fármacos. As bactérias podem fazer, e frequentemente o fazem, mudanças no seu material genético, adquirindo resistência aos fármacos. Assim,

uma bactéria presente em um rio que contenha traços de antibióticos pode adquirir resistência a essas substâncias (BOWER e DAESCHEL, 1999).

Nos estudos de Lee *et al.*(2007) no Canadá, a concentração de ciprofloxacina encontrada em amostra de água residuária no efluente da ETE, foi de 146 ng/L. Ao investigar a ocorrência de antibióticos no Rio Sena, na França, Tamtam *et al.* (2008) encontraram concentrações na faixa de 10 - 55 ng/L e Kolpin *et al.* (2002) detectaram concentrações médias de 0,02 µg/L de ciprofloxacina em amostras de águas superficiais nos Estados Unidos.

### **3.4.3 Hormônios**

O 17β-estradiol (conhecido também como estradiol ou pela sigla E2) é um hormônio natural que nas mulheres é responsável pela síntese de estrogênio circulante. Esses estrogênios são naturalmente e diariamente excretados na urina humana e, assim, descartados no esgoto doméstico. O dietilestilbestrol (DES) e o 17α-etinilestradiol (EE2) são estrogênios sintéticos usados como contraceptivos orais, na reposição terapêutica na menopausa ou na prevenção do aborto (BILA e DEZOTTI, 2003).

Vários organismos excretam diferentes quantidades de esteroides sexuais (hormônios), dependendo da idade, do estado de saúde, da dieta ou gravidez. A quantidade de estrogênio excretada por uma mulher grávida pode ser até mil vezes maior que a de uma mulher em atividade normal, dependendo do estágio da gravidez (LINTELMANN *et al.*, 2003).

A Tabela 2 mostra uma estimativa das taxas de excreção diárias do estrogênio natural 17β-estradiol e do estrogênio sintético 17α-etinilestradiol.

Tabela 2 – Excreção diária ( $\mu\text{g}$ ) de  $17\beta$ -estradiol (E2) e  $17\alpha$ -etinilestradiol (EE2) em seres humanos.

Categoria	$17\beta$ -estradiol (E2)	$17\alpha$ -etinilestradiol (EE2)
Homens	1,6	-
Mulheres em menstruação	3,5	-
Mulheres em menopausa	2,3	-
Mulheres em gestação	259	-
Mulheres	-	35

Fonte: Johnso *et al.* (2000).

Em seu estudo sobre a avaliação da ocorrência de perturbadores endócrinos em mananciais de abastecimento da Região Metropolitana de Belo Horizonte, Moreira (2008) encontrou os compostos  $17\beta$ -estradiol e  $17\alpha$ -etinilestradiol numa faixa de concentração de 2 a 54 ng/L. Ao avaliar a qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas, Ghiselli (2006) encontrou uma concentração de  $17\beta$ -estradiol na faixa de 1,8 – 6,0  $\mu\text{g/L}$  e de  $17\alpha$ -etinilestradiol na faixa de 1,0 – 3,5  $\mu\text{g/L}$  nas águas superficiais e potável. A média dos resultados obtidos por Gerolin (2008) para a água tratada de Campinas e Sumaré foram, respectivamente, 0,92 e 1,30 ng/L para E2 e 275 e 472 ng/L de EE2. Ao estudar os desreguladores endócrinos natural e sintético na água, sedimento e biota de uma lagoa costeira em Veneza, Pojana *et al.* (2007) encontraram uma concentrações de DES no sedimento na faixa de 11 – 63  $\mu\text{g/kg}$ .

### 3.5 Fontes dos interferentes endócrinos no meio ambiente

De acordo com Bila e Dezotti (2007), toneladas de substâncias sintéticas e naturais são lançadas anualmente no meio ambiente, das quais, um número considerável é de desreguladores endócrinos. Além de serem associados aos efeitos no sistema endócrino, alguns são também persistentes, lipofílicos, bioacumulativos e tem baixa pressão de vapor, o que facilita a dispersão e difusão no meio ambiente.

Tanto os interferentes endócrinos como outras classes de poluentes ambientais apresentam uma variedade de fontes. Todavia, tais fontes podem ser classificadas em dois grandes grupos: pontuais e não pontuais (ou difusas) (BIRKETT e LESTER, 2003).

As fontes pontuais apresentam um ponto de entrada no meio ambiente bem caracterizado, geralmente através dos cursos d'água. Como exemplo, podem-se citar as descargas de efluentes industriais e esgotos domésticos, derramamentos acidentais, atividades de mineração, enchentes, dentre outras. Trata-se de descargas diretas para os corpos d'água. Por outro lado, as fontes não pontuais são definidas como fontes que não apresentam um ponto de entrada no meio ambiente bem caracterizado. Bons exemplos destas fontes são as deposições atmosféricas e os escoamentos superficiais, sobretudo provenientes das práticas agrícolas. Trata-se de rotas resultando em deposições parciais dos poluentes antes destes atingirem os corpos d'água (BIRKETT e LESTER, 2003; GHISELLI e JARDIM, 2007).

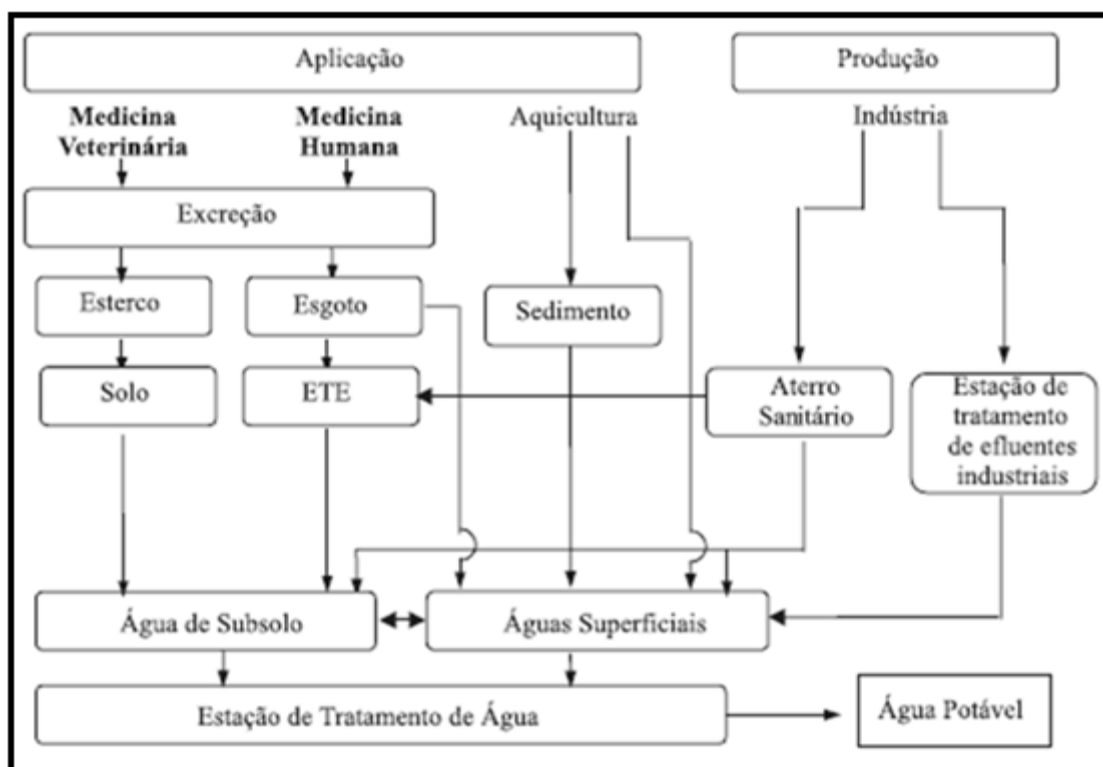
A questão central é que fontes não pontuais são mais difíceis de serem controladas uma vez que o ponto de entrada dos poluentes no ambiente depende do tipo da fonte, da sua localização e, ainda, da combinação de uma série de processos envolvendo a concentração do poluente, sua distribuição no meio ambiente, suas propriedades físico-químicas e as condições ambientais (BIRKETT e LESTER, 2003).

O transporte de um determinado poluente oriundo de uma fonte não pontual de uma área urbana também parece ser diferente daquele proveniente de uma zona rural. Existem algumas razões para isso: boa parte da área urbana é coberta com materiais impermeáveis; como na área urbana há pouca exposição do solo ao meio ambiente, o processo de erosão é menos favorecido e as partículas do solo acabam sendo transportadas preferencialmente para as águas superficiais; na área urbana a poluição pode se dar também pelo acúmulo de lixos, durante o trânsito, nas emissões radioativas, enquanto que na área rural a poluição advém basicamente da erosão do solo; na área urbana a maioria dos poluentes depositados na superfície do solo (impermeável) acaba sendo escoada para os corpos d'água (lixiviação), enquanto que na área rural as

deposições podem ser incorporadas ao solo, ou seja, sorvidas ou infiltradas, dificultando a remoção (BIRKETT e LESTER, 2003).

Pouco se conhece sobre as rotas dos IEs no meio ambiente. A Figura 4 apresenta um esquema que sugere possíveis caminhos para os interferentes endócrinos quando descartados no meio ambiente.

Figura 4 – Possíveis rotas de interferentes endócrinos no meio ambiente.



Fonte: Bila e Dezotti (2003).

Um caminho de fármacos residuais no ambiente aquático pode ser devido ao esterco ser usado como fertilizantes e, dessa forma, ocorre a contaminação das águas de subsolo. Outra contaminação pode ser devido ao uso do lodo digestivo proveniente das ETEs na agricultura. Uma outra fonte de contaminação ambiental que tem sido observada é consequente da disposição de resíduos provenientes de indústrias farmacêuticas em aterros sanitários, contaminando as águas de subsolo nas cercanias do aterro (BILA e DEZOTTI, 2003).



Os antibióticos são usados como promotores de crescimento na produção de gado, na produção avícola e são intensivamente usados como aditivos de alimento de peixe na aquicultura e criação de porcos (INGERSLEV *et al.*, 2001; LOKE *et al.*, 2000; RABOLLE e SPLIID, 2000). Sendo assim, podem contaminar o solo, águas de subsolo e superficiais.

Os interferentes endócrinos também podem ser encontrados nas cinzas dos produtos incinerados, no lodo biológico de estações de tratamento de efluentes e em chorumes de aterros sanitários. Uma quantidade considerável de produtos industrializados potencialmente danosos é disposta diretamente no solo ou em aterros sanitários (BILA e DEZOTTI, 2007).

A água potável é outra significativa fonte de exposição a interferentes endócrinos. As águas superficiais e de subsolo, principais fontes de água potável, podem ser contaminadas pela infiltração de substâncias químicas através do solo, na agricultura ou mesmo em áreas urbanas, ou no descarte de efluentes industrial e doméstico, sendo que muitas dessas substâncias não são removidas pelos processos convencionais de tratamento de água (BILA e DEZOTTI, 2007).

### **3.6 Remoção dos interferentes endócrinos em águas**

Os processos físico-químicos para a potabilização da água envolve, unidades de clarificação (floculadores, decantadores e filtros), de desinfecção (cloradores e aminoadores) de polimento (correção do pH e fluoretação). Assim como nas ETE, os processos convencionais de tratamento nas ETA não são eficientes para a eliminação de inúmeros contaminantes, devido principalmente a natureza polar de muitos deles (WANG *et al.*, 2011). A remoção de interferentes endócrinos nas ETA também depende das características intrínsecas de cada composto, quanto dos métodos de tratamento (SNYDER, 2008).

De acordo com Westerhoff *et al.* (2005), os métodos convencionais de tratamento promovem a remoção de menos de 25% da concentração da

maioria dos interferentes endócrinos e, a presença de uma etapa de cloração, muito comum para desinfecção de águas no Brasil, promove uma redução de 20 a 90% nos níveis de concentração, dependendo das características de cada composto.

Nos estudos de Huber *et al.* (2005), o uso de dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ) como oxidante no tratamento da água para degradação de diferentes classes de contaminantes revelou que, a concentração do oxidante do meio, a qualidade do manancial e as características dos compostos influenciaram na eficiência de remoção. No entanto, o  $\text{ClO}_2$  foi considerado eficiente na remoção de estrógenos, sulfonamidas e antibióticos macrolídeos.

Processos terciários como ozonização, adsorção em carvão ativado, osmose reversa, filtração em membranas, processos oxidativos avançados como UV, UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$  e fotocatalise heterogênea têm sido aplicados em ETA como métodos complementares de remoção de contaminantes em inúmeros países (WESTERHOFF *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2006; YEO e KANG, 2006; VERLIEFDE *et al.*, 2007; SNYDER, 2008; ROSSNER *et al.*, 2009).

A ozonização tem sido uma das técnicas mais empregadas em diversas ETA devido ao seu alto potencial de oxidação que tem se mostrado eficiente na desinfecção, remoção da cor, controle de sabor e odor, decréscimo na formação de sub-produtos de processos de desinfecção, aumento da biodegradabilidade e também para a degradação de contaminantes orgânicos (BROSÉUS *et al.*, 2009).

A ozonização promoveu uma remoção de cerca de 80% de estrógenos e cafeína, quando foi empregado em ETA por aproximadamente 2,0 mg/L (BROSÉUS *et al.*, 2009).

Snyder (2008) comparou a eficiência de remoção de alguns contaminantes emergentes, incluindo os estrógenos e a atrazina, nas ETA usando cloro (3,5 mg/L), UV (40  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) e ozônio (2,5 mg/L) e obteve que a ozonização foi o tratamento mais efetivo, a qual promoveu uma remoção superior a 70% para a maioria dos contaminantes estudados.

Dentre as membranas de filtração, os tratamentos com osmose reversa e nanofiltração são considerados mais eficientes que aqueles empregando ultrafiltração e microfiltração. Cada tipo de tratamento possui suas vantagens e desvantagens que devem ser consideradas pelas ETA no momento de se implantar um tratamento terciário na planta (SNYDER, 2008).

O carvão ativado, ambos na forma em pó ou granulado são efetivos para a adsorção de contaminantes, sendo que o tipo de adsorvente, o tempo de contato, a dose ou regeneração e as características do manancial tais como pH, salinidade e matéria orgânica, são parâmetros importantes que influenciam na eficácia do tratamento (ROSSNER *et al.*, 2009).

Rosenfeldt *et al.* (2007) verificaram a redução de 90% na atividade estrogênica de amostras naturais contendo 17  $\beta$ -estradiol e 17 $\alpha$ -etinilestradiol usando UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **3.7 Efeitos causados pela exposição aos interferentes endócrinos**

Os fármacos são projetados para atingir órgãos ou rotas metabólicas e moleculares específicas tanto nos humanos como em animais, mas também possuem frequentemente efeitos colaterais importantes. Quando introduzidos no ambiente eles podem afetar os animais pelas mesmas rotas e atingir órgãos, tecidos, células ou biomoléculas com funções semelhantes a dos humanos (FENT *et al.*, 2006).

De acordo com Jorgensen e Halling-Sorensen (2000), alguns desses efeitos podem ser observados em concentrações na ordem de ng/L. Pouco é conhecido sobre o destino e o comportamento dessas substâncias no ambiente aquático, assim como não está claro quais organismos são afetados e em que grau.

Atualmente, dois tópicos sobre o efeito desses fármacos no meio ambiente são os mais discutidos. O desenvolvimento de resistência bacteriana

aos antibióticos e avaliações de perturbações no sistema endócrino por substâncias como estrogênios.

Em seu estudo, Kolár *et al.* (2001) avaliaram o desenvolvimento da resistência bacteriana aos antibióticos usados em hospitais, os quais são poderosos focos de desenvolvimento de resistência bacteriana. Mckeon *et al.* (1995) constataram a resistência bacteriana da espécie *Escherichia coli*, isolada de águas de subsolo de uma região rural, frente a 16 antibióticos.

Dados sobre toxicidade aguda (doses altas em curto espaço de tempo) são claros para o dietilestilbestrol (DES) que foi utilizado para a manutenção da gravidez em pacientes com histórico de abortos espontâneos entre as décadas de 1940 e 1960. Duas décadas depois, descobriu-se que a exposição neonatal produzia adenocarcinoma vaginal nas filhas adultas. Na ocasião dessa descoberta, tanto o DES quanto o E2 e o EE2 estimularam alterações semelhantes no aparelho reprodutivo de cobaias (DASTON *et al.*, 1997).

Quanto à exposição crônica (doses baixas em tempo prolongado), há indícios de que homens expostos a compostos estrogênicos podem apresentar redução na fertilidade e desenvolver características secundárias do sexo feminino, como aumento das mamas (ginecomastia). Existem evidências também de que o aumento da incidência de câncer de testículos e de outros males como a infertilidade masculina podem estar relacionados com a ingestão de estrogênios por meio da alimentação ou da água (SHARPE e SKAKKEBAEK, 1993; PETERSON *et al.*, 2000). A exposição prolongada aos estrogênios também tem sido associada com o aumento da incidência de câncer de mama em mulheres (DASTON *et al.*, 1997).

Vários estudos relacionam a poluição ambiental das águas naturais com anomalias no sistema reprodutivo e no desenvolvimento de espécies de animais. A exposição aos interferentes endócrinos pode ser responsável por alterações fisiológicas e histológicas em animais silvestres e de laboratório, incluindo alterações nos níveis de vitelogenina no plasma sanguíneo, feminização de peixes machos, indução ao hermafroditismo, inibição no desenvolvimento das gônadas e declínio na reprodução (BILA e DEZOTTI, 2007).

Vitelogenina (VTG) é uma proteína que desempenha um importante papel no sistema reprodutivo de vertebrados ovíparos fêmeas. É sintetizada no fígado, regulada por estrogênio e transportada através do sangue para os ovários, onde serão incorporados no desenvolvimento dos óvulos (IRWIN *et al.*, 2001; PANTER *et al.*, 1998; ZERULLA *et al.*, 2002). De um modo geral, o gene do VTG também está presente em organismos machos, mas sob condições normais não é expressivo, possivelmente, pela baixa concentração de estrogênio no sangue (SCHMID *et al.*, 2002). O aumento de VTG no plasma de um organismo é considerado uma evidência da exposição a substâncias com atividade estrogênica (JONHSON *et al.*, 2000; ZERULLA *et al.*, 2002).

Em um experimento com tartarugas da espécie *Chrysemys picta*, Irwin *et al.* (2001) mostraram que as tartarugas fêmeas expostas a estrogênios são afetadas com altos níveis de VTG no plasma. Esses altos níveis de VTG podem alterar o sistema reprodutivo desses animais como, por exemplo, por alterações na produção de ovos.

Os peixes são um dos grupos de organismos mais completamente estudados em termos de efeito de substâncias com atividade estrogênica no desenvolvimento de anomalias no sistema reprodutivo. De acordo com Sumpter (1998), as pesquisas de como substâncias estrogênicas afetam o sistema sexual dos peixes começaram na década de 1980.

Nos seus estudos, Kang *et al.* (2002) mostram claramente que a exposição a concentrações do estrogênio  $17\beta$ -estradiol ambientalmente relevantes (na faixa de 30 - 500 ng/L), por três semanas, induz a concentrações elevadas de VTG e à incidência de hermafroditismo em peixes machos da espécie *Oryzias latipes*. E no estudo de Folmar *et al.* (2000), as menores concentrações de substâncias com atividade estrogênica que induziram a síntese de VTG em uma população de peixes machos da espécie *Cyprinodon variegatus* foram de 200 ng/L para o  $17\beta$ -estradiol e de 100 ng/L para o  $17\alpha$ -etinilestradiol.

De acordo com Ramos (2002), existem poucos dados sobre a manifestação de tais efeitos nos organismos presentes nos mananciais brasileiros. Sabe-se que peixes curimatás (*Prochilodus lineatus*) do Rio Mogi Guaçu estão atingindo maturidade sexual em tamanho e idade inferior ao normal.

Esse fato também tem sido atribuído aos estrogênios, uma vez que 40% da população humana dos municípios dessa bacia hidrográfica são mulheres em idade reprodutiva e cerca de 80% dessas fazem uso de anticoncepcional.

Embora as concentrações desses hormônios nos efluentes sejam baixas (da ordem de  $\mu\text{g/L}$  e  $\text{ng/L}$ ), estas são suficientemente elevadas para induzir a síntese de VTG em peixes machos em experimentos de laboratório como descrito nos estudos citados anteriormente.

### **3.8 Métodos analíticos utilizados na determinação de fármacos e estrogênios em matrizes ambientais**

De acordo com Pessoa (2012) existe atualmente uma grande variedade de procedimentos analíticos que vem sendo empregadas na análise de amostras ambientais como água, solo, sedimento e ar. Dentre as técnicas utilizadas para a determinação de compostos em nível de traços, na ordem de  $\mu\text{g/L}$  até  $\text{ng/L}$ , a grande maioria emprega técnicas cromatográficas para a separação de analitos de interesse, sendo utilizados equipamentos que apresentam elevada seletividade e baixo limite de detecção.

As amostras ambientais são consideradas matrizes complexas devido à presença de uma infinidade de compostos que podem interferir na análise. Além disso, não existe uma metodologia padronizada para o desenvolvimento do procedimento analítico, podendo este ser selecionado de acordo com a infraestrutura do laboratório (PESSOA, 2012).

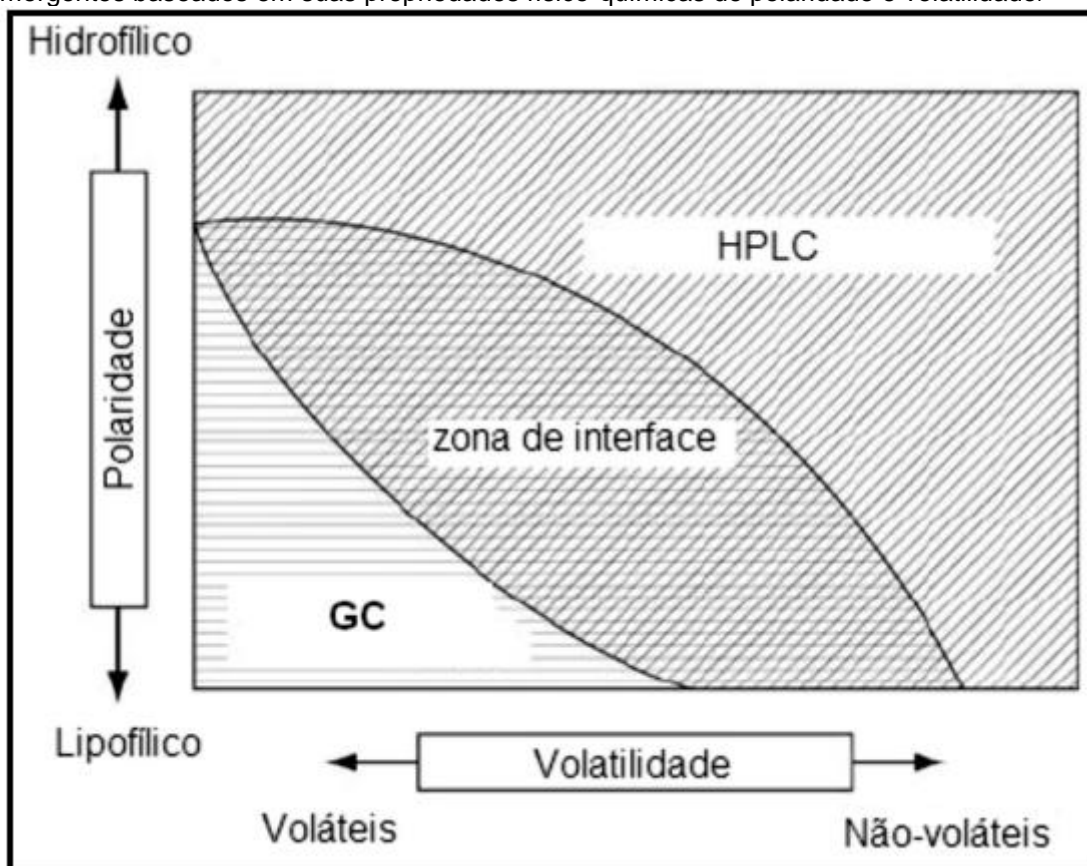
Para a determinação de fármacos e estrogênios, diferentes métodos analíticos são reportados na literatura, os quais são principalmente válidos para matrizes biológicas como sangue, tecido e urina, sendo que algumas modificações nestes métodos podem ser suficientes para amostras ambientais. No entanto, a análise de fármacos residuais em efluentes de ETE, em águas de rios, de solos e água potável requer ainda o desenvolvimento de métodos mais sensíveis para a detecção de concentrações na faixa de  $\mu\text{g/L}$  e  $\text{ng/L}$  (BILA e DEZOTTI, 2003).

Nos últimos anos, foram publicados muitos métodos para a análise desses micropoluentes em amostras ambientais. Ternes (2001) fez uma revisão de todos os métodos analíticos utilizados na determinação de estrogênios, a níveis de ng/L, em diferentes matrizes ambientais aquosas.

As separações em química ambiental geralmente envolvem as duas técnicas cromatográficas mais conhecidas: a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *high performance liquid chromatography*) e a cromatografia gasosa (GC, *gas chromatography*).

Diagramas de polaridade-volatilidade podem esquematizar de forma didática qual a técnica de separação a ser utilizada, dividindo os poluentes orgânicos de acordo com suas propriedades físico-químicas de volatilidade e polaridade. A Figura 5 pode ser interpretada da seguinte forma: poluentes voláteis e semivoláteis, não polares/lipofílicos são frequentemente separados por cromatografia gasosa (SILVA e COLLINS, 2011).

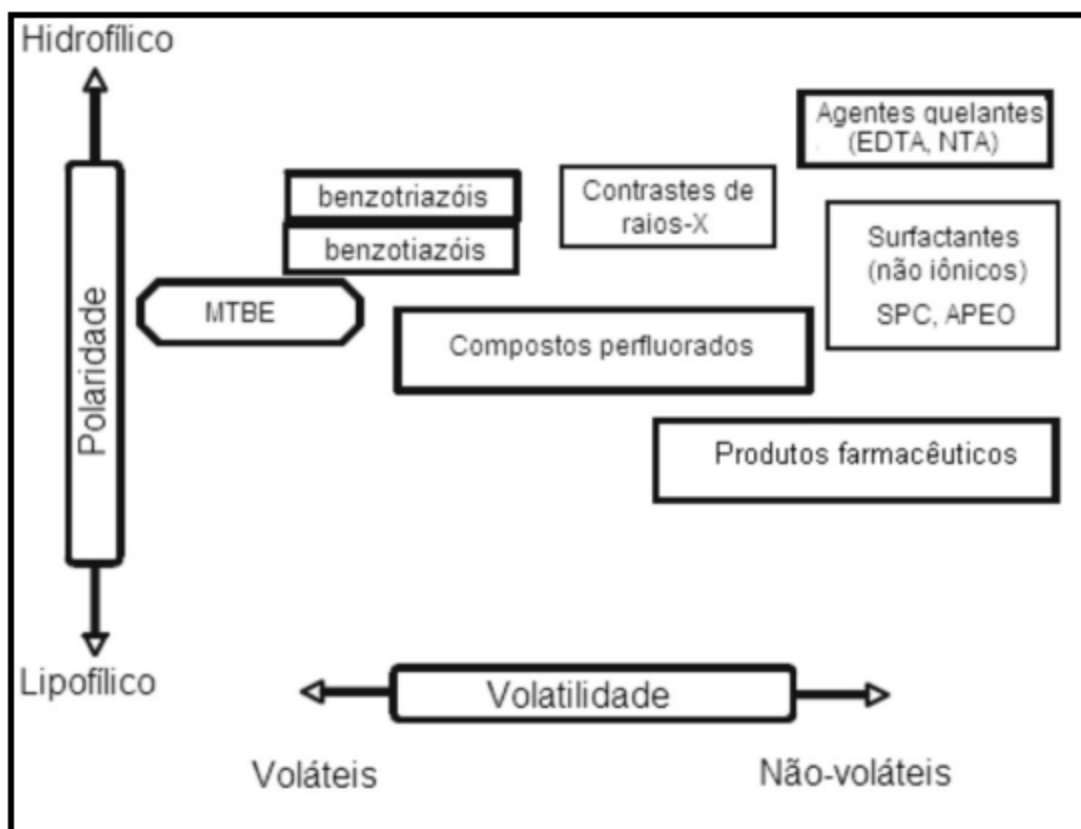
Figura 5 – Faixa de aplicação da HPLC e GC para determinação de poluentes orgânicos emergentes baseados em suas propriedades físico-químicas de polaridade e volatilidade.



Fonte: Silva e Collins (2011).

Os métodos baseados na HPLC são adequados para uma variedade de compostos orgânicos que apresentam polaridade mais alta e volatilidade mais baixa ou ainda elevada instabilidade térmica, características de alguns POEs, o que pode ser visto através da Figura 6 (SILVA e COLLINS, 2011).

Figura 6 – Posição de alguns dos poluentes orgânicos emergentes no diagrama de polaridade e volatilidade.



Fonte: Fonte: Silva e Collins (2011).

Um estudo com amostras de água superficial dos rios Atibaia, Ribeirão Anhumas, Capivari e Jundiaí (Bacia do rio Atibaia), localizados na região metropolitana da cidade de Campinas, no Estado de São Paulo, em 2006, utilizando a técnica de extração em fase sólida dos analitos e a HPLC com detectores por arranjo de diodos (DAD, *diode array detection*) e fluorescência, revelou a presença de paracetamol, cafeína, ácido acetilsalicílico, di-*n*-

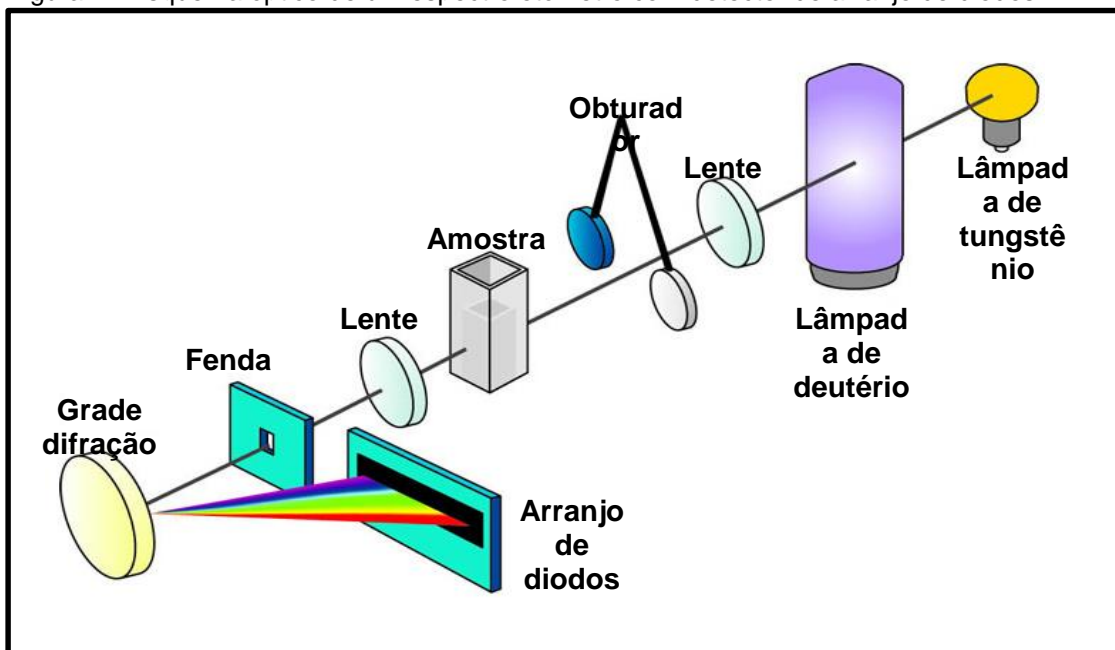


butilftalato, bisfenol A,  $17\beta$ -estradiol e  $17\alpha$ -etinilestradiol nas faixas de concentração entre 0,005 até 41,7  $\mu\text{g/L}$  (SODRÉ *et. al.*, 2007).

### **3.8.1 Funcionamento do detector de arranjo de diodos**

A Figura 7 ilustra um esquema óptico de um espectrofotômetro com detector de arranjo de diodos. Neste esquema há duas fontes de radiação, as lâmpadas de deutério e tungstênio, cujas emissões são focalizadas através de uma lente sobre a amostra. Portanto, todo o espectro de emissão da lâmpada incide sobre a mesma, sendo que a luz incidente será, em parte, absorvida. A luz que atravessou a amostra irá incidir sobre uma lente que focaliza o feixe sobre uma fenda, e desta sobre uma grade de difração. Esta grade irá difratar a luz, separando os seus diferentes comprimentos de onda, sendo que cada um deles irá incidir sobre um diodo do arranjo. Este diodo, ao receber um feixe de luz, produz uma corrente elétrica cuja magnitude depende da intensidade da emissão. Através de um circuito de calibração adequado, esta corrente será transformada em absorbância nos diferentes comprimentos de onda, resultando no que se convencionou a chamar de espectro de absorção (TORRES, 2009 *apud* OWEN, 1996).

Figura 7 - Esquema óptico de um espectrofotômetro com detector de arranjo de diodos.



Fonte: Agilent Technologies (2013).

O procedimento experimental convencional de obtenção de espectros de absorção em um instrumento deste tipo envolve inicialmente o registro de um espectro de um ruído de fundo ou do solvente ou do ar (a serem utilizados como branco). Arquia-se o mesmo e, em sequência, se obtém o espectro da amostra e se efetua a subtração dos dois. O resultado é o espectro da amostra, o qual tem o solvente (ou ar) como branco (TORRES, 2009; OWEN, 1996).

Esse tipo de detector apresenta vantagens como (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006):

- a) espectros tridimensionais, mostrando absorbância, comprimento de onda e tempo de retenção, podem ser obtidos;
- b) o conhecimento do espectro de absorbância de cada composto presente na amostra permite selecionar o comprimento de onda de máxima absorbância de cada um deles. Assim, melhora a detecção e eliminam-se picos interferentes;
- c) é possível obter e armazenar o espectro de absorbância de cada pico durante a corrida. Esse processo consome poucos segundos incluindo o processamento dos dados; portanto, é possível obter vários espectros, mesmo para picos próximos. Isso constitui um

dado adicional que, juntamente com o tempo de retenção, permite análises qualitativas, nas quais a identificação pode ser feita através de comparação com um padrão ou uma biblioteca *on-line*.

### **3.8.2 Método de extração e concentração dos analitos**

A análise de traços de compostos orgânicos em água pode ser considerada como um dos maiores desafios da química analítica. A determinação de hormônios estrógenos no ambiente constitui em tarefa difícil, primeira, devido à complexidade das matrizes ambientais, e segundo, por causa de sua baixa concentração (ordem de ng/L) (ARAÚJO, 2006; ALDA e BARCELÓ, 2001).

Na maioria das análises que envolve amostras “reais”, é necessário o enriquecimento substancial do analito para isolar os compostos alvos da matriz e para concluir os limites de detecção e quantificação requeridos. Dentre as várias etapas envolvidas na análise de amostras complexas, algumas mais comuns são: extração, *clean-up* (eliminação de impurezas), concentração, ajuste de condições (por exemplo, pH), antes da medida do analito de interesse. No caso de análises cromatográficas, além de evitar a interferência dos contaminantes da matriz que possam co-eluir com o analito de interesse, a remoção de interferentes em geral é importante para garantir a longevidade das colunas analíticas e evitar constantes limpeza no sistema de injeção (ALDA *et al.*, 2003; LANÇAS, 2004a; ARAÚJO, 2006).

A extração em fase sólida (SPE, *solid phase extraction*) é atualmente a técnica mais empregada para amostras líquidas, como matrizes de águas superficiais e efluentes.

A SPE na forma de colunas empacotadas contendo sílica ligada como material adsorvente foi introduzida em 1977, e consiste em uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão, onde se emprega uma coluna aberta,

denominada de cartucho de extração, a qual contém a fase sólida, sendo esta correspondente à fase estacionária (LANÇAS, 2004a).

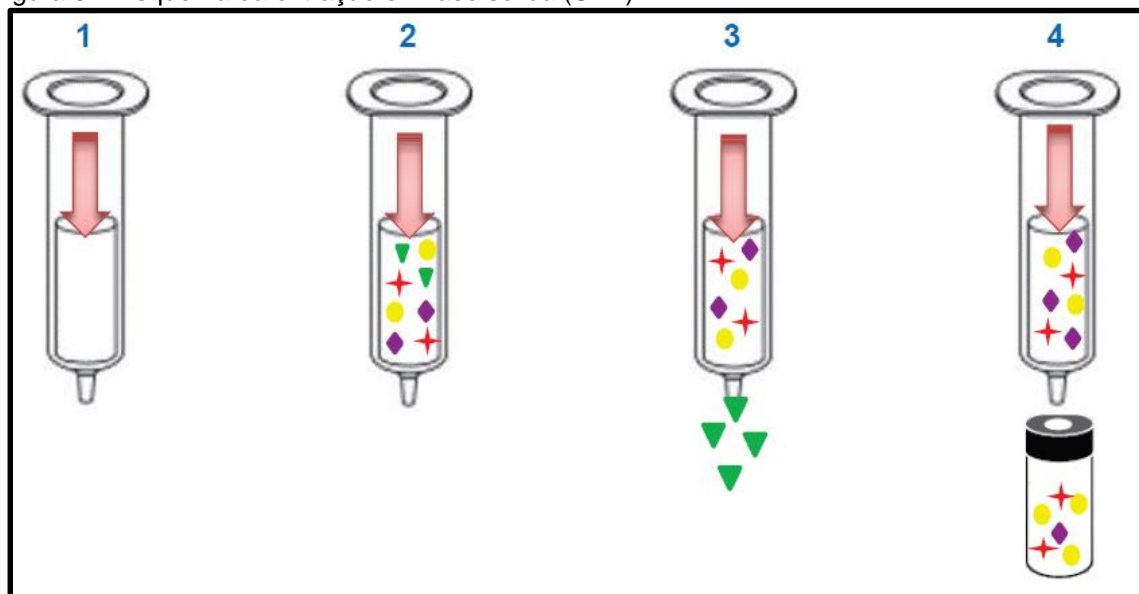
Os adsorventes podem ser grupos funcionais orgânicos hidrofóbicos quimicamente ligados a uma superfície sólida, como sílica. Um exemplo comum é a ligação do grupo C18 com a sílica, onde esse grupo interage com compostos orgânicos hidrofóbicos pela ação das forças de Van der Waals, e dessa forma são extraídos da fase aquosa (LANÇAS, 2004a).

Segundo ALDA *et al.* (2003), a extração de estrógenos em água é usualmente feita por SPE em discos ou, mais frequentemente em cartuchos, sendo o octadecilsilano (C18) quimicamente ligado à sílica, o adsorvente mais empregado.

Os analitos presentes na amostra são aprisionados no material adsorvente, e posteriormente removidos com uma pequena quantidade de solvente orgânico. A amostra pode ser percolada com auxílio de bomba a vácuo ou pressionada com uma seringa. Anteriormente à passagem da amostra pelo cartucho, este deve ser condicionado com um solvente apropriado. A etapa de lavagem (*clean up*) é usualmente requerida, e tem por objetivo eliminar os compostos interferentes presentes na amostra (LANÇAS, 2004a).

A SPE envolve basicamente quatro etapas: (1) condicionamento do cartucho: uso de solvente adequado para disponibilizar os sítios ativos e para ajustar as forças dos solventes de eluição com o solvente da amostra; (2) extração dos analitos da amostra; (3) lavagem do cartucho para eliminar possíveis interferentes e (4) eluição dos analitos de interesse para posterior análise. Na Figura 8 é apresentado um esquema com as principais etapas envolvidas no processo de SPE.

Figura 8 – Esquema da extração em fase sólida (SPE).



Fonte: Souza (2011).

A escolha do cartucho apropriado para a realização da extração é uma etapa essencial no desenvolvimento analítico, o qual deve ser selecionado de acordo com as propriedades físico-químicas do analito de interesse. Vários materiais são utilizados como adsorvente, sendo dividido em três principais grupos: sílica, poliméricos e carbono ativado. Um dos materiais bastante empregado na concentração de estrogênios é a sílica modificada octadecilsilano (C-18). Outro material indicado e bastante empregado para esses analitos é o copolímero, produzido a partir dos monômeros: hidrofílico (N-vinilpirrolidona) e lipofílico (divinilbenzeno) disponível comercialmente nos cartuchos Oasis HLB® da Waters (PESSOA, 2012).

Os materiais sorventes dependem das características de acidez dos compostos analisados. Para antibióticos, medicamentos antifúngos e antiparasitários de uso humano e veterinário, os materiais sorventes mais utilizados são os cartuchos com sorvente de copolímero divinilbenzeno e N-vinilpirrolidona que, por apresentarem características de interação mista hidrofílica-lipofílica, podem extrair analitos de média a alta polaridade, apresentando os melhores percentuais de recuperação (SILVA e COLLINS, 2011).

Uma das grandes desvantagens da SPE é o volume de amostra requerida para a concentração dos analitos, além do tempo demandado. Por exemplo, para uma concentração de 1000 vezes, é necessário um volume de 1,0 L e o tempo de extração pode chegar a 3 horas (WANG *et al.*, 2005).

### **3.9 Validação do método analítico**

Devido à inexistência de uma metodologia padrão alguns documentos podem ser utilizados para a validação do método analítico (ABNT-NBR 14029, 2005; BRASIL, 2003; INMETRO, 2006; LANÇAS, 2004b; RIBANI *et al.*, 2004; HUBER, 2007).

A seguir, são descritas as definições de cada critério de acordo com as normas mais relevantes (RIBANI *et al.*, 2004).

#### **3.9.1 Seletividade**

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir na determinação de analitos em uma amostra complexa. A primeira forma de avaliar consiste em comparar a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com a substância (padrão); para este caso, nenhum outro composto deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse. Este parâmetro pode ser obtido de varias maneiras. A avaliação pode ser feita com detectores modernos (arranjo de diodos, por exemplo) que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza-se isso como uma indicação da presença do composto puro (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

#### **3.9.2 Linearidade e faixa de aplicação**

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A relação entre o sinal e a concentração deve ser determinada empiricamente a partir de sinais medidos para concentrações conhecidas. Essa relação pode ser expressa por meio de uma equação de reta chamada curva analítica. Em geral, serão necessários vários níveis de concentração, no mínimo cinco, para construir a curva analítica. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (INMETRO, 2006).

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é, Equação 1:

$$y = ax + b \quad (1)$$

Onde:

y = resposta medida (área ou altura do pico, absorvância, etc.);

x = concentração;

a = inclinação da curva analítica = sensibilidade (coeficiente angular);

b = interseção com o eixo y, quando x = 0 (coeficiente linear).

Por meio da regressão linear, podem-se obter além dos coeficientes angular e linear, o coeficiente de correlação (R). Esse último oferece informações a respeito da qualidade da curva analítica, pois, quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão dos pontos.

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Para tal, deve ser verificada a ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração, antes de fazer a regressão linear.

A faixa de aplicação corresponde ao intervalo entre o valor superior e o inferior da substância em exame que atenda aos requisitos de precisão e exatidão.

### 3.9.3 *Sensibilidade*

O método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação (coeficiente angular). A sensibilidade do método analítico é expressa pelo coeficiente angular da curva de regressão linear, e é determinada simultaneamente à linearidade (ABNT-NBR 14029; INMETRO, 2006).

### 3.9.4 *Limite de detecção (LD)*

Representa a menor concentração da substância que pode ser detectada pelo método, mas não necessariamente quantificada. O LD pode ser calculado de três maneiras:

a) Método visual: é utilizado para determinar o limite de detecção empregando a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de tal modo que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável). Esse procedimento também pode ser feito por meio do instrumento utilizando parâmetros de detecção no método de integração.

b) Método da relação sinal-ruído: aplica-se somente a métodos que apresentam ruídos na linha de base. Para determinar a relação sinal-ruído, é feita a comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz e um branco (matriz isenta do composto de interesse). Assim, é estabelecida a concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal-ruído pode ser 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitas como estimativas de LD.

c) Método baseado em parâmetros da curva analítica: neste caso, o LD pode ser expresso como na Equação 2:

$$LD = 3,0 \times \frac{S}{S} \quad (2)$$



Em que,  $s$  é a estimativa de desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio-padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação, e  $S$  é a inclinação (*slope*) ou coeficiente angular da curva analítica. Para calcular esses dados, uma curva analítica deve ser feita utilizando a matriz contendo o composto de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de detecção.

### 3.9.5 Limite de quantificação (LQ)

Representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida. O LQ pode ser determinado pelos mesmos métodos para a determinação de LD. No método da relação sinal-ruído, o critério a ser adotado passa a ser a taxa 10:1, para sinal-ruído. No método baseado em parâmetros da curva analítica, a Equação 3 é adotada para o cálculo:

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (3)$$

Em que,  $s$  é a estimativa de desvio-padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio-padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação, e  $S$  é a inclinação (*slope*) ou coeficiente angular da curva analítica.

### 3.9.6 Precisão

Expressa a dispersão dos resultados de ensaios repetidos para mesma amostra ou padrão. A precisão pode ser expressa em três níveis diferentes: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo.

A repetibilidade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e é, algumas vezes, denominada precisão intra-ensaio ou intra-corrída e pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo.

Não se deve confundir repetibilidade com precisão instrumental, a qual é medida pelas injeções repetidas, sequenciais da mesma amostra, seguida pela média dos valores da área do pico ou altura do pico e determinação da estimativa do desvio padrão relativo de todas as injeções (RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão intermediária indica a variação referente a alterações dentro do mesmo laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores. A precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI *et al.*, 2004).

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamentos, etc.). A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios quando analisam uma amostra em comum.

A precisão pode ser expressa pelo desvio-padrão absoluto, pelo desvio padrão relativo (coeficiente de variação, CV) ou pelo intervalo de confiança. O limite de precisão aceito varia de acordo com a concentração do analito.

### **3.9.7 Exatidão**

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associado a valores de precisão).

Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços.

O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características da pesquisa. A ANVISA (BRASIL, 2003) estabelece que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração deve ser obedecido, por exemplo, ensaios em triplicata para três níveis de concentração.

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação; adição de padrão (RIBANI *et al.*, 2004).

A utilização de materiais de referência certificados (CRM), os quais podem ser adquiridos em órgãos reconhecidos, como o NIST (*National Institute of Standards and Technology – USA*), são acompanhados de um certificado que possui o valor e a incerteza para a concentração de uma dada substância. Outra forma de avaliação da exatidão consiste na comparação dos resultados obtidos empregando-se novo método e método oficial ou de referência.

Os ensaios de recuperação consistem em outra alternativa para a determinação da exatidão. A recuperação (ou fator de recuperação),  $R$ , é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (RIBANI *et al.*, 2004).

É importante considerar como a eficiência do método varia em função da concentração da substância. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até  $\pm 20\%$ . Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até  $\pm 15\%$  (RIBANI *et al.*, 2004).

### **3.9.8 Robustez**

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros (RIBANI *et al.*, 2004).

A ANVISA (BRASIL, 2003) estabelece que em HPLC, a robustez deve ser avaliada variando parâmetros como pH da fase móvel, composição da fase móvel, temperatura do forno da coluna, diferentes fabricantes de colunas e fluxo da fase móvel.

Para determinar a robustez de um método, o INMETRO recomenda o teste de Youden (INMETRO, 2010). Trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações.

### **3.10 Qualidade das águas**

Os critérios de qualidade da água são estabelecidos para cada substância de acordo com a probabilidade de ocorrência em determinada região ou país e a possibilidade de provocar efeitos aos seres vivos expostos a elas. As concentrações limitantes são determinadas a partir de dados de toxicidade, exposição e riscos que são estabelecidos para cada classe de contaminante em particular. Os critérios de qualidade da água são empregados por diversas agências reguladoras (RAIMUNDO, 2011).

Em 2009 a USEPA disponibilizou uma lista de novos contaminantes candidatos à futura regulamentação (*CCL-3: Contaminant Candidate List 3*). De acordo com Raimundo (2011), a CCL-3 é formada por 104 compostos e 12 contaminantes microbiológicos não regulamentados nos termos da lei americana para águas tratadas para os quais são conhecidos a ocorrência ou a possibilidade de ocorrência em sistemas de água tratada. Os possíveis efeitos à saúde pública poderão ser considerados em futuras regulamentações. Na CCL-3 estão incluídos dentre outros hormônios, o 17 $\beta$ -estradiol e o 17 $\alpha$ -etinilestradiol, além de produtos farmacêuticos e industriais, agrotóxicos e produtos de degradação (USEPA, 2003b).

Em fevereiro de 2011, a USEPA aprovou também o projeto de lei para o monitoramento de contaminantes não regulamentados (*Unregulated Contaminants Monitoring Rule – UCMR 3*). A UCMR-3 lista 30 contaminantes prioritários, juntamente com métodos validados, que deverão ser monitorados entre 2013 e 2015 por todos os sistemas públicos de água que atendam mais de 10.000 pessoas e, outros, definidos por amostragem, que atendam um número menor de americanos. Dentre os contaminantes, 24 estão na CCL-3 e incluem o 17 $\beta$ -estradiol e o 17 $\alpha$ -etinilestradiol (USEPA, 2013c).

Raimundo (2011) comenta sobre a preocupação com a presença de fármacos, drogas ilícitas e compostos interferentes endócrinos nas águas distribuídas à população de São Paulo, Brasil. Onde, uma série de debates e discussões incluindo, diversos pesquisadores, concessionárias de água, associações e órgãos do governo, como a CETESB, por exemplo, resultou em uma proposta apresentada pela Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental (ABES) para a inclusão de novos contaminantes não legislados na Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para que se pudesse desenvolver um procedimento analítico capaz de identificar e quantificar os possíveis interferentes endócrinos nas amostras ambientais estudadas, o trabalho experimental foi dividido em três etapas. Na primeira etapa do trabalho, foi desenvolvido e otimizado um método analítico para a identificação e quantificação dos analitos de interesse. A segunda etapa do trabalho consistiu na validação do método empregado e na terceira etapa foram analisadas amostras de água superficial dos açudes que participam do abastecimento da RMF.

As etapas de desenvolvimento de método e análises foram realizadas no laboratório de análise de traços (LAT) localizado no departamento de química analítica e físico química da universidade federal do Ceará (DQAFQ-UFC).

### 4.1 Primeira etapa – Desenvolvimento e otimização do método analítico

#### 4.1.1 *Padrões e solventes utilizados*

Os padrões analíticos dos compostos foram adquiridos da *Sigma-Aldrich*. A identificação dos cinco analitos, pureza dos reagentes, massa molecular e etc., podem ser observadas na Tabela 3. Na Figura 9 são apresentadas as estruturas moleculares dos compostos.

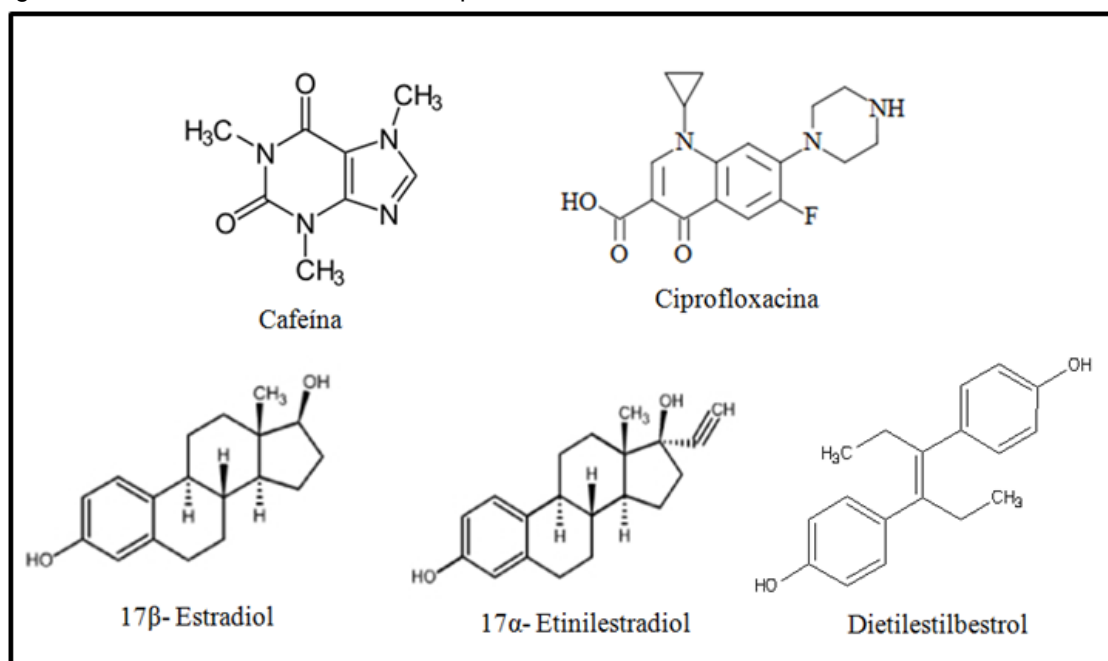
Tabela 3 – Identificação dos cinco padrões analíticos utilizados no estudo.

Composto	Categoria	Fórmula molecular	Massa molar (g/mol)	Pureza (%)	Número CAS <sup>a</sup>
Cafeína	Fármaco	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	194,19	99	95789-13-2
Ciprofloxacina	Fármaco	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	331,4	98	85721-33-1
17β-estradiol	Hormônio natural	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	272,17	98	50-28-2
17α-etinilestradiol	Hormônio sintético	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	296,17	99,4	57-63-6
Dietilestilbestrol	Hormônio sintético	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	268,4	99	56-53-1

a: Chemical Abstract Service.

Fonte: Autora, 2013.

Figura 9 – Estrutura molecular dos compostos estudados.



Fonte: Autora, 2013.

Os solventes orgânicos de grau cromatográfico (HPLC), metanol (MeOH), acetonitrila (ACN) e acetona (AC) foram obtidos da VETEC. Água deionizada foi obtida a partir do sistema Milli-Q (Millipore). Para a acidificação da fase móvel, foi empregado ácido clorídrico (HCl) P.A. também da VETEC.

Soluções estoque de 1000 mg/L dos compostos cafeína (CAF), ciprofloxacina (CIPRO), 17 $\beta$ -estradiol (E2), 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) e dietilestilbestrol (DES) foram preparadas através da diluição de 10 mg do analito em 10 mL de MeOH grau HPLC.

Solução multielementar de concentração 10 mg/L foi preparada em metanol grau HPLC, a partir das soluções individuais, e diluídas para as concentrações requeridas.

Todos os materiais e vidrarias foram primeiramente lavados com água da torneira, detergente diluído e escova. Em seguida, foram enxaguados com água destilada e água deionizada (Milli-Q, Millipore) e, finalmente, submetidos à limpeza final com acetona. Durante todo o processo de limpeza, as vidrarias foram colocadas em bandejas limpas sobre folhas de papel alumínio.

#### **4.1.2 Equipamento utilizado**

A identificação e quantificação dos compostos foram realizados utilizando-se um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), marca Shimadzu, modelo 20 A. Foi empregado um detector na região do ultravioleta e visível com arranjo de diodos, modelo SPD-M20A, forno de coluna modelo CTO-20A do Laboratório de Análises de Traços (LAT), do Departamento de Química Analítica e Físico-Química da UFC, conforme ilustra a Figura 10.

Para separação dos compostos foi utilizada uma coluna de fase reversa da marca Shimadzu, modelo Shim-pack CLC – ODS, de 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 5  $\mu$ m de tamanho de partícula. O volume de injeção manteve-se constante e igual a 20,0  $\mu$ L em todas as medidas.



Figura 10– HPLC/DAD (SHIMADZU) utilizado na determinação dos compostos.



Fonte: Autora, 2013.

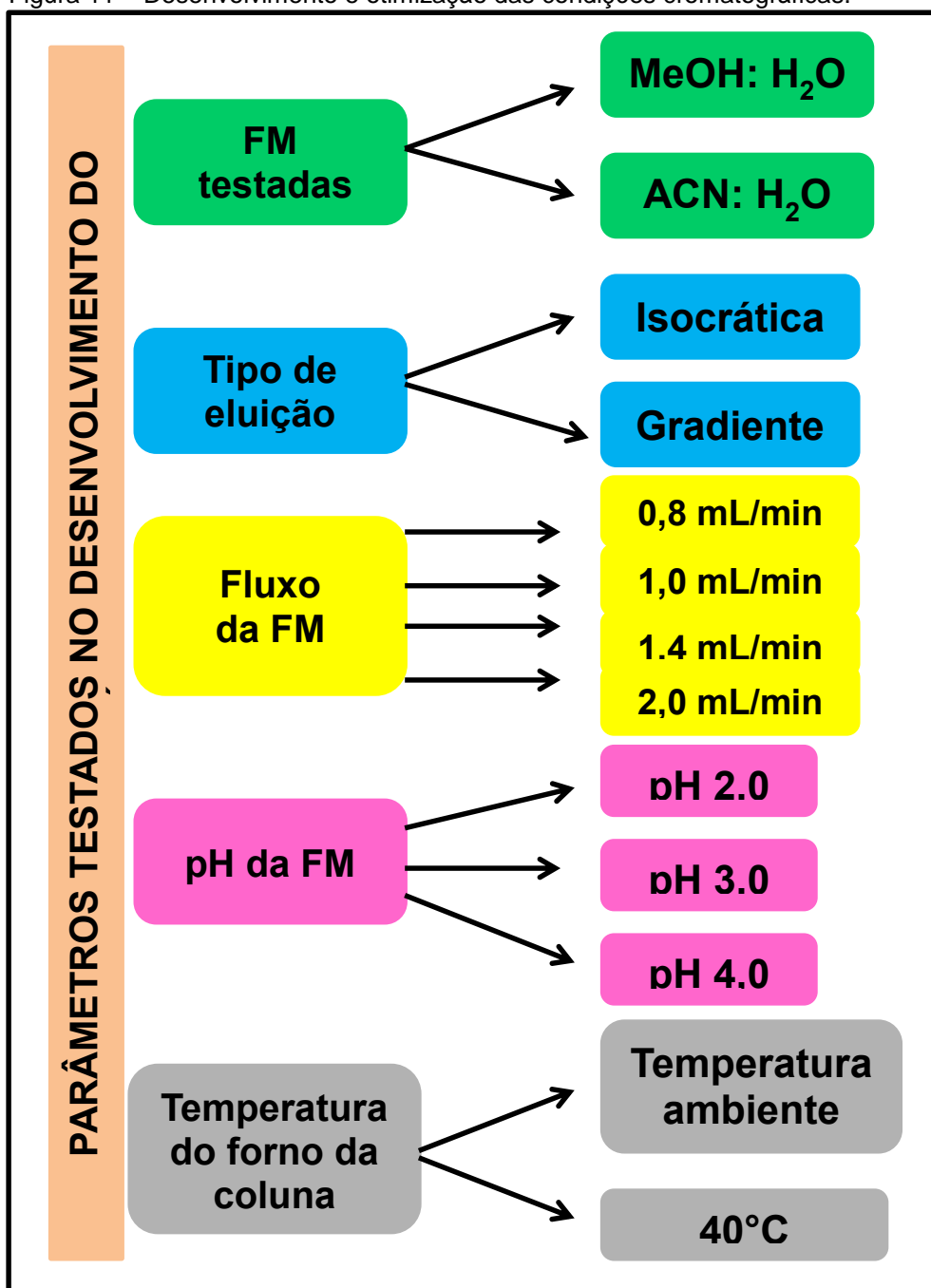
#### **4.1.3 Otimização das condições cromatográficas**

Foram realizados vários testes a fim de otimizar as condições cromatográficas para análise dos compostos em estudo baseados em métodos publicados na literatura científica (ALDA; BARCELÓ, 2001; CINQUINA *et al.*, 2003; RAIMUNDO, 2007; TURIEL; BORDIN; RODRÍGUEZ, 2003; ZARZYCKI; WŁODARCZYK; BARAN, 2009).

Para se obter as melhores condições de análise dos interferentes endócrinos por cromatografia líquida acoplada a um detector na região do ultravioleta com arranjo de diodos (HPLC/DAD), inicialmente foram realizadas injeções dos padrões individuais para a obtenção do tempo de retenção das substâncias e para a avaliação da sensibilidade do detector. Posteriormente, injeções de uma solução de concentração 5,0 mg/L com todos os padrões (solução multielementar) foram realizadas a fim de se obter a ordem de eluição dos compostos.

Na análise cromatográfica foi avaliada a eficiência da separação dos compostos testando como fase móvel (FM) metanol/água e acetonitrila/água. Também foram estudados os seguintes parâmetros: tipo de eluição (isocrática ou gradiente), fluxo da FM, pH da FM e temperatura do forno da coluna. A Figura 11 ilustra detalhadamente o desenvolvimento do método na análise cromatográfica.

Figura 11 – Desenvolvimento e otimização das condições cromatográficas.



Fonte: Autora, 2013.

#### **4.1.4 Otimização do método de extração em fase sólida (SPE)**

Inicialmente foi feito um levantamento bibliográfico dos métodos de extração utilizados. Poucos são os trabalhos que empregam a extração líquido-líquido para concentração dos analitos (JIN *et al.*, 2004; ZAFRA *et al.*, 2003). A extração de compostos orgânicos empregando cartuchos comerciais recheados com adsorventes é a técnica mais usual. Os procedimentos de extração testados foram adaptados de trabalhos desenvolvidos por Raimundo (2007), Lopes *et al.* (2010), Verbinnen, Nunes e Vieira (2010) e Pessoa (2012).

Nos trabalhos reportados na literatura, diversos são os fatores considerados na otimização do processo de extração de compostos orgânicos por fase sólida (SPE). Dentre eles se encontram o tipo de fase sólida, o volume da amostra, o volume e a composição do solvente de eluição, a temperatura de extração, o pH e a quantidade de sais dissolvidos na amostra (GIROTTI *et al.*, 2007).

Os fatores escolhidos como intervenientes no sucesso do processo de isolamento e concentração dos analitos foram:

- a) Tipo de material adsorvente: Foram testados dois cartuchos de SPE, um cartucho contendo o grupo octadecilsilano (C-18) quimicamente ligado à sílica; e um cartucho polimérico (divinilbenzeno-N-vinilpirolidona) HLB;
- b) Volume de amostra: Foram estudados os volumes 500 mL e 250 mL de amostra;
- c) Acidificação da amostra: Foram estudadas amostras sem modificação do pH, em torno de pH 7,5, e amostras acidificadas em pH 3 adicionando ácido clorídrico (HCl) concentrado;
- d) Volume de eluente: Foram estudados dois volumes de eluente, 2,0 mL de MeOH 100% e 4,0 mL de MeOH 100%.

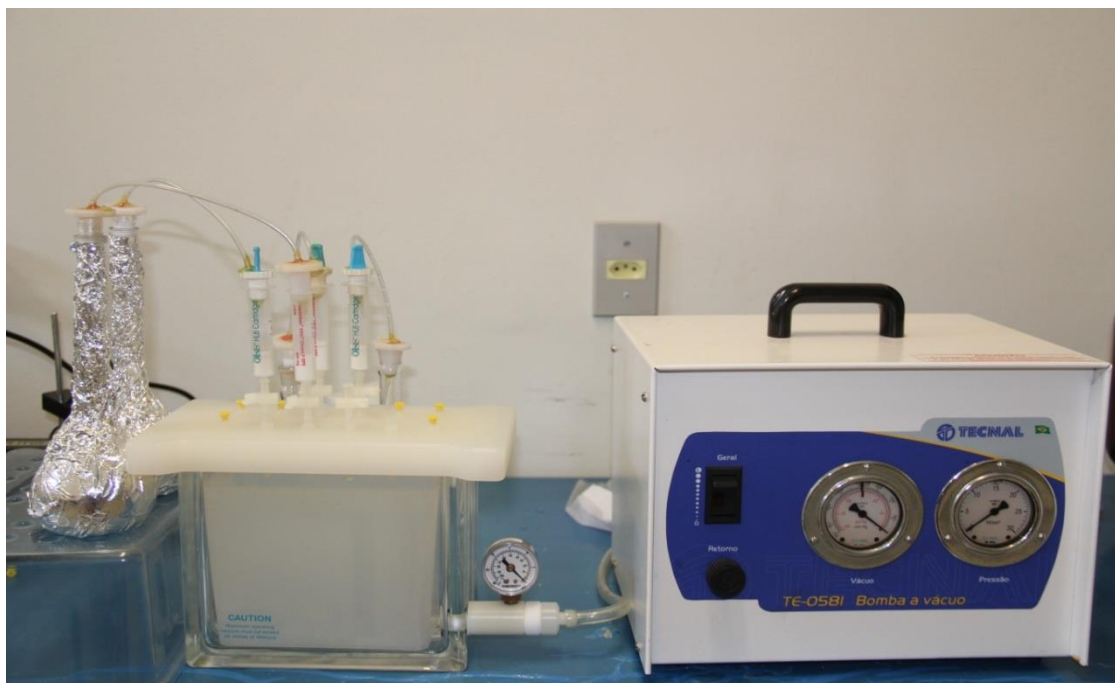
A metodologia analítica da concentração dos compostos endócrinos por meio de extração em fase sólida (SPE) foi desenvolvida em etapas, de modo a verificar as interações existentes em cada etapa do processo.

Para verificar as interações existentes entre cada etapa do processo e a melhor condição de trabalho buscou-se o auxílio da quimiometria, ferramenta útil no planejamento e análise experimental, e que permite a análise multivariada, ou seja, a análise simultânea dos vários fatores, fornecendo dentre outros resultados, os efeitos de interação entre os mesmos (GIROTTI *et al.*, 2007).

Assim, foi realizado um planejamento fatorial para a SPE com o objetivo de otimizar a metodologia de extração e pré- concentração dos analitos de interesse.

Para os procedimentos de extração por SPE foi utilizado um sistema Manifold Supelco, conforme mostrado na Figura 12, o qual era conectado a uma bomba de vácuo (modelo TE – 8501 da marca TECNAL) que mantinha o fluxo constante de 2 mL/min.

Figura 12 – Extração em fase sólida (SPE).

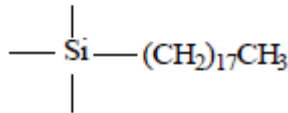
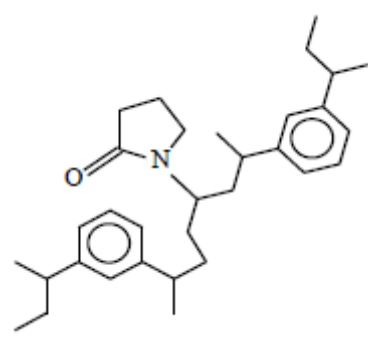


Fonte: Autora, 2013.

#### 4.1.4.1 Tipo de material adsorvente

Foram testados dois cartuchos comerciais com diferentes tipos de material adsorvente: HyperSep C-18 (Thermo Scientific) e HLB (Oasis) de 500 mg/6mL cada. A Tabela 4 apresenta as características dos adsorbentes (fase estacionária) empregados na etapa da extração em fase sólida (SPE).

Tabela 4 – Característica dos adsorbentes empregados no estudo do tipo de material adsorvente.

Sorbente	Fase Estacionária	Grupo Funcional	Fabricante
HyperSep™ C-18 (500mg/6mL)	Octadecilsilano (sílica modificada): fase reversa		Thermo Scientific
Oasis® HLB (500 mg/6mL)	Polímero (divinilbenzeno-N- vinilpirolidona): fase reversa		Waters

Fonte: Pessoa (2012).

Segundo Mayer *et al.* (1995) as características físicas dos materiais adsorventes, como área de superfície, tamanho da partícula, tamanho do poro ou volume de poro são propriedades cruciais para a escolha do material, tais como as apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Propriedades físicas de caracterização das partículas dos cartuchos C-18 e HLB.

Parâmetro	Unidade	C-18 <sup>1</sup> HyperSep	HLB <sup>2</sup> (Oasis)
Área de superfície	m <sup>2</sup> /g	496	801
Diâmetro do poro	Å	60	87
Volume do poro	mL/g	0,75	1,36
Diâmetro da partícula	µm	40 – 63	52,6

Fonte: <sup>1</sup> Certificado de análise emitido pela Thermo Scientific (2012); <sup>2</sup> Certificado de análise emitido pela Waters (2012).

Utilizou-se como matriz água de açude. Inicialmente a amostra foi filtrada utilizando um sistema com bomba de vácuo e filtro de fibra de vidro com diâmetro de 47 mm e porosidade de 0,45 µm (Macherey-Nagel) para remoção de material em suspensão antes da extração em fase sólida (Figura 13).

Figura 13 – Sistema de filtração utilizado para amostra.



Fonte: Autora, 2014.

Posteriormente, foi adicionada uma solução multielementar dos analitos numa concentração de 50 µg/L à matriz aquosa (água de açude). Os cartuchos foram condicionados com 5,0 mL de ACN 100%, seguidos de 5,0 mL de MeOH 100% e mais 5,0 mL de água ultrapura. Em seguida percolou-se um volume de amostra adequado, e os compostos de interesse retidos foram eluídos com 2,0 mL de MeOH 100% e os extratos analisados por HPLC-DAD. O estudo foi realizado em duplicata e com análise do branco.

A Tabela 6 mostra as condições utilizadas em SPE no estudo do material adsorvente.

Tabela 6 – Condições utilizadas na extração do estudo do material adsorvente.

Cartucho	Dopagem	Condicionamento	Volume de amostra	Eluição
C-18	50 µg/L	5,0 mL ACN + 5,0 mL MeOH + 5,0 mL H <sub>2</sub> O	500 mL	2 x 1,0 mL MeOH
HLB	50 µg/L	5,0 mL ACN + 5,0 mL MeOH + 5,0 mL H <sub>2</sub> O	500 mL	2 x 1,0 mL MeOH

Fonte: Autora, 2013.

A avaliação da eficiência dos cartuchos foi realizada em termos de recuperação (%) dos compostos de interesse. A faixa esperada de concentração (recuperação) depende da matriz amostral, do procedimento de recuperação utilizado e da concentração dos analitos (AOAC, 1998).

Na Tabela 7 são apresentados valores de recuperação estimados em função da concentração do analito na amostra, segundo as normas da AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*), 1998.

Tabela 7 - Recuperação de analitos em diferentes concentrações.

Concentração do analito (%)	Relação do analito	Unidade	Média de recuperação (%)
100	1	100 %	98 - 102
≥ 10	10 <sup>-1</sup>	10 %	98 - 102
≥ 1	10 <sup>-2</sup>	1 %	97 - 103
≥ 0,1	10 <sup>-3</sup>	0,1 %	95 - 105
0,01	10 <sup>-4</sup>	100 ppm	90 - 107
0,001	10 <sup>-5</sup>	10 ppm	80 - 110
0,0001	10 <sup>-6</sup>	1 ppm	80 - 110
0,00001	10 <sup>-7</sup>	100 ppb	80 - 110
0,000001	10 <sup>-8</sup>	10 ppb	60 - 115
0,0000001	10 <sup>-9</sup>	1 ppb	40 - 120

Fonte: HUBER (2007).

Legenda: ppm : mg/L; ppb : µg/L.

#### 4.1.4.2 Planejamento Fatorial para SPE

O planejamento fatorial na otimização de processos de extração, concentração e isolamento de substâncias baseia-se no fato de o processo admitir a otimização de uma série de fatores intervenientes e que possam ter interação entre si, suprimindo desta forma algumas lacunas deixadas pela análise univariada (GIROTTI *et al.*, 2007).

A extração em fase sólida (SPE) foi otimizada pelo planejamento fatorial, que foi realizado em duas fases. Na primeira fase foi realizada análise de quatro fatores (2<sup>4</sup>), em dois níveis (+1 e -1), sem ponto central, para a seleção do melhor cartucho de extração (fase sólida). Na segunda fase, após a escolha do tipo de cartucho, foi realizada análise de três fatores (2<sup>3</sup>), também em dois níveis (+1 e -1) e com ponto central. Os fatores selecionados como interferentes no processo de SPE foram: tipo de cartucho (fase sólida), volume de eluente, pH e volume da amostra.

Como fator de resposta foi utilizado a área do pico do analito e o *software* R (versão 3.0.1) foi utilizado na modelagem dos dados no estudo.



A concentração avaliada dos IEs foi de 50 µg/L, a fim de se obter uma boa visualização nos resultados. A Tabela 8 apresenta os fatores escolhidos, com seus respectivos níveis, na primeira fase do planejamento (2<sup>4</sup>).

Tabela 8 – Fatores e níveis adotados para o planejamento fatorial (2<sup>4</sup>).

Fatores	-1	+1	Unidade
Cartucho	HLB	C18	-
Volume de eluente	2,0	4,0	mL
pH amostra	3,0	7,5	-
Volume de amostra	250	500	mL

Fonte: Autora, 2014.

A Tabela 9 apresenta os fatores escolhidos com seus respectivos níveis na segunda fase do planejamento (2<sup>3</sup>), com ponto central.

Tabela 9 – Fatores e níveis adotados para o planejamento fatorial (2<sup>3</sup>).

Fatores	-1	0	+1	Unidade
Volume de eluente	2,0	3,0	4,0	mL
pH amostra	3,0	5,25	7,5	-
Volume de amostra	250	375	500	mL

Fonte: Autora, 2014.

Os ensaios realizados durante a primeira fase do planejamento são mostrados na Tabela 10, cada ensaio foi realizado em duplicata e os extratos foram injetados também em duplicata.

Tabela 10 – Planejamento fatorial (2<sup>4</sup>) para SPE.

Ensaio	Cartucho	Vol. Eluente, mL	pH Amostra	Vol. Amostra, mL
1	C18	2,0	7,5	250
2	C18	2,0	3,0	250
3	C18	4,0	7,5	250
4	C18	4,0	3,0	250
5	C18	2,0	7,5	500
6	C18	2,0	3,0	500
7	C18	4,0	7,5	500
8	C18	4,0	3,0	500
9	HLB	2,0	3,0	250
10	HLB	2,0	7,5	250
11	HLB	4,0	3,0	250
12	HLB	4,0	7,5	250
13	HLB	2,0	7,5	500
14	HLB	2,0	3,0	500
15	HLB	4,0	3,0	500
16	HLB	4,0	7,5	500

Fonte: Autora, 2014.

Após selecionada a melhor fase sólida (cartucho), foram realizados ensaios no ponto central para o cartucho C-18. Os ensaios da segunda fase do planejamento são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 – Planejamento fatorial (2<sup>3</sup>) com adição do ponto central para SPE.

Ensaio	Cartucho	Vol. Eluente, mL	pH Amostra	Vol. Amostra, mL
1	C18	2,0	7,5	250
2	C18	2,0	3,0	250
3	C18	4,0	7,5	250
4	C18	4,0	3,0	250
5	C18	2,0	7,5	500
6	C18	2,0	3,0	500
7	C18	4,0	7,5	500
8	C18	4,0	3,0	500
9	C18	3,0	5,25	375

Fonte: Autora, 2014.

## 4.2 Segunda etapa – Validação do método analítico

Segundo Lanças (2004b), a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

A validação do método analítico do presente trabalho foi realizada seguindo os critérios de documentos usualmente utilizados (ABNT-NBR 14029, 2005; BRASIL, 2003; INMETRO, 2006; LANÇAS, 2004b) e literatura científica (RIBANI *et al.*, 2004; HUBER, 2007).

Foi realizada a validação tanto do método cromatográfico, como a validação do método de extração.

### 4.2.1 Validação do método cromatográfico

Na validação do método cromatográfico tomou em conta as figuras de mérito: seletividade/especificidade, sensibilidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e robustez.

No desenvolvimento de métodos cromatográficos, deve-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico (por exemplo, com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos - DAD ou espectrometria de massas - MS) são interessantes para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente (BRASIL, 2003).

A seletividade ou especificidade do método cromatográfico foi realizada de três maneiras: (1) através da comparação de três cromatogramas: sendo o primeiro referente a uma amostra pura; o segundo referente à mesma amostra dopada com os cinco compostos de concentração 500 µg/L; e o terceiro referente a um padrão multi dos cinco compostos de concentração 500 µg/L; (2) comparação do espectro do pico obtido na separação com a de um padrão, utilizando disso como a indicação da presença do composto puro; (3) comparação entre duas curvas analíticas, uma curva feita com adição das substâncias de interesse na amostra (superposição de matriz) e comparada com uma curva analítica sem a presença da matriz.

A linearidade foi avaliada pela resposta obtida em função da concentração do analito, a qual foi estudada em um intervalo de concentração que variou de 5,0 a 1000 µg/L. No presente trabalho, a faixa linear foi obtida por padronização externa e as curvas analíticas foram feitas a partir dos padrões analíticos preparados em MeOH grau HPLC. A linearidade foi determinada pelo coeficiente de correlação (R), obtido pelo gráfico relacionando a resposta do equipamento em função de 7 concentrações do analito. Para estimar os coeficientes das curvas analíticas, utilizou-se a equação da regressão linear determinada pelo método dos mínimos quadrados. A sensibilidade foi expressa pela inclinação (coeficiente angular) da curva analítica.

O limite de quantificação é definido como sendo a menor quantidade detectável com precisão e exatidão, já o limite de detecção representa a menor quantidade do composto de interesse que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (LANÇAS, 2004b)

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do equipamento foram calculados a partir do método baseado em parâmetros da curva analítica, uma vez que esse método é considerado de maior confiabilidade, pois leva em consideração o intervalo de confiança da regressão linear (RIBANI *et al.*, 2004). As equações utilizadas para o cálculo do LD e LQ são apresentados nas Equações 4 e 5.

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad (4)$$

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC} \quad (5)$$

Onde,  $DP_a$  é a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação; e  $IC$  é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica (BRASIL, 2003).

A precisão instrumental foi determinada com base nas áreas dos picos e tempo de retenção dos compostos de uma mesma amostra. A amostra (água de açude) foi dopada com 50 µg/L (50 ppb) dos analitos de interesse

seguida de extração por SPE. Foram realizadas dez injeções repetitivas e sequenciais do extrato, sendo calculado o coeficiente de variação (CV), de acordo com a Equação 6.

$$CV (\%) = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração Média}} \times 100 \quad (6)$$

Segundo manual da AOAC - *Association of Official Analytical Chemists* (1998) a precisão deve ser estimada de acordo com a concentração do analito observada, conforme mostrado na Tabela 12.

Tabela 12 - Concentração do analito vs Precisão.

<b>Concentração do analito</b>	<b>CV (%)</b>
100 ppm	5,3
10 ppm	7,3
1 ppm	11
100 ppb	15
10 ppb	21
1 ppb	30

Fonte: PESSOA (2012), HUBER (2007).

Legenda: ppm: mg/ L; ppb: µg/L.

A robustez do método cromatográfico foi investigada através do teste de Youden e Steiner (1975), tal como recomendado pelo Inmetro (INMETRO, 2006).

Este teste baseia-se na realização de um determinado número de ensaios sobre uma amostra (normalmente até oito, pois acima deste número a análise da robustez torna-se difícil), realizados segundo um plano de controle de fatores (até um máximo de sete), susceptíveis de influenciarem o processo. Chamam-se fatores os parâmetros cujos efeitos de flutuação se pretendem quantificar através dos resultados dos ensaios. Assim, é avaliado o efeito de cada fator em estudo, através de uma análise dos resultados experimentais (GUIA RELACRE 2000, 2013).

Foram escolhidos três parâmetros analíticos e induzidas pequenas variações nas condições nominais do método cromatográfico. Os parâmetros escolhidos foram: pH da fase móvel, concentração de acetonitrila na fase móvel

e temperatura do forno da coluna. Posteriormente, quatro análises foram realizadas com o objetivo de determinar a influência de cada parâmetro no resultado final.

A Tabela 13 apresenta os três parâmetros analíticos utilizados, assim como as variações introduzidas. As condições nominais das variáveis são representadas por letras maiúsculas (A, B e C) e as condições com as variações alternativas são representadas por letras minúsculas (a, b e c).

Tabela 13 - Parâmetros analíticos selecionados para a análise de robustez e suas respectivas variações.

Variável	Condições nominais	Condições alternativas	Condição experimental			
			1	2	3	4
A/a - pH da fase móvel	pH 2,0 - (A)	pH 2,11 -(a)	A	A	a	a
B/b - Concentração da fase móvel	10% a 100% de ACN - (B)	10,2% a 98% de ACN - (b)	B	b	B	b
C/c - Temperatura da coluna	28°C - (C)	33°C - (c)	C	c	c	C
Resultados observados			s	t	u	v

Fonte: Autora, 2014.

Os três parâmetros e suas respectivas variações foram combinados em quatro corridas cromatográficas, realizadas em uma ordem aleatória. Dos quatro ensaios realizados, dois deles foram realizados com cada parâmetro em seu valor nominal e dois deles com o parâmetro em variação. Os resultados das análises foram apresentados por letras de *s a v*.

O teste Youden e Steiner (1975) foi realizado em duplicata sendo as concentrações das amostras analisadas de 50 µg/L para todos os analitos de interesse.

Para determinar a influência da variação de cada parâmetro no resultado final, deve-se comparar a média dos dois valores correspondentes às letras maiúsculas com a média dos dois valores correspondentes às letras minúsculas. Por exemplo, para avaliar o efeito da temperatura da coluna no resultado final da análise, pode-se utilizar a Equação 7 (CÉSAR e PIANETTI, 2009):

$$\text{Efeito C/c} = \frac{s+v}{2} - \frac{t+u}{2} \quad (7)$$

Assim, a influência dos três parâmetros analíticos em relação à área dos picos e tempo de retenção (Tr) dos IEs foi avaliada.

Por meio do teste de Youden, pode-se estabelecer quais parâmetros apresentam maior influência nos resultados finais da análise e fazer um controle mais rigoroso das eventuais variações destes parâmetros que podem ocorrer durante uma análise de rotina.

#### **4.2.2 Validação da curva de calibração do método analítico**

O processo de validação das curvas analíticas foi realizado com o parâmetro de linearidade acompanhado da análise estatística visando garantir a qualidade da linearidade e da curva de calibração. Este parâmetro é sugerido pela ANVISA e INMETRO para a validação de método analítico (BRASIL, 2003; INMETRO, 2006).

A linearidade do método foi avaliada por meio das curvas analíticas construídas por meio da padronização externa no solvente metanol grau HPLC.

De posse dos resultados obtidos provenientes das injeções cromatográficas das soluções padrões dos analitos no solvente, plotou-se as concentrações conhecidas ( $x_i$ ) contra as respostas (áreas dos picos) do sistema cromatográfico ( $y_i$ ).

Assim, construíram-se curvas de calibração que melhor representa o conjunto de pontos  $(x_i, y_i)$ , onde obteve-se, mediante o uso do método dos mínimos quadrados, a equação que fornece a melhor linha reta entre o conjunto de pontos  $(x_i, y_i)$ . Por meio do método dos mínimos quadrados, obtêm-se os valores dos parâmetros  $a$  (coeficiente angular) e  $b$  (coeficiente linear), além disso, calcula-se o coeficiente de correlação linear ( $R$ ) (SKOOG *et al.*, 2010; CHUI *et al.*, 2001).

Visando avaliar a qualidade e conseqüentemente a validade da equação de regressão linear, fez-se a análise de variância (ANOVA). Além disso, aplicou-se o teste  $t$  de Student visando avaliar a significância dos parâmetros estatísticos  $a$  e  $b$ .

Para a realização dos cálculos utilizou-se o *software* Microsoft Excel® 2010.

#### 4.2.2.1 Teste de validação da análise de regressão linear (significância da regressão)

A análise de regressão fornece um meio para a obtenção de forma objetiva da linearidade e também para especificar as incertezas associadas com o seu uso subsequente (SKOOG *et al.*, 2010).

A fim de comprovar a linearidade e a significância das curvas analíticas, o teste  $F$  foi realizado. Comparou-se o valor de  $F_{\text{calculado}}$  (Equação 8), com o valor de  $F_{\text{crítico}}$  tabelado, no nível de confiança de 95% (PIMENTEL & NETO, 1996; CHUI *et al.*, 2001; NETO *et al.*, 2010; SKOOG *et al.*, 2010).

$$F = \frac{SS_{\text{regr}}}{SS_{\text{resid}}} \quad (8)$$

Onde:

$SS_{\text{regr}}$  = soma dos quadrados da regressão;

$SS_{\text{resid}}$  = soma dos quadrados do resíduo.



A comparação é realizada baseada em duas hipóteses:  $F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{crítico}}$  e  $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{crítico}}$ .

- Se  $F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{crítico}}$ , se aceita no nível de confiança estabelecido, que  $a \neq 0$ , sendo assim a inclinação da reta da regressão não é nula, nesse caso a regressão é significativa.
- Se  $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{crítico}}$ , não há indicação de existência de relação linear entre as variáveis  $x$  e  $y$ , nesse caso não tem sentido utilizar a regressão.

#### 4.2.2.2 Teste de significância dos parâmetros de calibração

O teste de significância dos parâmetros de calibração das curvas é baseado num teste de hipótese aplicando o parâmetro  $t$  de Student. Para avaliar a significância estatística de um parâmetro foram obtidos os desvios para os coeficientes angulares e lineares das equações de regressão. O valor de  $t_{\text{calc}}$  (valor de  $t$  calculado) foi obtido da razão entre o valor de cada parâmetro e o seu respectivo desvio, de acordo com as Equações 9 e 10 (NETO; PIMENTEL; ARAÚJO, 2002; LIGIERO *et al.*, 2009).

$$t_{\text{calc},a} = \frac{a}{s_a} \quad (9)$$

$$t_{\text{calc},b} = \frac{b}{s_b} \quad (10)$$

Onde:

$a$  = coeficiente angular;

$b$  = coeficiente linear;

$s_a$  = desvio do coeficiente angular;

$s_b$  = desvio do coeficiente linear.

### 4.2.3 Validação do método de extração por SPE

Na validação do método de extração por SPE as figuras de mérito validadas foram: precisão (repetibilidade) e exatidão (ensaios de recuperação).

A validação do método de extração por SPE foi realizado somente após a otimização das condições de extração obtidas pelo planejamento fatorial.

Foram realizados nove ensaios de recuperação: em três diferentes níveis de concentração, 5 µg/L, 80 µg/L e 300 µg/L, em triplicata cada. Foram utilizados dois tipos de matriz, uma chamada de solvente puro (água Milli-Q) e outra chamada matriz ambiental (água de açude).

A precisão do método de extração, ou precisão intra-ensaio, foi avaliada em termos de recuperação dos analitos de interesse e calculada pela estimativa do coeficiente de variação (% CV).

A exatidão do método foi calculada como percentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra. A recuperação foi calculada segundo a Equação 11.

$$\text{Recuperação (\%)} = \left( \frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (11)$$

Onde:

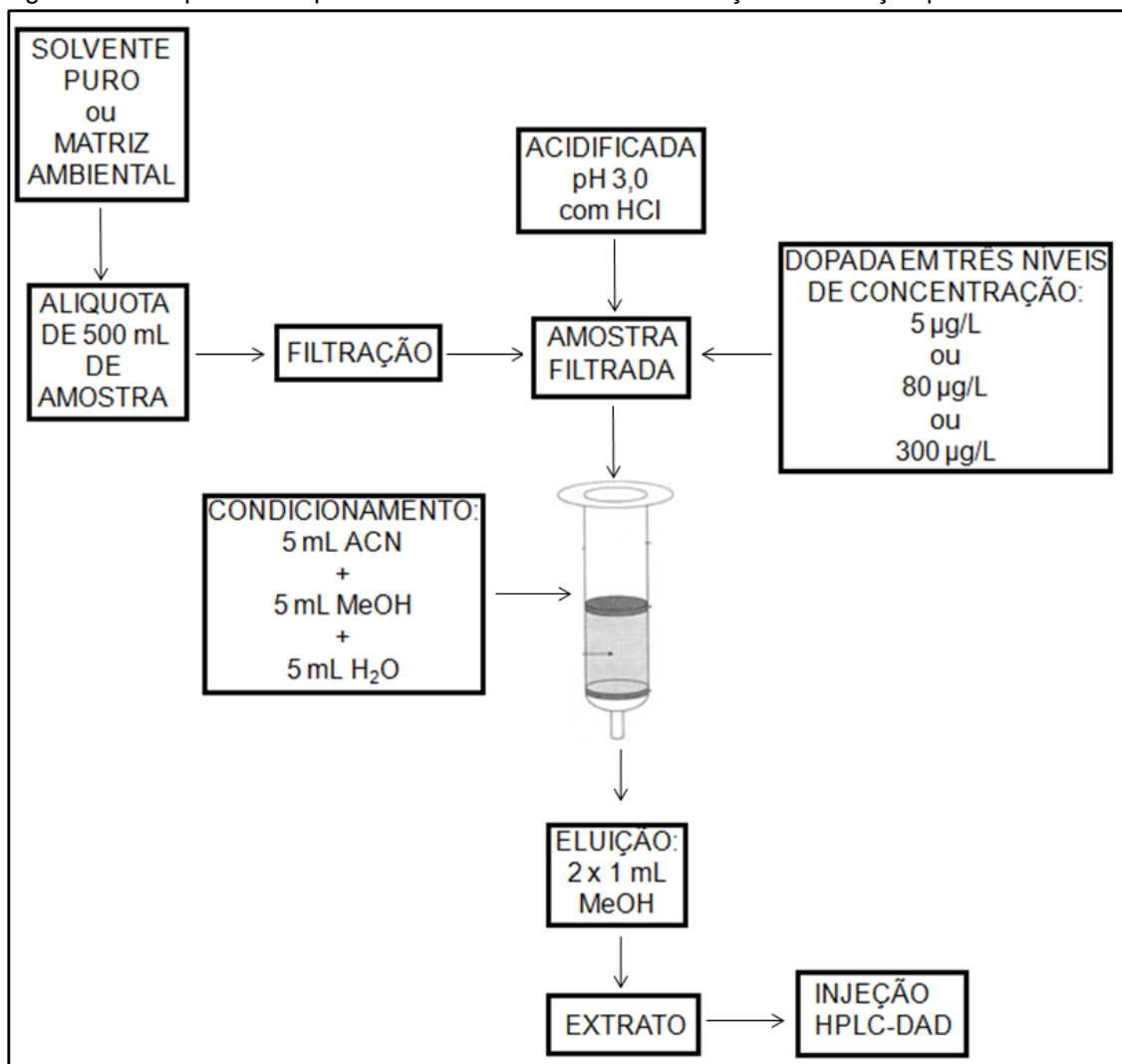
$C_1$  = concentração do analito na amostra fortificada;

$C_2$  = concentração do analito na amostra não fortificada;

$C_3$  = concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

A Figura 14 ilustra os procedimentos realizados durante a etapa de validação da extração por SPE.

Figura 14 – Esquema dos procedimentos realizados na validação da extração por SPE.



Fonte: Autora, 2014.

#### 4.2.4 Controle de qualidade aplicado no estudo dos IEs nas amostras dos açúcares estudados

A qualidade dos dados obtidos nas determinações de compostos orgânicos em matrizes ambientais pode estar comprometida quando as interferências do efeito matriz não podem ser eliminadas.

O efeito matriz é derivado principalmente dos constituintes da amostra (natural ou artificial), e como sua eliminação pode ser dispendiosa, faz-se necessário saber como ele influencia em uma análise, uma vez que a

qualidade dos dados obtidos podem estar comprometidas (CAVALCANTE *et al.*, 2012).

Nas determinações em matrizes aquosas, para compensar o efeito matriz, quando os fenômenos de supressão de matriz não podem ser eliminados, são utilizadas diferentes técnicas de calibração, como as quantificações com curvas de calibração utilizando superposição de matriz ou alterações da amostra por diluição (DUJAKOVIC *et al.*, 2010).

De acordo com Cavalcante *et al.*(2012), os parâmetros de controle de qualidade comumente utilizados para melhorar a exatidão de uma análise de contaminantes orgânicos em matrizes ambientais são as adições ou dopagens (*spikes*) de um padrão *surrogate* (compostos sintéticos, usualmente deuterados e não encontrados naturalmente no meio ambiente) e calculadas as recuperações.

Cavalcante *et al.* (2012) sugerem ainda que a recuperação de padrões de quantificação, também chamados padrões *surrogate* (PS) é usada para corrigir as perdas dos contaminantes de interesse, bem como possíveis influências dos constituintes de matrizes complexas, tais como as matrizes aquosas ambientais. Para isso deve-se corrigir a concentração do contaminante utilizando a recuperação do padrão *surrogate*, conforme Equação 12.

$$C_c = \frac{C_e \times 100}{\%R_{PS}} \quad (12)$$

Onde,  $C_c$  é a concentração corrigida do contaminante,  $C_e$  é a concentração encontrada do contaminante de interesse e  $\%R_{PS}$  é a percentagem de recuperação do padrão *surrogate* na amostra.

O controle de qualidade utilizado neste trabalho para quantificar os IEs que, possivelmente, podem estar presentes nas amostras dos açudes estudados, foi realizado de acordo com uma nova estratégia proposta no protocolo de Cavalcante *et al.* (2012).

Neste protocolo, os autores estabelecem que além do conhecimento da correlação entre o padrão *surrogate* e os contaminantes de interesse, é interessante conhecer as razões entre as extrações das substâncias estudadas

(interferentes endócrinos e padrão *surrogate*) e determinar se essas relações mudam entre matrizes simples e complexas.

Assim, foi criado o fator de relação ( $F_R$ ) entre o padrão *surrogate* e os analitos de interesse, de acordo com a equação 13:

$$F_R = \frac{\% R_A}{\% R_{PS}} \quad (13)$$

Onde,  $\%R_A$  é o percentual de recuperação do analito de interesse e  $\%R_{PS}$  é o percentual de recuperação do padrão *surrogate* (CAVALCANTE *et al.*, 2012).

A Equação 12 é aplicada quando se observa uma correlação de 1 para 1 entre o padrão *surrogate* e os contaminantes de interesse. No entanto, quando esta correlação é diferente de 1, o  $F_R$  deve ser utilizado, assegurando assim um controle de qualidade nas amostras estudadas, Equação 14.

$$C_c = \frac{C_e \times 100}{\%R_{PS}} \times \frac{1}{F_R} \quad (14)$$

Onde,  $C_c$  é a concentração corrigida do contaminante,  $C_e$  é a concentração encontrada do contaminante de interesse,  $\%R_{PS}$  é a percentagem de recuperação do padrão *surrogate* na amostra e  $F_R$  é o fator de relação entre o contaminante investigado e o padrão *surrogate* selecionado (CAVALCANTE *et al.*, 2012).

Para este estudo foi utilizada duas matrizes, uma de solvente puro (água MilliQ- ultrapura) e uma segunda, de matriz ambiental (amostra do açude Gavião). Ambas as matrizes foram dopadas com 5,0 mg/L do padrão *surrogate* estrone-2,4-d<sub>2</sub> (C/D/N ISOTOPES INC.) e em seguida foram dopadas com 100 µg/L dos analitos de interesse. Ambas as matrizes foram extraídas por SPE em triplicata e os resultados das áreas encontradas foram utilizados para os cálculos de recuperação e posteriormente calculados os valores de  $F_R$  de cada composto.

### **4.3 Terceira etapa – Análise das amostras dos açudes que abastecem a RMF**

#### **4.3.1 Descrição da área de estudo - A Região Metropolitana de Fortaleza**

A Região Metropolitana de Fortaleza (RMF), quanto a sua oficialização, foi instituída e definida por força legal (Lei Complementar Nº 14/73). No que tange à realidade socioespacial, significa dizer que sua institucionalização deu-se antes que o processo de metropolização se manifestasse. No seu início, quando de sua instalação, a RMF era constituída pelos municípios de Fortaleza, Caucaia, Maranguape, Pacatuba e Aquiraz. Os sucessivos desmembramentos ocorridos devido à emancipação de vários distritos (Eusébio, Guaiuba, Itaitinga e Maracanaú) e a agregação de outros municípios à RMF resultaram nesse conjunto que apresenta temporalidades diferenciadas bem como territórios distintos, compostos por 15 municípios. Horizonte, Pacajus, Chorozinho e São Gonçalo do Amarante, passaram a compor a Região Metropolitana, conforme a Lei nº 12.989 de 29 de dezembro de 1999, e Pindoretama e Cascavel foram incluídas em 2009 (COSTA; DANTAS, 2009). A Figura 15 ilustra o mapa com os 15 municípios incluídos na RMF.



proximidade e abrangência da Região Metropolitana de Fortaleza (RMF), região de maior densidade demográfica e principal polo econômico do Estado do Ceará (COGERH, 2010).

Dentre os açudes que compõe a Bacia Metropolitana, vale destacar os açudes Acarape do Meio, Pacajus, Pacoti, Riachão e Gavião, pois os mesmos são responsáveis pelo aporte de água bruta para o Sistema de Abastecimento da Região Metropolitana de Fortaleza.

O açude Acarape do Meio teve sua construção iniciada em 1909 sendo concluída em 1924. Inicialmente o reservatório foi propriedade do DNOCS, que posteriormente passou à responsabilidade para o município de Redenção, local onde a obra está localizada. O açude Acarape do Meio está distante cerca de 75 km de Fortaleza, situada nas coordenadas geográficas 04°11,601'S/38°47,949'W, possui uma bacia hidrográfica que cobre uma área de 210,01 km<sup>2</sup>. Atualmente está sob gerenciamento da Companhia de Gestão dos Recursos Hídricos do Ceará (COGERH), responsável por gerenciar mais de 90% das águas acumuladas no Ceará. Este corpo hídrico recebe duas contribuições de zonas urbanas (esgotos sanitário), e também duas contribuições de zonas rurais (agrotóxicos e fertilizantes). As contribuições consideradas rurais constam de sítios onde existem plantações de bananas, feijão e milho. Como zonas urbanas consideram-se as contribuições advindas das cidades de Guaramiranga e Pacoti, com sistema de esgotamento sanitário do tipo decantador digestor, além da cidade de Palmácia onde não existe sistema de tratamento de esgoto. O Açude Acarape do Meio tem como finalidade principal o abastecimento do distrito industrial de Fortaleza e dos municípios que se localizam no percurso de sua adutora. Secundariamente destina-se à irrigação de lavouras a jusante da barragem, atende à piscicultura e às culturas agrícolas nas áreas de montante (DATSENKO, 1999).

O Açude Pacajus foi construído sobre o leito do rio Choró em 1960, no município de Pacajus. Sua capacidade de armazenamento é de 240.000.000 m<sup>3</sup>. O Pacajus tem como principal finalidade reforçar a capacidade do sistema integrado dos açudes Pacoti-Riachão-Gavião, responsável pelo fornecimento de água humana e industrial de Fortaleza. O reforço se dá por meio de adução para



uma espécie de reservatório de passagem (barragem Ererê), que por sua vez transfere a água para o sistema Pacoti-Riachão-Gavião. O Açude Pacoti foi construído no leito do Rio Pacoti nos municípios de Horizonte e Itaitinga, suas obras foram realizadas pelo Governo do Estado do Ceará sendo concluídas em 1981 e sua capacidade de armazenamento é de 380.000.000 m<sup>3</sup>. Apesar de a construção ser relativamente recente, o mesmo apresenta características do processo de eutrofização, diagnosticado através de análises laboratoriais. O Pacoti faz parte do sistema integrado dos açudes Pacoti-Riachão-Gavião, e seu papel no sistema é o de somar e manter o estoque da quantidade hídrica suficiente para atender às demandas da região Metropolitana (COGERH, 2010a).

O Açude Riachão é um lago artificial localizado no município de Itaitinga, Região Metropolitana de Fortaleza, represa o rio Pacoti e seu reservatório tem capacidade para armazenar 46 milhões de metros cúbicos de água. O açude recebe a água proveniente do açude Pacoti através de canal, que transfere para o açude Gavião através de um túnel de 1.750,00 m e de um canal de 4.700,00 m de extensão, funcionando assim como uma espécie de reservatório de passagem. O Açude Gavião é um açude localizado nos municípios cearenses de Pacatuba e Itaitinga, foi construído para complementar a rede de abastecimento de água potável para a cidade de Fortaleza. A barragem deste açude barra as águas do rio Cocó, bem como dos seguintes riachos afluentes do rio Cocó: Água Fria, Alegrete, Gavião, Pacatuba e Salgado. Construído pela União, teve sua construção concluída em 1973. Seu reservatório tem capacidade para armazenar 32.900 milhões de metros cúbicos de água, a estação de tratamento de água (ETA - Gavião) localiza-se ao lado da barragem deste açude (COGERH, 2010a).

A Figura 16 apresenta as características dos reservatórios da Região Metropolitana desde a última atualização em 30 de dezembro de 2013.

Figura 16 – Características dos reservatórios da Região Metropolitana.

Açude	Município	Dia/Hora	Capacidade (hm <sup>3</sup> )	Cota (m)	Volume (hm <sup>3</sup> )	Volume (%)
ACARAPE DO MEIO	Redenção	30/12/2013 7:00:00	29.59	116.81	6.46	21.83
PACAJUS	Pacajus	30/12/2013 7:00:00	240.00	30.64	44.57	18.57
PACOTI	Horizonte	30/12/2013 7:00:00	380.00	38.14	132.99	35
GAVIÃO	Pacatuba	30/12/2013 7:00:00	33.30	35.58	30.61	91.93
ARACOIABA	Aracoiaba	30/12/2013 7:00:00	170.70	85.47	51.78	30.34
RIACHÃO	Itaitinga	30/12/2013 7:00:00	46.95	38.14	18.26	38.89
SITIOS NOVOS	Caucaia	30/12/2013 7:00:00	126.00	37.67	25.11	19.93
<b>Total</b>			<b>16298.64</b>		<b>4879</b>	<b>29.94</b>

Fonte: COGERH (2013).

Através de levantamentos de dados de impactos ambientais e usos realizados *in loco* nas bacias hidrográficas e hidráulicas dos reservatórios do estado do Ceará no ano de 2007 e posterior elaboração da Matriz de Impactos Ambientais e Usos dos Recursos Hídricos, a COGERH constatou que os açudes Acarape do Meio, Pacoti, Riachão, Pacajus e Gavião, localizados na Bacia Hidrográfica Metropolitana, apresentam diversos tipos de fontes de poluição, assim relacionados (COGERH, 2013b):

- Esgoto Doméstico, Industrial, Hospitalar;
- Lavagem de Roupa e Carro;
- Balneário;
- Banho;

- Usos de Agrotóxicos e Fertilizantes;
- Aterro Sanitário;
- Lixão, Matadouro e Cemitério;
- Currais e Animais Soltos;
- Efluentes ETA e ETE;
- Indústria Alimentícia, Couro e Curtume, Têxtil e Olarias.

Quanto aos usos dados aos recursos hídricos, os açudes Pacoti, Riachão, Gavião, Acarape do Meio e Pacajus são utilizados como (COGERH, 2013b):

- Dessedentação animal;
- Usos domésticos locais;
- Recreação de contato primário e secundário;
- Irrigação;
- Pesca artesanal;
- Piscicultura intensiva de gaiola e viveiro;
- Indústria;
- Balneário;
- Agricultura de vazante.

#### **4.3.3 Sistema de abastecimento da Região Metropolitana de Fortaleza**

O sistema de abastecimento de água da RMF (FIGURA 17) inicia-se no açude Orós localizado na bacia do rio Jaguaribe, com capacidade de armazenamento de 1,94 bilhões de metros cúbicos de água. Após serem

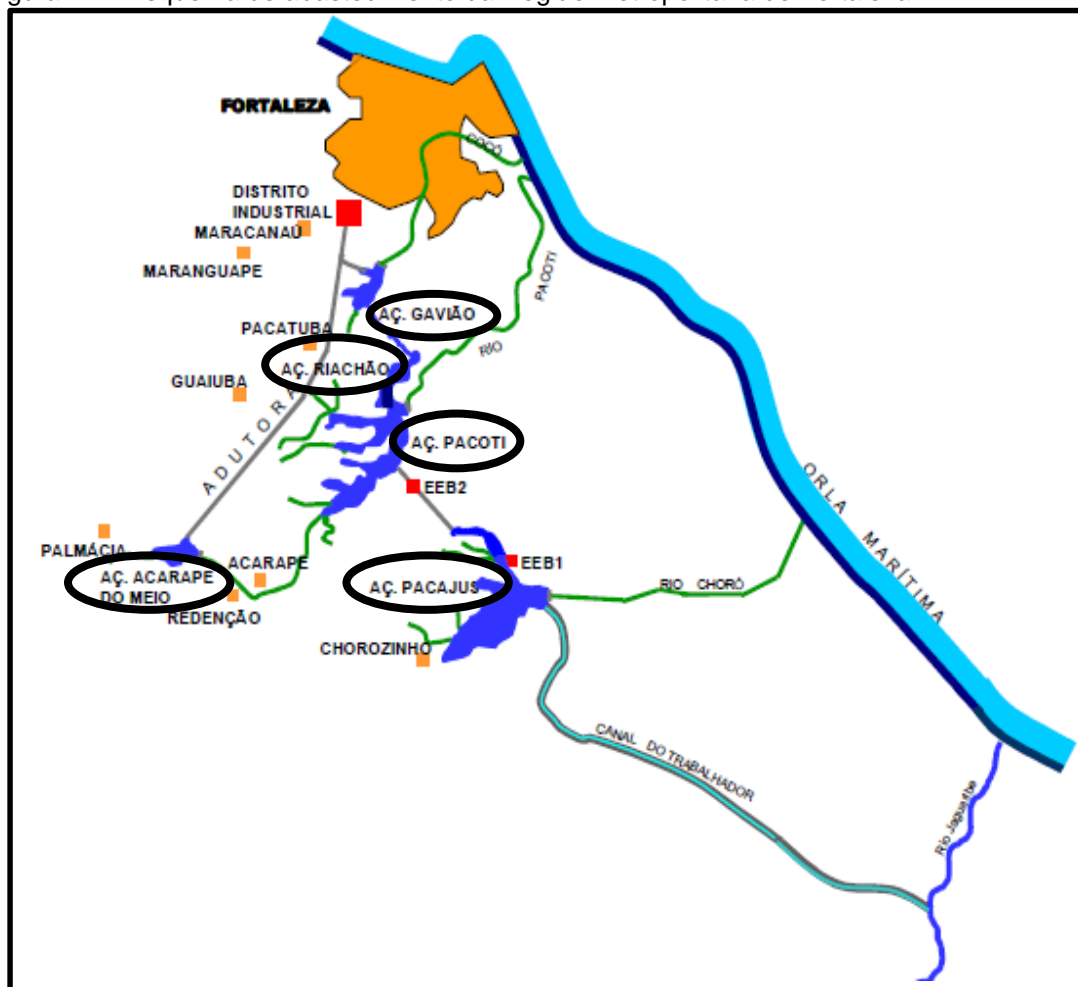
lançadas no rio Jaguaribe, as águas do açude Orós percorrem 280 km até sua captação por um barramento de captação próximo a cidade de Itaiçaba. Daí a água é bombeada para o canal do trabalhador através de uma estação de bombeamento (EB-Itaiçaba), com capacidade nominal de 6,0 m<sup>3</sup>/s. Após percorrer 1156 km de extensão deste canal de transposição, as águas são lançadas no açude Pacajus. Este reservatório possui capacidade para acumular 240 milhões de metros cúbicos e regularizar 2,1 m<sup>3</sup>/s com 90% de garantia.

Do açude Pacajus a água é bombeada através de uma segunda estação de bombeamento (EEB-1) para o açude Ererê, alimentando o canal de mesmo nome com 4,0 km de extensão. No final deste canal, há uma terceira estação de bombeamento (EEB-2), no canal do Pacoti, com 8,0 km de extensão, alimentando o açude de mesmo nome, com capacidade de acumulação de 380 milhões de metros cúbicos e regularizar uma vazão de 2,9 m<sup>3</sup>/s com 90% de garantia. Nos anos de boa acumulação do sistema, as águas deste reservatório são transferidas para o açude Riachão por gravidade, no entanto, em períodos de poucas chuvas, a transferência entre estes dois reservatórios é realizada por um sistema auxiliar de bombeamento com capacidade para 10 m<sup>3</sup>/s.

Após o bombeamento, as água percorrem o canal Pacoti-Riachão antes de atingirem o açude Riachão, com capacidade de acumular 47 milhões de metros cúbicos e regularizar uma vazão de 0,7 m<sup>3</sup>/s com 90% de garantia. Deste reservatório a água é transferida para o açude Gavião através de um túnel-canais (Riachão-Gavião). Este reservatório é mantido cheio o ano inteiro e possui uma capacidade de acumulação de 30 milhões de metros cúbicos.

A Estação de Tratamento de água (ETA-Gavião), localizada junto a este reservatório, é responsável pelo tratamento da água que abastece as cidades de Fortaleza, Maracanaú, Caucaia, Maranguape, Pacatuba e Guaiuba. Quando o açude Acarape do Meio está com sua capacidade de acumulação comprometida, o açude Gavião também abastece o Distrito Industrial de Maracanaú com água bruta, através da estação de bombeamento do Gavião (VIANA e FILHO,1999).

Figura 17 – Esquema de abastecimento da Região Metropolitana de Fortaleza.



Fonte: Adaptado de COGERH (2013 a).

No presente trabalho foram selecionados pontos de amostragem nos açudes Acarape do Meio, Pacoti, canal Pacoti-Riachão, Riachão, canal Riachão-Gavião e Gavião. Não se objetivou fazer o monitoramento dos compostos endócrinos nestes açudes, apenas aplicar o método desenvolvido na análise e quantificação dos mesmos nos pontos amostrados.

#### **4.3.4 Aplicação do método analítico nas amostras coletadas dos açudes**

Devido às baixas concentrações dos compostos de interesse encontrados em ambientes aquáticos naturais, foram adotados procedimentos para reduzir contaminações originadas durante as etapas de amostragem, preservação e pré-tratamento.

Além disso, o manuseio e as etapas de preparo de amostra, incluindo filtração, extração e concentração dos analitos, foram realizados tomando todos os cuidados a fim de evitar qualquer tipo de contaminação.

#### *4.3.4.1 Amostragem*

Foi utilizada a estrutura operacional da COGERH para a realização das atividades de campo. O transporte entre os pontos de amostragem era feito com barco a motor e as coletas realizadas utilizando frascos de vidro âmbar previamente descontaminados com ácido nítrico e acetona, identificados e acondicionados em isopor com gelo para serem transportados até o laboratório e armazenados sob refrigeração a 4°C, para posterior extração e análise.

As amostragens foram realizadas na época de estiagem e sempre no período da manhã, entre 8:00 h e 11:30 h. Os frascos eram mergulhados a uma profundidade máxima de 30,0 cm.

Na Tabela 14 são apresentadas as características de cada ponto de amostragem. A escolha de cada ponto de amostragem levou em consideração a logística de coleta adotada pela COGERH que já realiza o monitoramento dos pontos estudados a mais de 10 anos.

Tabela 14 – Identificação e localização dos pontos amostrados para análise dos interferentes endócrinos.

Ponto de Amostragem	Coordenada UTM <sup>1</sup>	Açude	Identificação	Dia amostrado
ACA-09	522254/ 9536480	Acarape do Meio	Próximo ao ponto de captação (adutora)	04/12/2013
PCT-18	559492/ 9526438	Pacoti	Próximo a parede do açude	05/09/2013
CPR-01	550129/ 9554718	Canal Pacoti-Riachão	Canal que interliga o Pacoti e Riachão	05/09/2013
RIA-10	552560/ 9557868	Riachão	Próximo a parede do açude	05/09/2013
CRG-01	551390/ 9559590	Canal Riachão-Gavião	Canal onde está localizada a elevatória do Gavião	05/09/2013
GAV-05	549141/ 9568116	Gavião	Próximo a parede do açude, ETA	11/09/2013 e 03/12/2013
GAV-08	549011/ 9566934	Gavião	Ponto central	11/09/2013 e 03/12/2013
GAV-14	548241/ 9565728	Gavião	Meio do açude	11/09/2013 e 03/12/2013
GAV-15	547286/ 9564822	Gavião	Nascente do Rio Cocó	11/09/2013 e 03/12/2013
GAV-16	547388/ 9567954	Gavião	Plataforma de bombeamento	11/09/2013 e 03/12/2013

Fonte: Autora, 2014.

UTM<sup>1</sup> - (Universal Transversa de Mercator).

Os pontos amostrados no açude Gavião foram coletados duas vezes durante a pesquisa, o que totalizou 15 amostras analisadas.

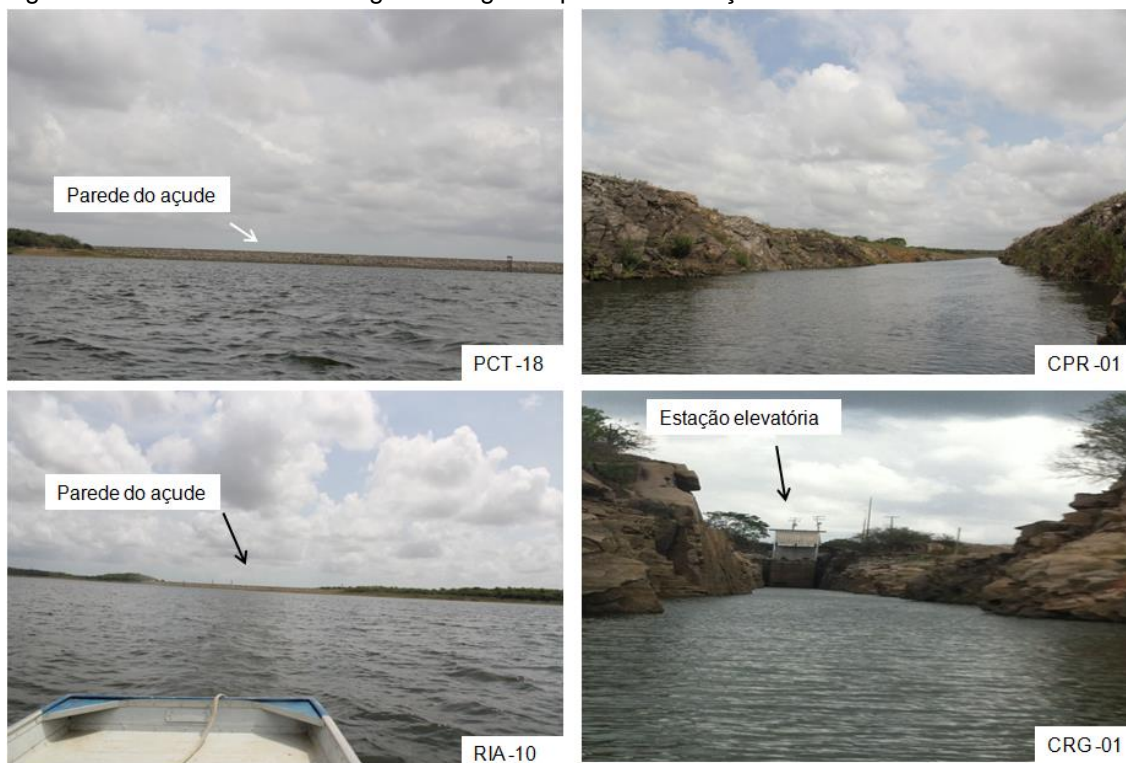
As Figuras 18, 19 e 20 representam os pontos amostrados nos respectivos açudes.

Figura 18 – Vista aérea do ponto de amostragem de água superficial do açude Acarape do Meio.



Fonte: Adaptado o *Google earth*, 2014.

Figura 19 – Pontos de amostragem de água superficial dos açudes estudados.



Fonte: Autora, 2014.



Figura 20 – Vista aérea dos pontos de amostragem de água superficial do açude Gavião.



Fonte: Adaptado o *Google earth*, 2014.

As metodologias aplicadas para as análises físico-químicas das amostras encontram-se descritas na Tabela 15. Os parâmetros analisados com a sonda multiparamétrica (MODELO YSI 6600V2), pertencente a COGERH (Figura 21), foram realizados *in situ*. As demais análises foram realizadas no Laboratório de Química Ambiental da UFC (Universidade Federal do Ceará) e CAGECE (Companhia de Água e Esgoto do Ceará).

Tabela 15 - Metodologia utilizada para as análises físico-químicas.

Parâmetro	Método analítico
Temperatura (°C)	Sonda multiparamétrica (MODELO YSI 6600V2).
Condutividade (mS/cm)	Sonda multiparamétrica (MODELO YSI 6600V2).
Oxigênio dissolvido (mg/L)	Sonda multiparamétrica (MODELO YSI 6600V2).
Turbidez (UNT)	Nefelométrico (2130B) – APHA, 2012.
pH	Eletrométrico (4500-H+B) – APHA, 2012.
Cor verdadeira (mg Pt/L)	Método de comparação visual (2120B) - APHA, 2012.
Cloreto (mg Cl <sup>-</sup> /L)	Argentimétrico (4500-Cl-B) - APHA, 2012.
Ferro (mg Fe/L)	Fenantrolina (3500-Fe-B) - APHA, 2012.
Sólidos dissolvidos totais (mg/L)	Gravimetria (2540 D) e Cálculo - APHA, 2012.
Sólidos totais (mg/L)	Gravimetria (2540 B) - APHA, 2012.
Sulfato (mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /L)	Turbidimetria – (4500- SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> E) - APHA, 2012.
Nitrogênio total (mg N/L)	Redução do cádmio (4500-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> E) – APHA, 1998.
Fósforo total (mg P/L)	Ácido ascórbico (4500-P E) – APHA, 1998.
Ortofosfato (mg P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L)	Ácido ascórbico (4500-P E) – APHA, 1998.
Clorofila a (µg/L)	Espectrofotométrico (10200 H) – APHA, 1998.
DBO (mg O <sub>2</sub> /L)	Iodometria (5210 B) – APHA, 2012.
<i>Escherichia coli</i> (NMP/100 mL)	Substrato enzimático (9223 B 2b) – APHA, 2012.

Fonte: Autora, 2014.

Figura 21 - Sonda multiparamétrica utilizada na análise de alguns parâmetros físico-químicos.

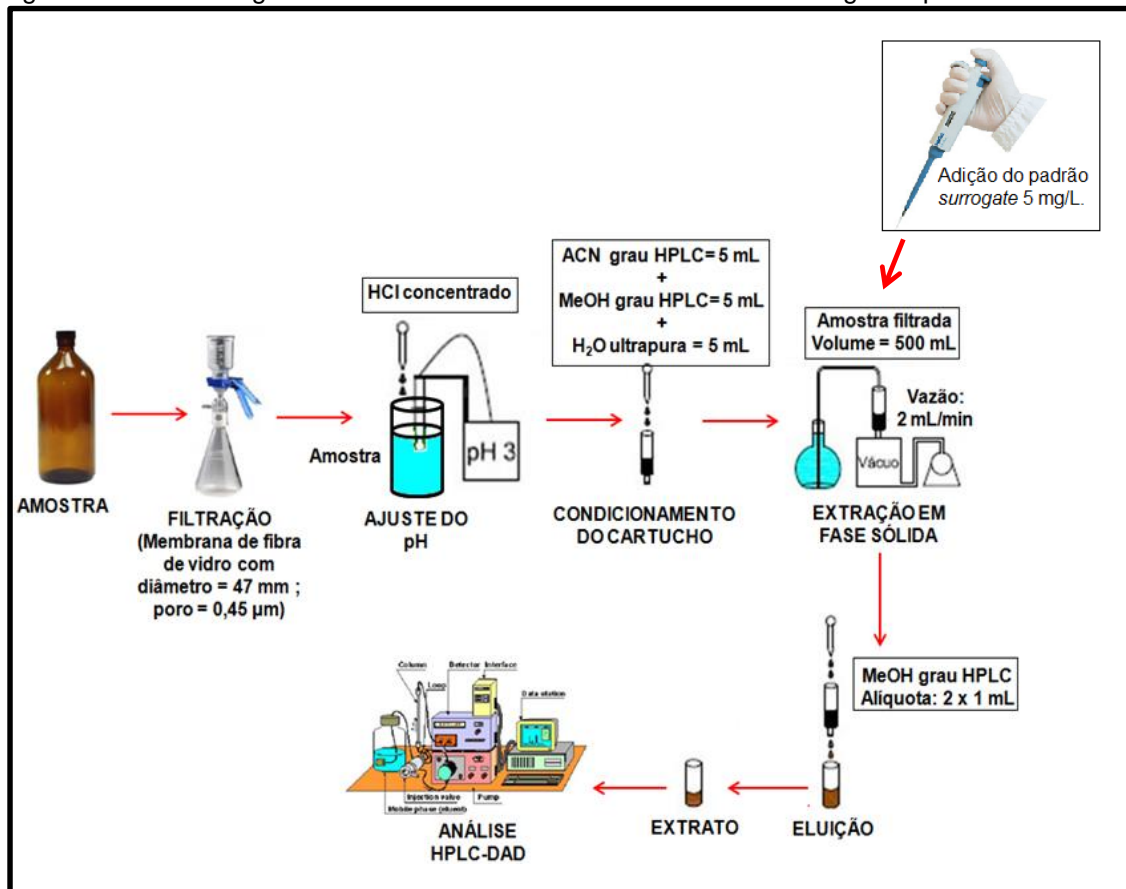


Fonte: Autora, 2014.

#### 4.3.4.2 *Análise dos compostos endócrinos nas amostras estudadas*

Após a coleta, as amostras eram armazenadas sob refrigeração a 4°C, para posterior extração e análise. O padrão *surrogate* estrone-2,4-d<sub>2</sub> numa concentração de 5,0 mg/L foi adicionado em cada amostra antes do processo de extração. Os procedimentos adotados para a análise dos compostos de interesse nas amostras de água superficial coletadas são apresentados na Figura 22.

Figura 22 – Metodologia adotada na análise dos IEs nas amostras de água superficial.



Fonte: Autora, 2014.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos foram discutidos em relação as etapas envolvendo o desenvolvimento e otimização do método analítico; validação do método; e análise das amostras dos açúdes.

### 5.1 Desenvolvimento e otimização das condições cromatográficas

Na etapa do método analítico foram otimizadas as melhores condições cromatográficas e de extração por SPE para a determinação simultânea dos cinco compostos endócrinos escolhidos para serem analisados em águas superficiais.

Para avaliar a eficiência da separação cromatográfica dos compostos, foram testados diversos parâmetros experimentais tais como: (composição, pH e fluxo da fase móvel, tipo de eluição e temperatura do forno da coluna) utilizando uma solução de mistura de padrão em metanol de concentração 5,0 mg/L dos compostos.

Durante a realização da separação cromatográfica foram testadas como fase móvel (FM) tanto a mistura metanol (MeOH):água (Milli-Q) como acetonitrila (ACN):água (Milli-Q). Neste estudo observou-se que os compostos cafeína e ciprofloxacina apresentaram coeluição quando se utilizou mistura MeOH:H<sub>2</sub>O em condição isocrática de 70% de MeOH. Dessa forma, a FM formada de MeOH:água foi descartada dos experimentos posteriores.

Nas análises utilizando FM ACN:H<sub>2</sub>O (acetonitrila:água), foram testados a eluição isocrática e por gradiente. Na eluição isocrática foram feitos três teste: (1) Corrida com 30% de ACN e 70% de H<sub>2</sub>O; (2) Corrida com 60% de ACN e 40% de H<sub>2</sub>O; e (3) Corrida com 90% de ACN e 10% de H<sub>2</sub>O. Todas as três corridas foram realizadas utilizando um fluxo de 0,8 mL/min, a temperatura do forno foi mantida em temperatura ambiente ( $28 \pm 2$  °C) e o tempo de corrida foi de 45 minutos. Na eluição isocrática os compostos cafeína e ciprofloxacina também se apresentaram coeluidos, dessa forma partiu-se para os testes de eluição por gradiente.

Foram testados 11 gradientes de eluição com FM ACN:H<sub>2</sub>O, onde a percentagem de ACN variou de 10 a 100%. Os tempos de análise variaram entre 12 e 42 minutos, o fluxo da FM variou de 0,8 a 2,0 mL/min e a temperatura do forno variou entre 28 e 40°C.

A Tabela 16 apresenta o programa de gradiente de eluição escolhido no desenvolvimento do método. Neste gradiente, há o aumento de 10 até 50% de ACN em 10 minutos. Em seguida, durante 7 minutos, essa proporção aumentou para 100% de ACN, retornando a 10% de ACN em 8 minutos, totalizando 25 minutos de corrida cromatográfica. O fluxo inicial foi de 1,0 mL/min e após 10 minutos de corrida o fluxo foi aumentado para 2,0 mL/min, a temperatura do forno foi mantida a temperatura ambiente ( $28 \pm 2$  °C).

Tabela 16 - Gradiente de eluição do método empregado para análise dos 5 compostos de interesse.

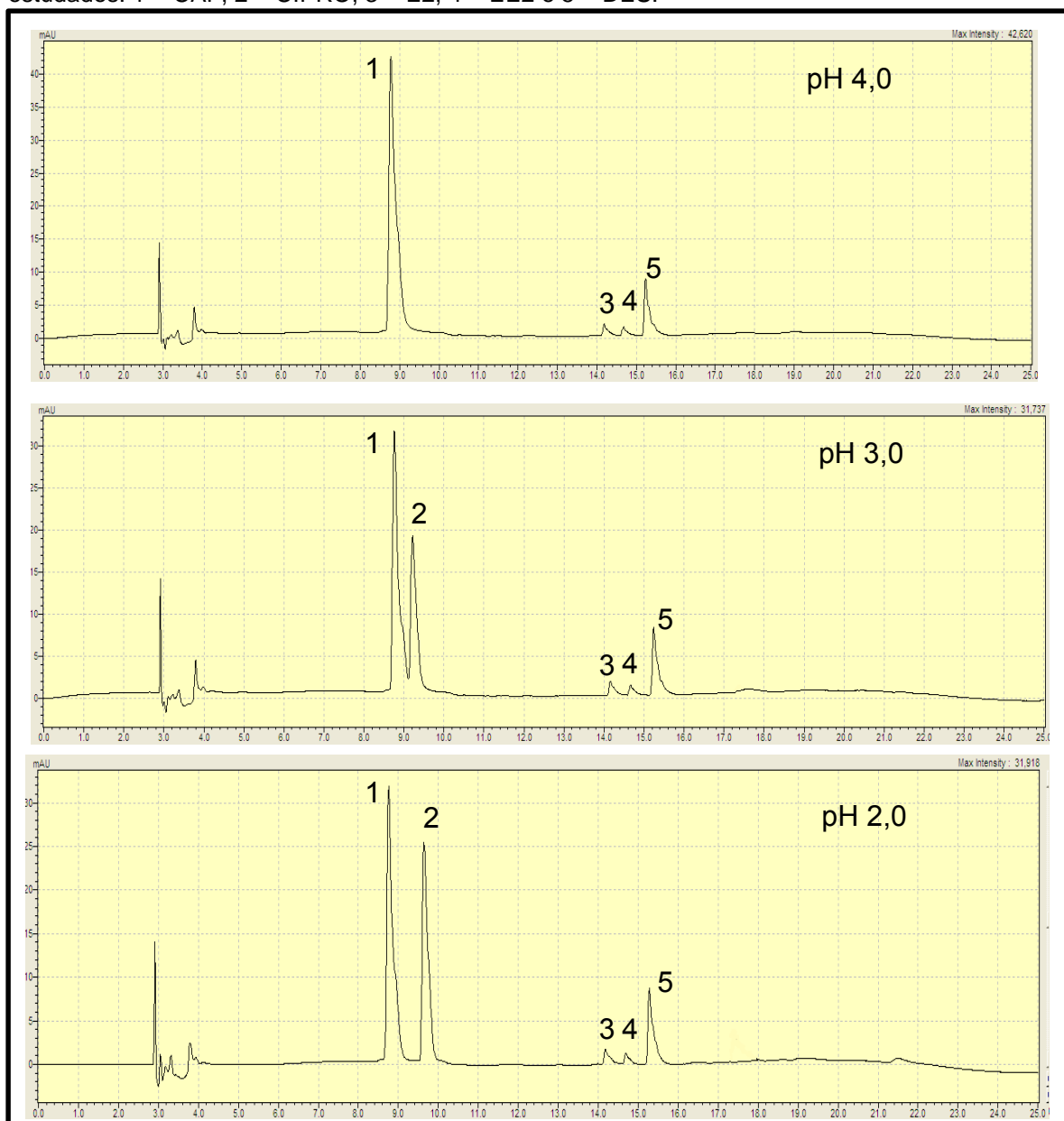
<b>Tempo (min)</b>	<b>ACN (% v/v)</b>	<b>H<sub>2</sub>O (% v/v)</b>	<b>Fluxo (mL/min)</b>
0	10	90	1,0
10	50	50	1,0
10,5	50	50	2,0
17	100	10	2,0
19	10	90	1,0
25 (Final)	10	90	1,0

Fonte: Autora, 2013.

No estudo da influência da temperatura do forno da coluna, não foi observada nenhuma variação significativa na resolução dos picos e nem nos tempos de retenção dos compostos na temperatura de 40°C, sendo assim escolheu-se trabalhar em temperatura ambiente ( $28 \pm 2$  °C).

Também foi estudada a influência do pH da fase móvel, onde a água ultrapura (Milli-Q) foi acidificada com HCl concentrado nos valores de pH 2, 3 e 4. O pH da água ultrapura, antes da acidificação, encontrava-se em torno de pH 6,0. A Figura 23 apresenta os cromatogramas obtidos nos diferentes valores de pH testados.

Figura 23 – Cromatogramas dos compostos padrão nos diferentes valores de pH da fase móvel estudados. 1 = CAF, 2 = CIPRO, 3 = E2, 4 = EE2 e 5 = DES.



Fonte: Autora, 2013.

De acordo com os cromatogramas mostrados na Figura 23, observa-se que a resolução cromatográfica dos componentes 1 e 2 é fortemente dependente do pH da fase móvel, ao passo que os componentes 3, 4 e 5 não dependem do pH. Na separação cromatográfica em pH 4 há coeluição entre os picos 1 e 2. Em pH 3 pode-se observar boa resolução dos picos, no entanto os picos 1 e 2 ainda não foram totalmente separados. E, finalmente, em pH 2 esses

picos encontram-se totalmente separados. Observa-se também que o pH não influenciou nos tempos de retenção de nenhum dos compostos, e nem na separação dos compostos 3, 4 e 5.

Os compostos estudados (CAF, CIPRO, E2, EE2 e DES) apresentam caráter levemente básico, uma vez que seus valores de  $pK_a$  variam entre 6,18 – 10,7 (Tabela 1). Dessa forma, provavelmente, o meio ácido (pH 2) tenha proporcionado maior ionização dos compostos na fase móvel, o que pode ter influenciado a melhor separação dos picos 1 e 2 decorrente da interação com a fase estacionária da coluna

Conforme relatam Petrovic *et al.* (2005) os poluentes orgânicos emergentes com características ácidas ou básicas, necessitam do ajuste do pH da fase móvel, onde seu valor depende do  $pK_a$  dos compostos a serem analisados. No seu estudo de fármacos de diferentes classes terapêuticas, Castiglioni *et al.* (2005) também utilizaram modo de separação por gradiente e fase móvel composta por acetonitrila e água acidificada com ácido fórmico (pH 2,0).

A ordem de eluição dos compostos foi obtida injetando-se padrões individuais de cada um dos compostos estudados numa concentração de 10 mg/L utilizando o gradiente de concentração escolhido em pH 2. A Tabela 17 apresenta os tempos de retenção de cada composto de acordo com os cromatogramas apresentados na Figura 23.

Tabela 17 - Tempo de retenção ( $T_R$ ) dos cinco compostos de acordo.

Pico	Composto	$T_R$ (min)
1	Cafeína (CAF)	6,87
2	Ciprofloxacina (CIPRO)	7,59
3	17 $\beta$ – Estradiol (E2)	12,85
4	17 $\alpha$ – Etinilestradiol (EE2)	13,21
5	Dietilestilbestrol (DES)	13,64

Fonte: Autora, 2013.

A ordem de eluição observada relaciona-se com o grau de hidrofobicidade dos compostos, justificada pelos valores de  $\log K_{ow}$  (Tabela 1). Até os nove primeiros minutos de corrida, a FM apresenta uma maior concentração de água, assim a cafeína (pico 1) e a ciprofloxacina (pico 2),



compostos de caráter mais polar, apresentam menor interação com a fase estacionária da coluna cromatográfica (octadecilsilano – C-18). A partir dos dez minutos de corrida, a FM apresenta maior concentração de metanol, e os compostos E2 (pico 3), EE2 (pico 4) e DES (pico 5), mais apolares, apresentam maior interação com a fase estacionária da coluna, portanto sendo mais retidos.

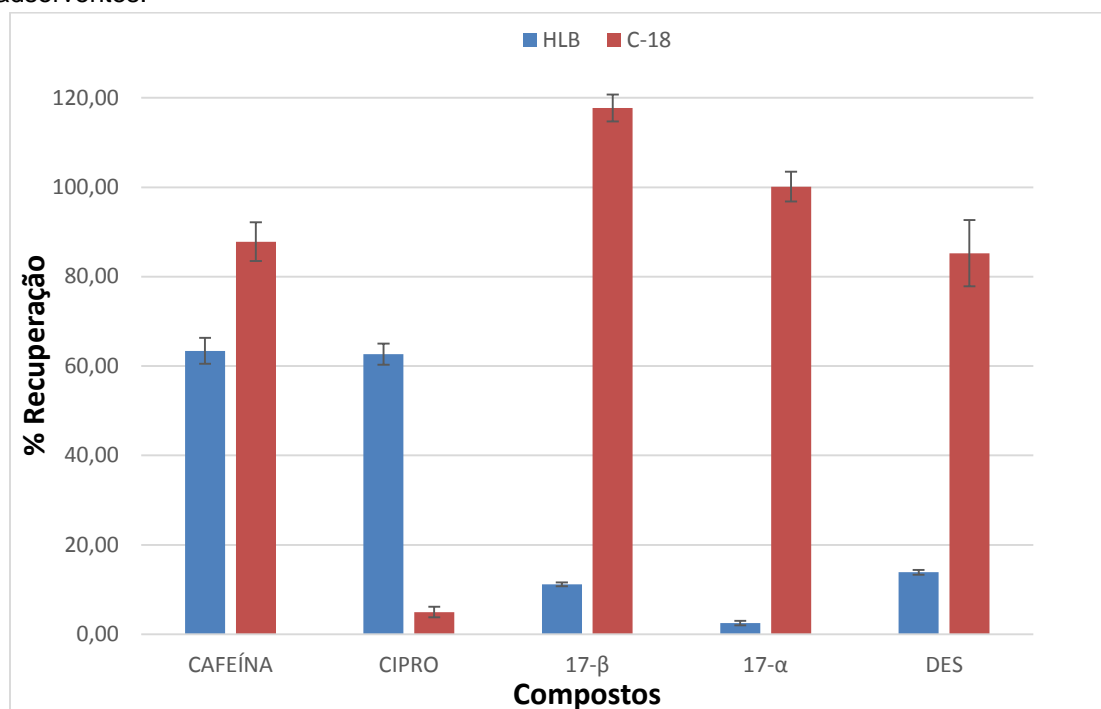
## **5.2 Otimização do método de extração em fase sólida (SPE)**

Os estudos para avaliar a eficiência o tipo de material adsorvente na recuperação (%) dos compostos de interesse foram realizados utilizando cartuchos HyperSep C-18 (Thermo Scientific) e HLB (Oasis) de 500 mg/6mL cada.

Um volume de 500 mL de amostra numa concentração de 50 µg/L dos compostos foi percolado nos cartuchos C-18 e HLB previamente condicionados com 5,0 mL de ACN 100%, seguidos de 5,0 mL de MeOH 100% e mais 5,0 mL de água ultrapura. Os compostos de interesse retidos foram eluídos com 2,0 mL de MeOH 100% e os extratos analisados por HPLC-DAD.

Os resultados de comparação das recuperações entre os dois materiais adsorventes utilizados na SPE podem ser visualizados na Figura 24 e na Tabela 18.

Figura 24 – Eficiência de recuperação (%) dos cinco compostos na avaliação dos materiais adsorventes.



Fonte: Autora, 2013.

Tabela 18 - Eficiência de recuperação dos cinco compostos na avaliação dos materiais adsorventes, (n = 4).

Composto / Cartucho	Recuperação (%)	DP	CV (%)
<b>C-18</b>			
CAF	87,83	± 4,31	4,90
CIPRO	4,96	± 1,19	24,08
E2	117,76	± 3,00	2,18
EE2	100,14	± 3,31	3,31
DES	85,25	± 7,43	8,72
<b>HLB</b>			
CAF	63,39	± 2,91	4,59
CIPRO	62,63	± 2,37	3,78
E2	11,45	± 0,41	3,59
EE2	2,52	± 0,49	19,35
DES	13,87	± 0,55	3,93

Fonte: Autora, 2013.

Conforme os resultados obtidos em termos de recuperação, observa-se que há uma diferença marcante entre os dois cartuchos para todos os compostos estudados.

O cartucho C-18 apresentou maior eficiência de recuperação para os compostos CAF, E2, EE2 e DES. No entanto, o cartucho HLB apresentou maior eficiência de recuperação para o composto CIPRO.

Segundo a *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)* (1998), o valor aceitável de recuperação dependerá do percentual de analito que foi adicionado em relação à amostra como um todo. A concentração adicionada à amostra em estudo foi de 50 µg/L, o que resulta em uma faixa de recuperação aceitável de 60 a 115%, conforme exposto na Tabela 7. No entanto, apenas a cafeína (CAF) apresentou eficiência de recuperação satisfatória para os dois materiais adsorventes estudados.

A seguir são apresentados os resultados obtidos pelo planejamento fatorial para a otimização das condições de extração dos compostos por SPE. Os resultados obtidos para a escolha do material adsorvente foram concordantes com os anteriormente apresentados.

### **5.2.1 Planejamento fatorial para SPE**

A matriz dos experimentos e os vetores de resposta (valores médios das áreas dos picos cromatográficos) obtidos pelo planejamento fatorial ( $2^4$ ), na primeira fase do planejamento, com os 16 ensaios (quatro fatores em dois níveis) são apresentados na Tabela 19.

Os resultados obtidos para avaliar o melhor cartucho de extração na primeira fase do planejamento são mostrados nos gráficos de interação para cada um dos compostos estudados nas Figuras 25, 26 e 27.

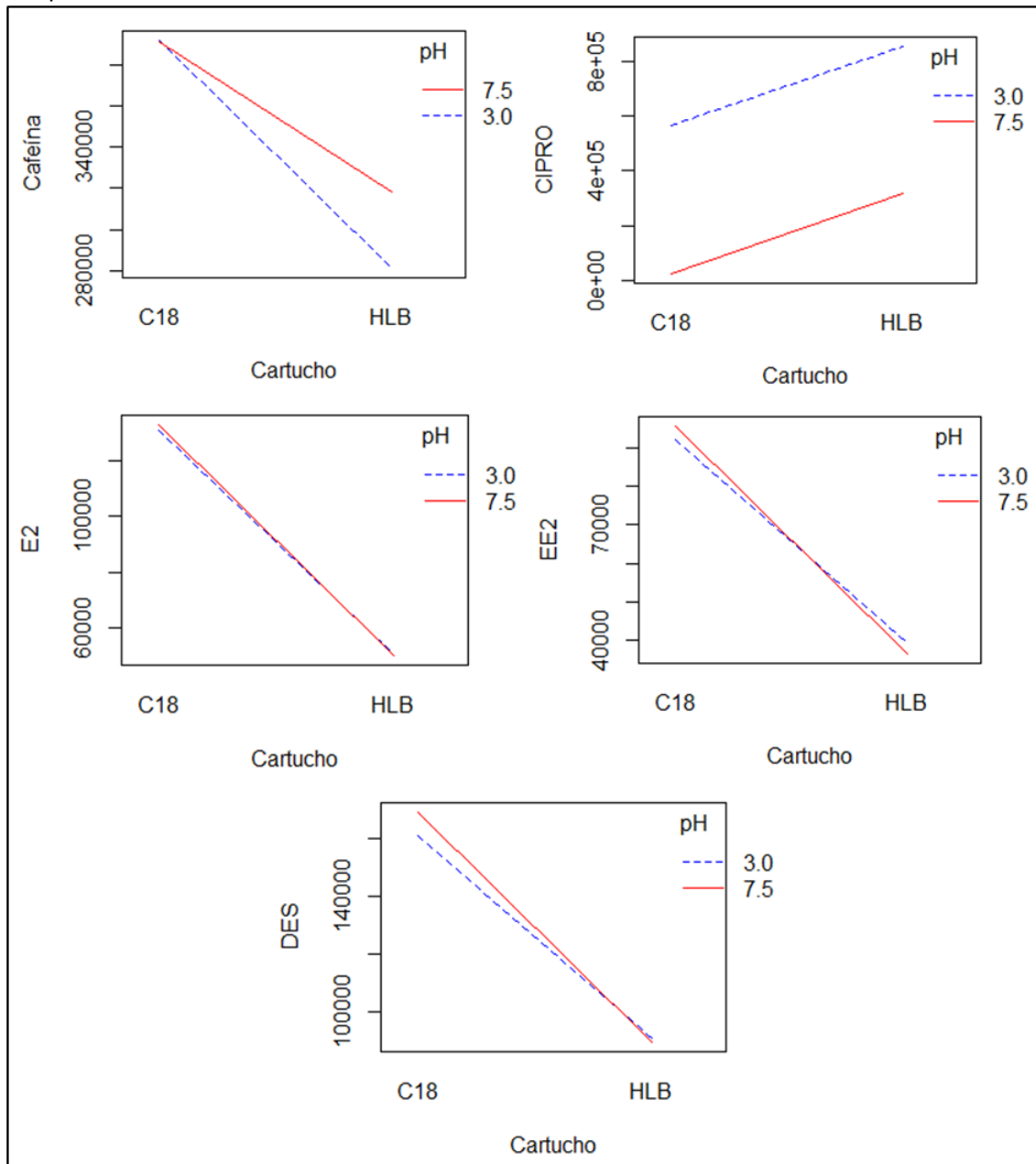
Nos gráficos de interação as melhores respostas são indicadas pelas retas e a inclinação a qual indica o nível de significância, onde o ponto mais alto reflete a maior resposta (área do pico).

Tabela 19 – Matriz para o planejamento fatorial (2<sup>4</sup>) e áreas dos picos cromatográficos (referente aos compostos estudados) obtidos para o método de extração dos compostos de interesse por SPE e análise por HPLC-DAD.

Ensaio	Cartucho	Vol. Eluente, mL	pH	Vol. Amostra, mL	CAF	CIPRO	E2	EE2	DES
1	C-18	2	7,5	250	351453,0	7012,300	107957,0	76303,13	144321,4
2	C-18	2	3,0	250	390564,3	544021,4	128317,0	85239,93	156459,7
3	C-18	4	7,5	250	166395,1	15971,28	52169,48	38533,15	70985,05
4	C-18	4	3,0	250	175510,5	119077,7	56336,33	38675,68	71249,30
5	C-18	2	7,5	500	701958,0	51619,33	268987,1	187731,4	324042,1
6	C-18	2	3,0	500	682803,2	726444,9	222467,1	155919,2	253548,1
7	C-18	4	7,5	500	344309,1	21980,58	101618,7	79884,48	137351,4
8	C-18	4	3,0	500	317758,6	873604,4	114562,1	88193,20	162868,4
9	HLB	2	3,0	250	206602,9	696633,6	20477,75	22952,45	47201,63
10	HLB	2	7,5	250	197973,7	146596,6	13531,43	14600,03	36160,30
11	HLB	4	3,0	250	193838,1	1254616	59283,85	15676,23	93470,40
12	HLB	4	7,5	250	194945,0	260483,5	53161,23	40290,70	86501,33
13	HLB	2	7,5	500	506662,5	651477,1	21943,83	5462,025	53331,70
14	HLB	2	3,0	500	380395,6	1278820	38948,18	56975,43	81393,98
15	HLB	4	3,0	500	344698,7	188211,8	84866,45	61819,08	142192,1
16	HLB	4	7,5	500	373986,3	202579,9	112993,7	86049,38	182719,5

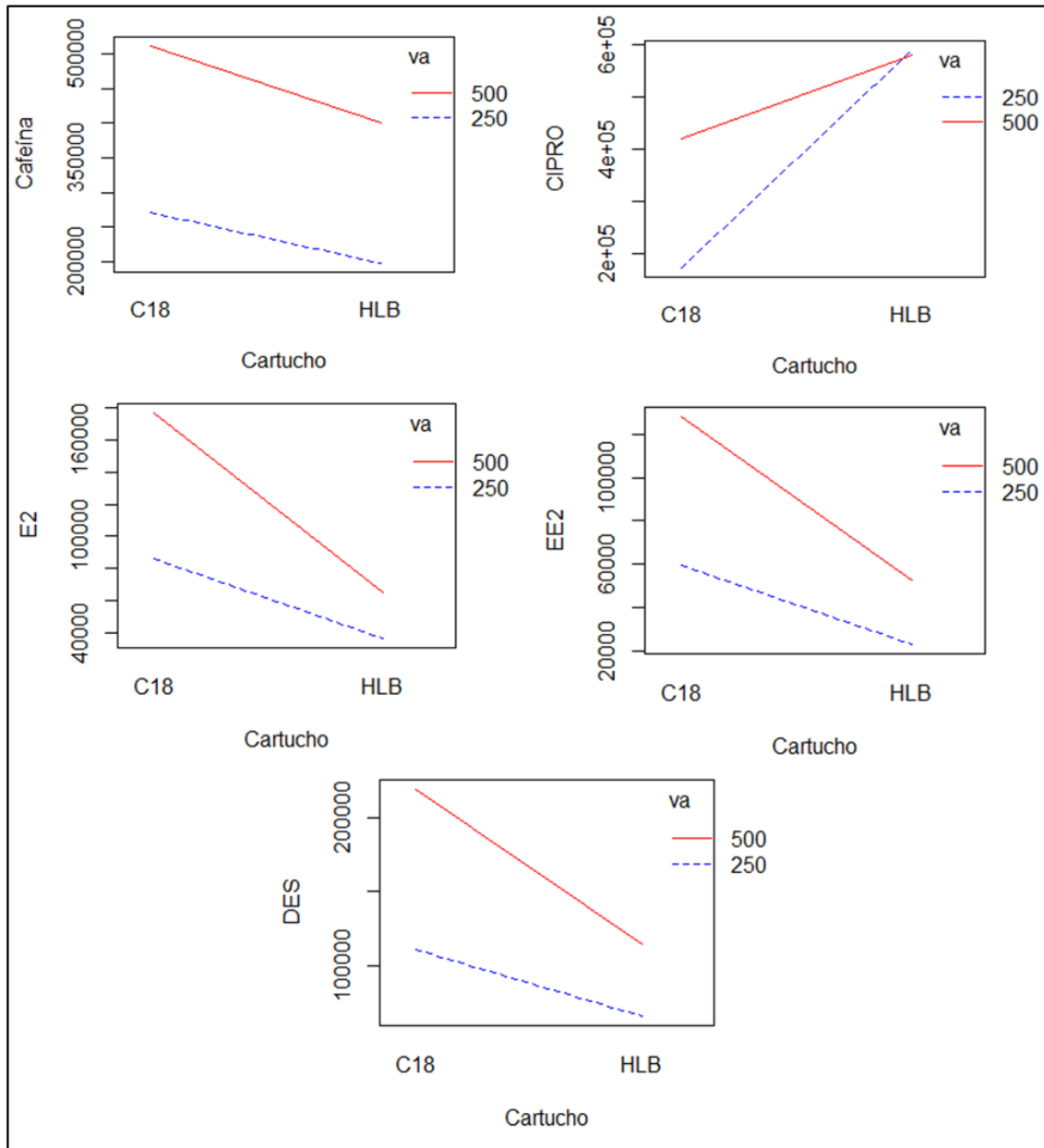
Fonte: Autora, 2014.

Figura 25 - Gráficos de interação entre os cartuchos de extração e o pH da amostra para cada composto estudado.



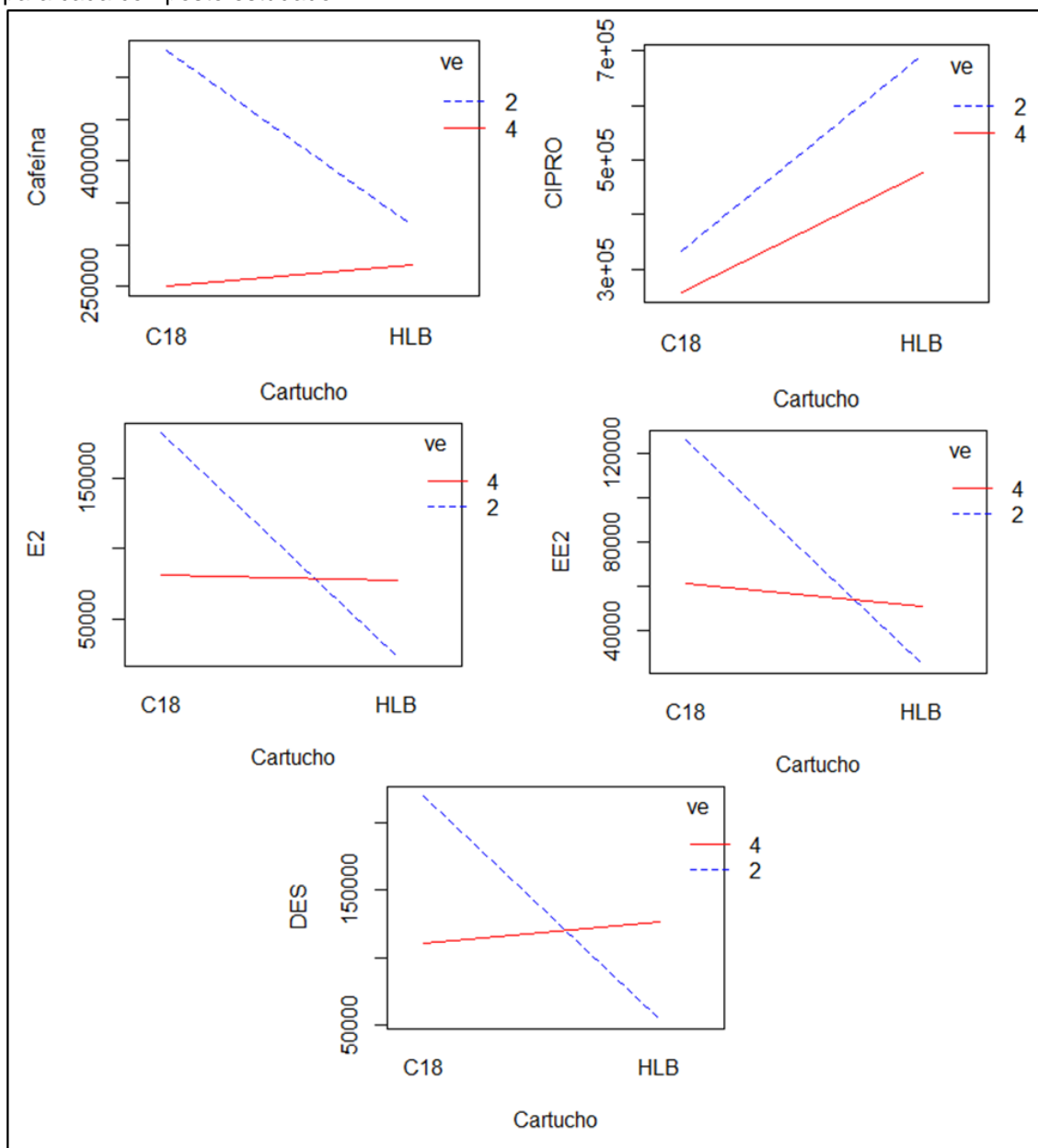
Fonte: Autora, 2014.

Figura 26 – Gráficos de interação entre os cartuchos de extração e os volumes de amostra (va) para cada composto estudado.



Fonte: Autora, 2014.

Figura 27 – Gráficos de interação entre os cartuchos de extração e os volumes de eluente (ve) para cada composto estudado.



Fonte: Autora, 2014.

A interpretação dos gráficos mostrados na Figura 25, interação cartucho e pH, revela que o cartucho HLB tem efeito negativo para todos os compostos, com exceção da CIPRO. Na Figura 26, interação cartucho e volume de amostra, também revela efeito positivo da CIPRO pelo cartucho HLB. Enquanto que os outros compostos apresentam efeito positivo para o cartucho C-18. Nos gráficos de interação, cartucho e volume de eluente, da Figura 27, observa-se que, com exceção da CIPRO, os outros compostos não apresentam

nenhum efeito para os cartuchos quando o volume de eluente é de 4,0 mL. No entanto, quando o volume é 2,0 mL os compostos apresentam efeito positivo para o cartucho C-18.

De acordo com Samanidou *et al.*, (2005) e Zhao *et al.*, (2007), o cartucho mais utilizado para a extração da ciprofloxacina por SPE é o Oasis HLB<sup>®</sup>, o qual é recheado por um polímero macroporoso poli (divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona). Este material apresenta características lipofílicas e hidrofílicas e é estável para todo o intervalo de pH tradicional. O monômero lipofílico é constituído pelo grupo divinilbenzeno que possibilita uma maior retenção dos analitos, particularmente importante na recuperação de compostos polares. O caráter hidrofílico é conferido pelo grupo N-vinilpirrolidona, que confere ao adsorvente propriedades hidrofílicas, evitando os problemas de molhabilidade (retenção de água) encontrados para os adsorventes de sílica octadecilsilano (C-18).

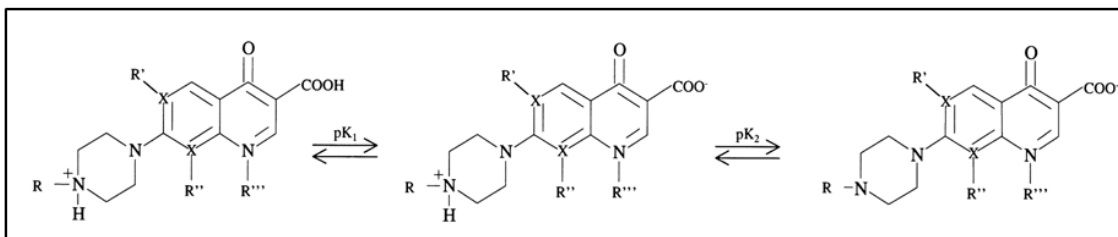
Para antibióticos de uso humano e veterinário, os materiais sorventes mais utilizados nos cartuchos são o copolímero divinilbenzeno e o N-vinilpirrolidona que, por apresentarem características de interação mista hidrofílica-lipofílica, podem extrair analitos de média a alta polaridade, apresentando os melhores percentuais de recuperação (DIAZ-CRUZ e BARCELÓ, 2006).

Ao avaliar a interação entre os cartuchos e o pH da amostra para a CIPRO na Figura 25, observa-se um aumento significativo da resposta no cartucho C18 quando em pH 3.

A ciprofloxacina é uma (fluoro) quinolona (FQ) que possui um grupo piperazinil que tem dois valores de pKa, um perto de pH 6 e outro próximo de pH 8, existindo, majoritariamente, na forma catiônica a pH ácido e na forma aniônica em pH básico. Existem na forma zwitteriônica a pH neutro, tendo a molécula, na globalidade, carga zero, mas tendo zonas com carga positiva e outras com carga negativa, (Figura 28) (PISTOS *et al.*, 2005).



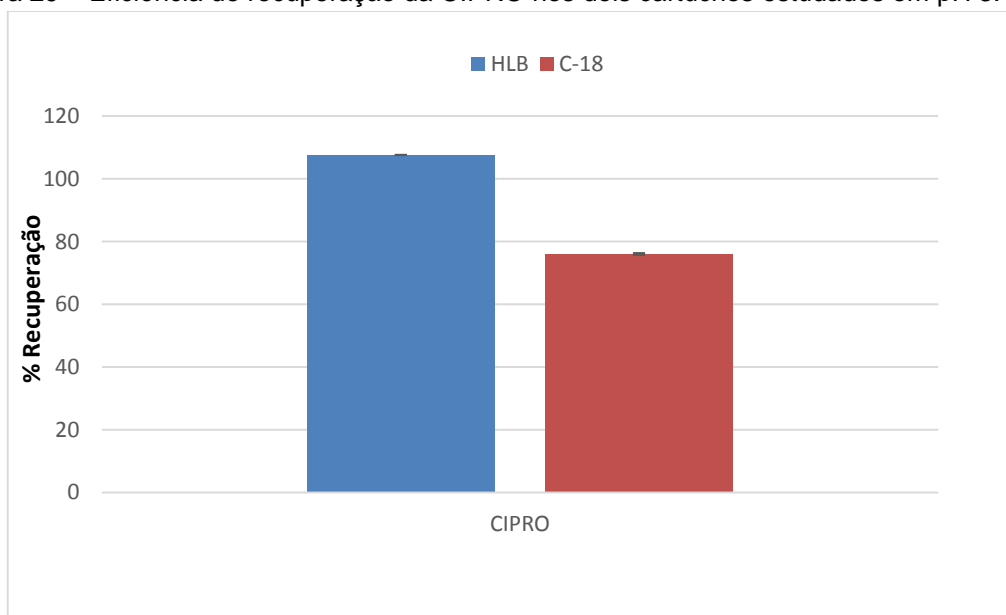
Figura 28 – Estrutura e equilíbrio de ionização das piperazinil (fluoro) quinolona.



Fonte: TURIEL *et al.*, 2003.

Assim, quando a solução da amostra encontra-se em pH 7,5, a forma zwitteriônica da ciprofloxacina prevalece, e esta forma apresenta menor interação com a fase estacionária do cartucho C-18. A Figura 29 apresenta a eficiência de recuperação da ciprofloxacina nos dois cartuchos estudados, em pH 3.

Figura 29 – Eficiência de recuperação da CIPRO nos dois cartuchos estudados em pH 3.



Fonte: Autora, 2014.

A eficiência na recuperação da CIPRO em pH 3 com o cartucho C-18 apresentou um valor de 76%, satisfazendo as recomendações da AOAC, que estabelece uma faixa de recuperação entre 60 e 115%, na concentração de 50 µg/L.

Portanto, o cartucho C-18 foi adotado durante a pesquisa como o adsorvente na etapa de SPE para todos os compostos estudados.

Na segunda fase do planejamento fatorial foi realizada análise dos três fatores (pH, volume de amostra e volume de eluente) com o cartucho C-18.

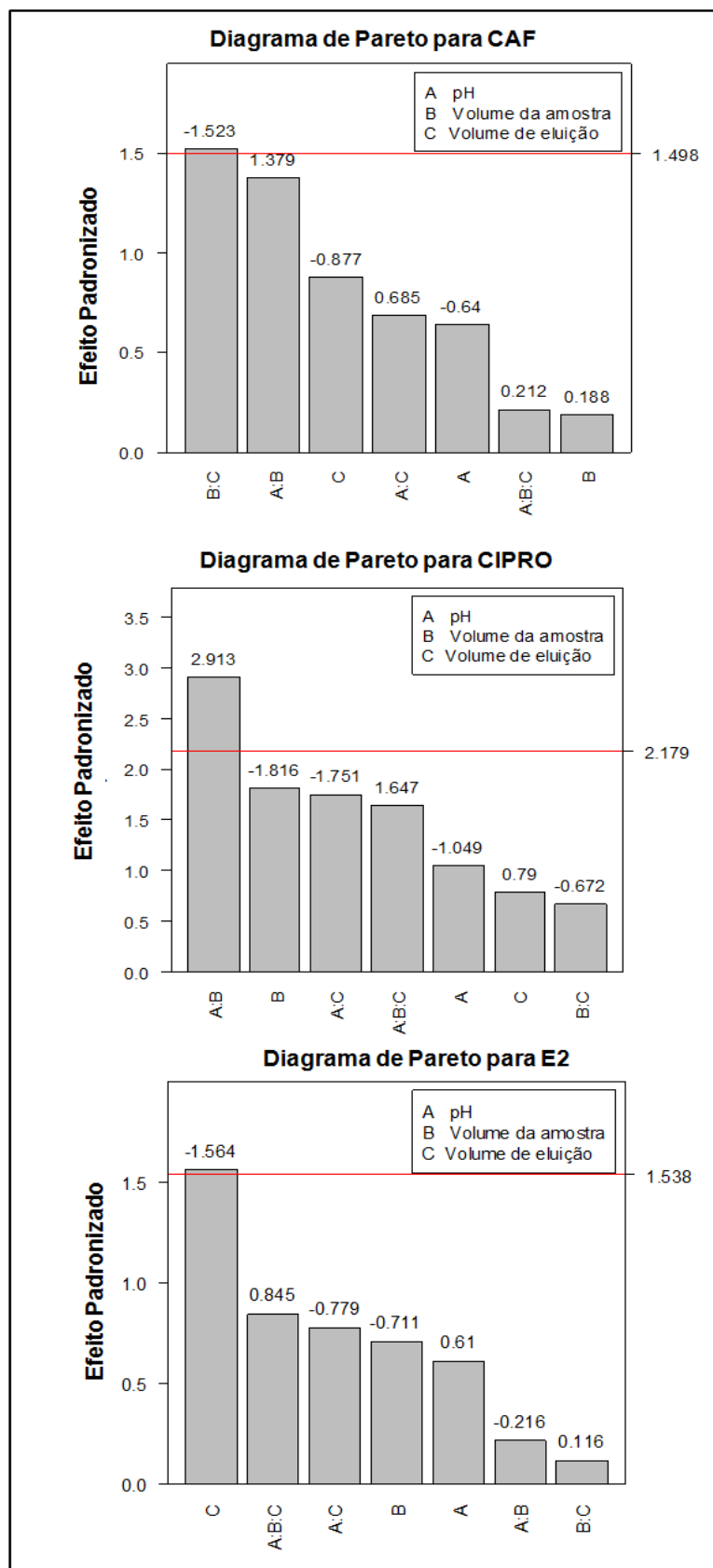
Com os resultados obtidos usando o *software* R (versão 3.0.1) foram gerados os diagramas de Pareto para cada composto, com intervalo de confiança de 95%, os quais são mostrados na Figura 30.

Analisando o diagrama de Pareto para a CAF observa-se que o fator que apresentou importância significativa foi a interação entre o volume de amostra e o volume de eluição.

Para a CIPRO o fator mais significativo foi a interação entre o pH e o volume da amostra. O volume de eluição foi o fator mais significativo para o E2, a interação negativa observada (-1,564), indica que no momento que havia a transferência do nível mais baixo (-1) para o nível mais alto (+1) ocorria uma redução no fator resposta, mostrando que o volume de eluição de 4 mL apresenta menor resposta quando comparado ao volume de 2 mL.

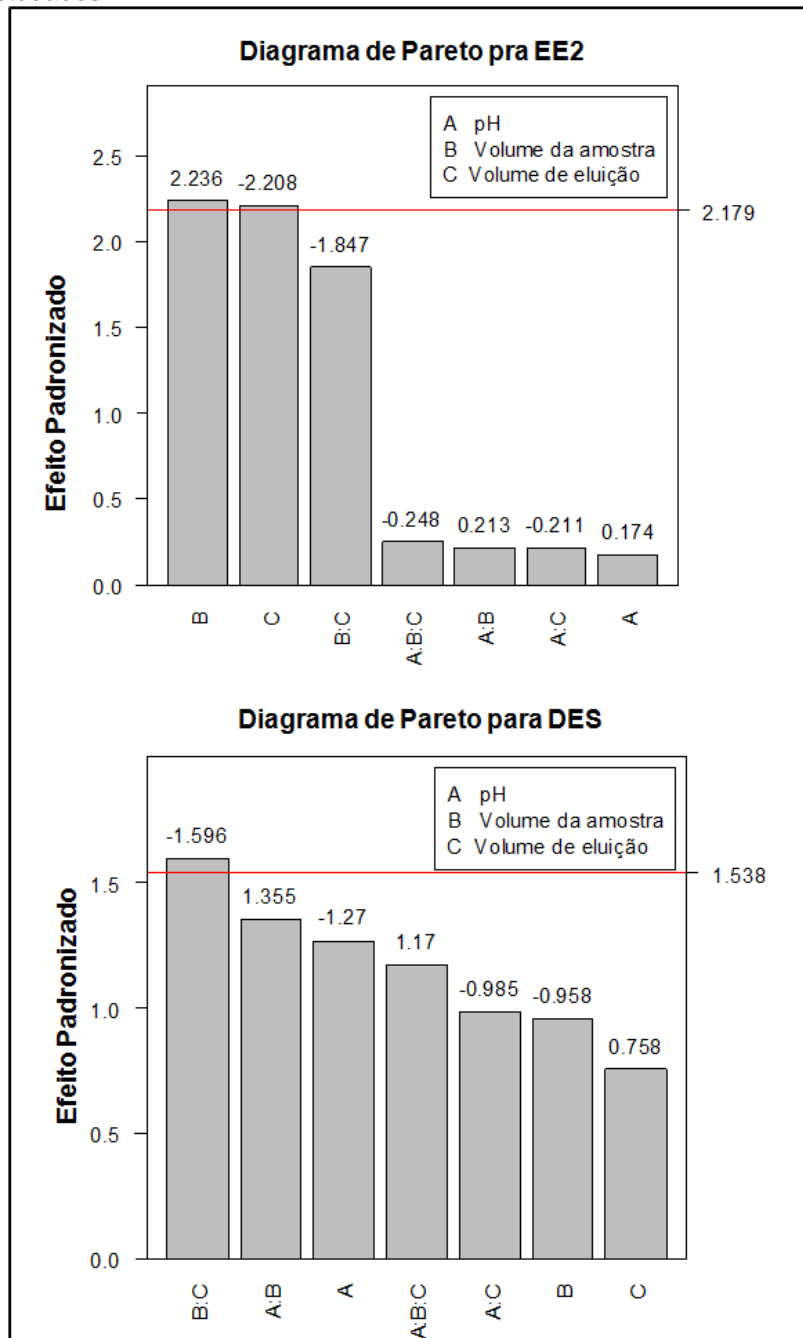
O composto EE2 apresenta dois efeitos significativos, o volume de amostra e o volume de eluição. É observado efeito positivo (2,236) no volume de amostra quando há a transferência do nível mais baixo (-1) para o nível mais alto (+1), ou seja, há um aumento no fator resposta quando o volume de 250 mL aumenta para 500 mL. Para o fator volume de eluição, é observado um efeito negativo (-2,208), indicando que no momento que havia a transferência do nível mais baixo (-1) para o nível mais alto (+1) ocorria uma redução no fator resposta, mostrando que o volume de eluição de 4 mL apresenta menor resposta quando comparado ao volume de 2 mL, o mesmo comportamento observado para o hormônio E2. Finalmente, para o composto DES, o fator mais significativo foi a interação entre o volume de amostra e o volume de eluição.

Figura 30 – Diagramas de Pareto do planejamento fatorial da SPE para os compostos estudados.



Fonte: Autora, 2014.

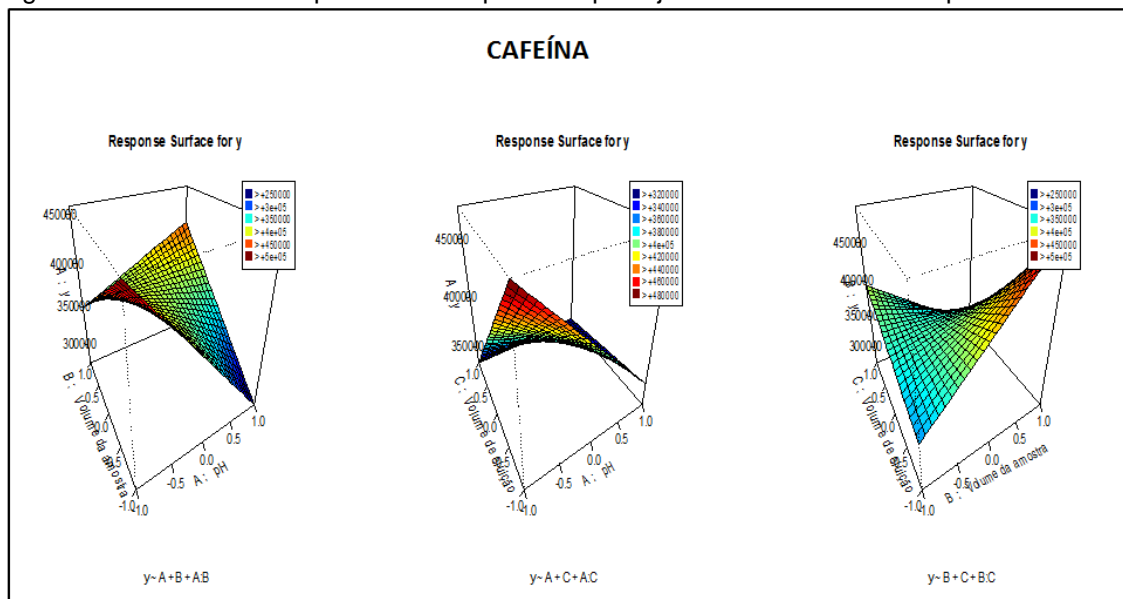
Continuação da Figura 30 – Diagramas de Pareto do planejamento fatorial da SPE para os compostos estudados.



Fonte: Autora, 2014.

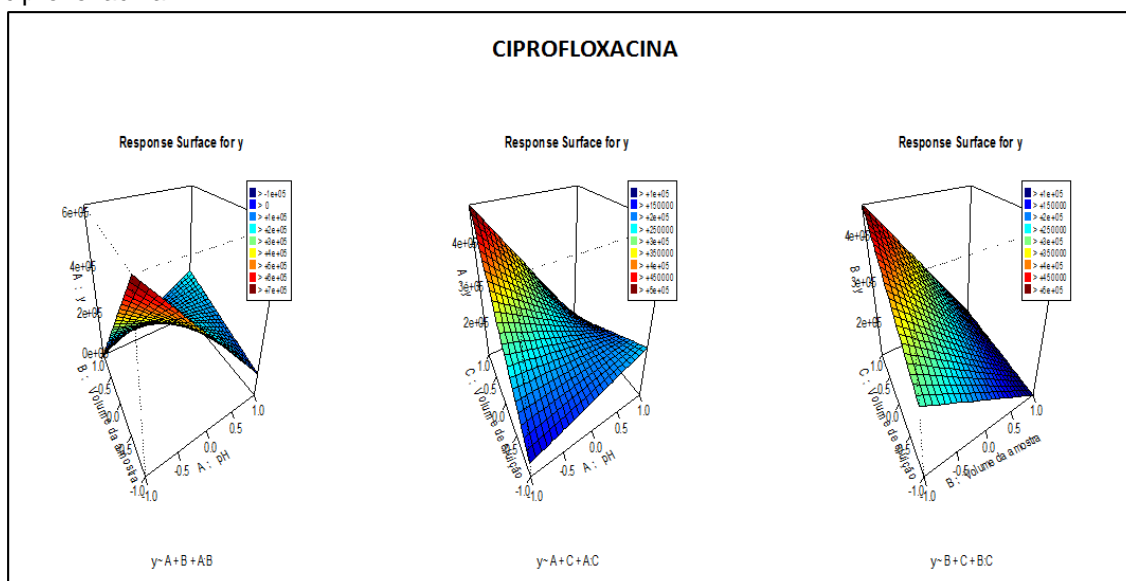
Para uma melhor visualização dos resultados obtidos são apresentados nas Figuras 31 a 35 os gráficos de superfície de resposta quando estes vão do nível -1 ao +1, os quais podem simplificar a interpretação dos resultados obtidos.

Figura 31 – Gráficos de superfície de resposta do planejamento fatorial da SPE para a cafeína.



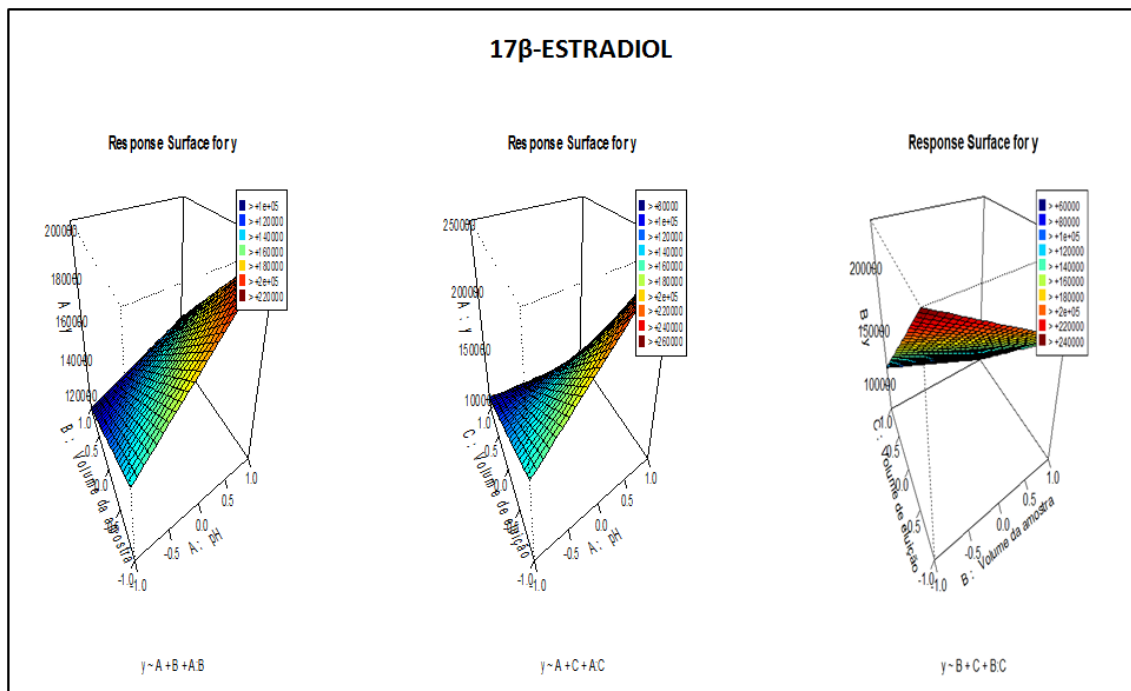
Fonte: Autora, 2014.

Figura 32 – Gráficos de superfície de resposta do planejamento fatorial da SPE para a ciprofloxacina.



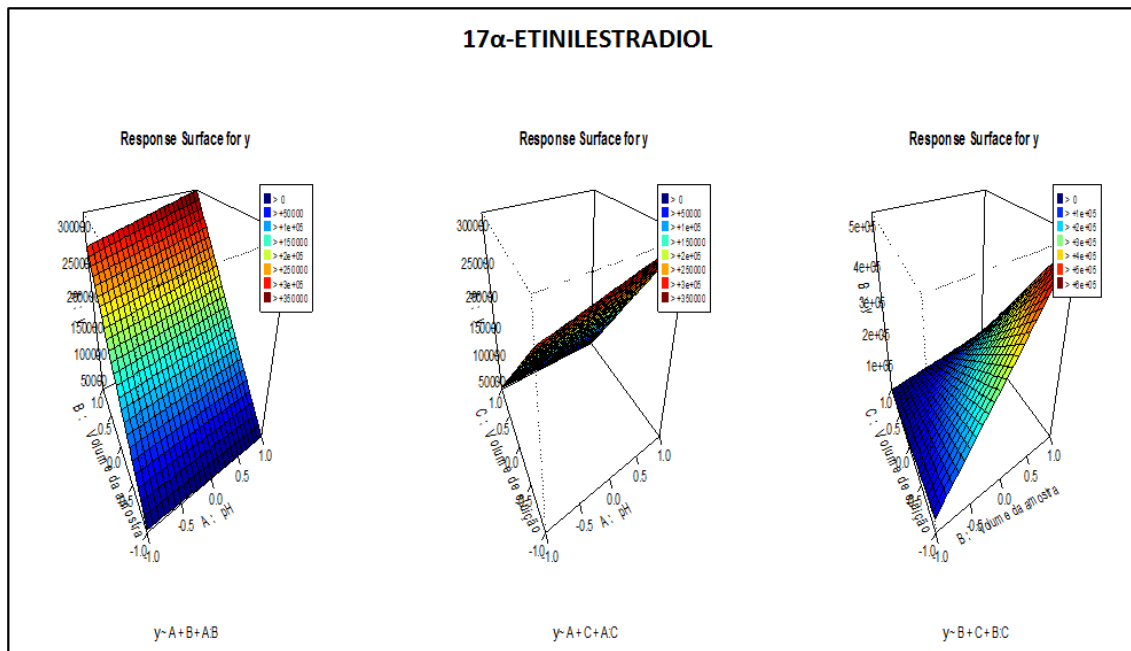
Fonte: Autora, 2014.

Figura 33 – Gráficos de superfície de resposta do planejamento fatorial da SPE para a 17β-estradiol.



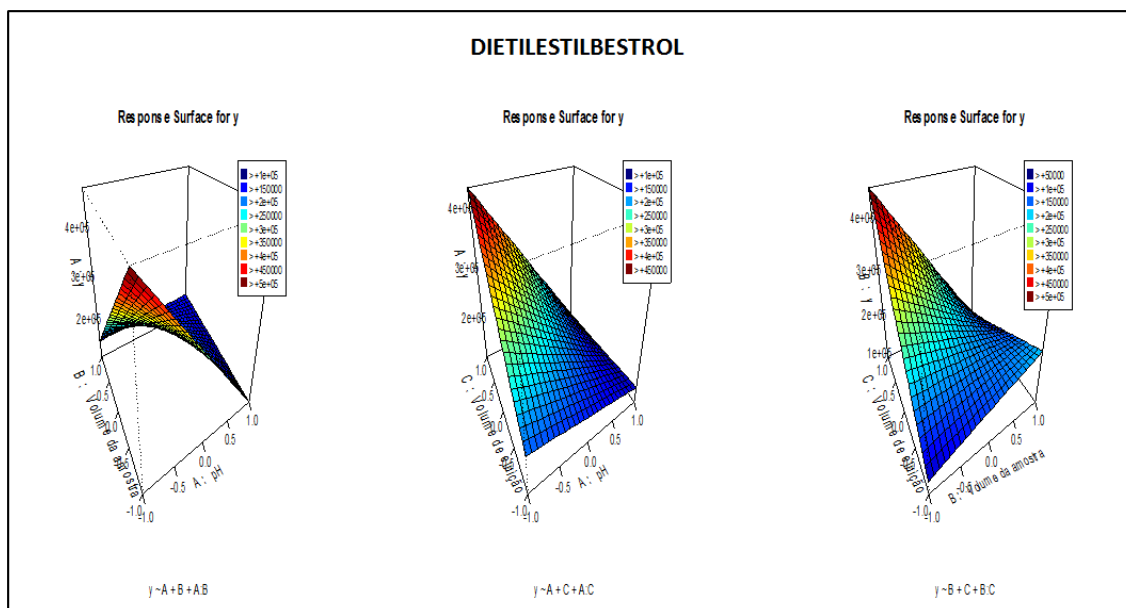
Fonte: Autora, 2014.

Figura 34 – Gráficos de superfície de resposta do planejamento fatorial da SPE para a 17α-etinilestradiol.



Fonte: Autora, 2014.

Figura 35 – Gráficos de superfície de resposta do planejamento fatorial da SPE para o dietilestilbestrol.



Fonte: Autora, 2014.

A análise dos gráficos de superfície de resposta leva as seguintes conclusões quanto a otimização das condições para SPE:

O volume de eluição apresentou melhores respostas para os compostos CAF, E2 e EE2 quando houve a transferência do nível mais alto (+1) para o nível mais baixo (-1), ou seja, quando o volume de eluição é 2,0 mL, caracterizada pela forte variação nas cores da superfície. Para os compostos CIPRO e DES as melhores respostas ocorreram quando houve a transferência do nível mais baixo (-1) para o nível mais alto (+1), ou seja, quando o volume de eluição é 4,0 mL. No entanto, o fator volume de eluição não é significativo para os compostos CIPRO e DES quando avaliado individualmente (interação C) na Figura 30. Assim, o volume de eluição 2,0 mL foi adotado como valor ótimo para todos os compostos.

O volume de amostra apresentou melhores respostas para os compostos CAF e EE2 quando houve a transferência do nível mais baixo (-1) para o nível mais alto (+1), ou seja, quando o volume de amostra é 500 mL. Para o composto E2 as respostas obtidas para o volume de amostra variaram muito pouco, caracterizadas pela fraca variação nas cores da superfície. Para a CIPRO

e o DES o fator volume de amostra apresentou resposta elevada (para o volume de 250 mL) somente quando foi relacionada com o pH da amostra (interação AB), no entanto, quando o volume da amostra é relacionado com o volume de eluente (interação BC) não é observada uma variação significativa nas cores das superfícies de resposta. A interação individual do volume da amostra (B), só é significativa para o composto EE2, de acordo com a Figura 30. Portanto, o volume de amostra de 500 mL foi adotado como valor ótimo para todos os compostos.

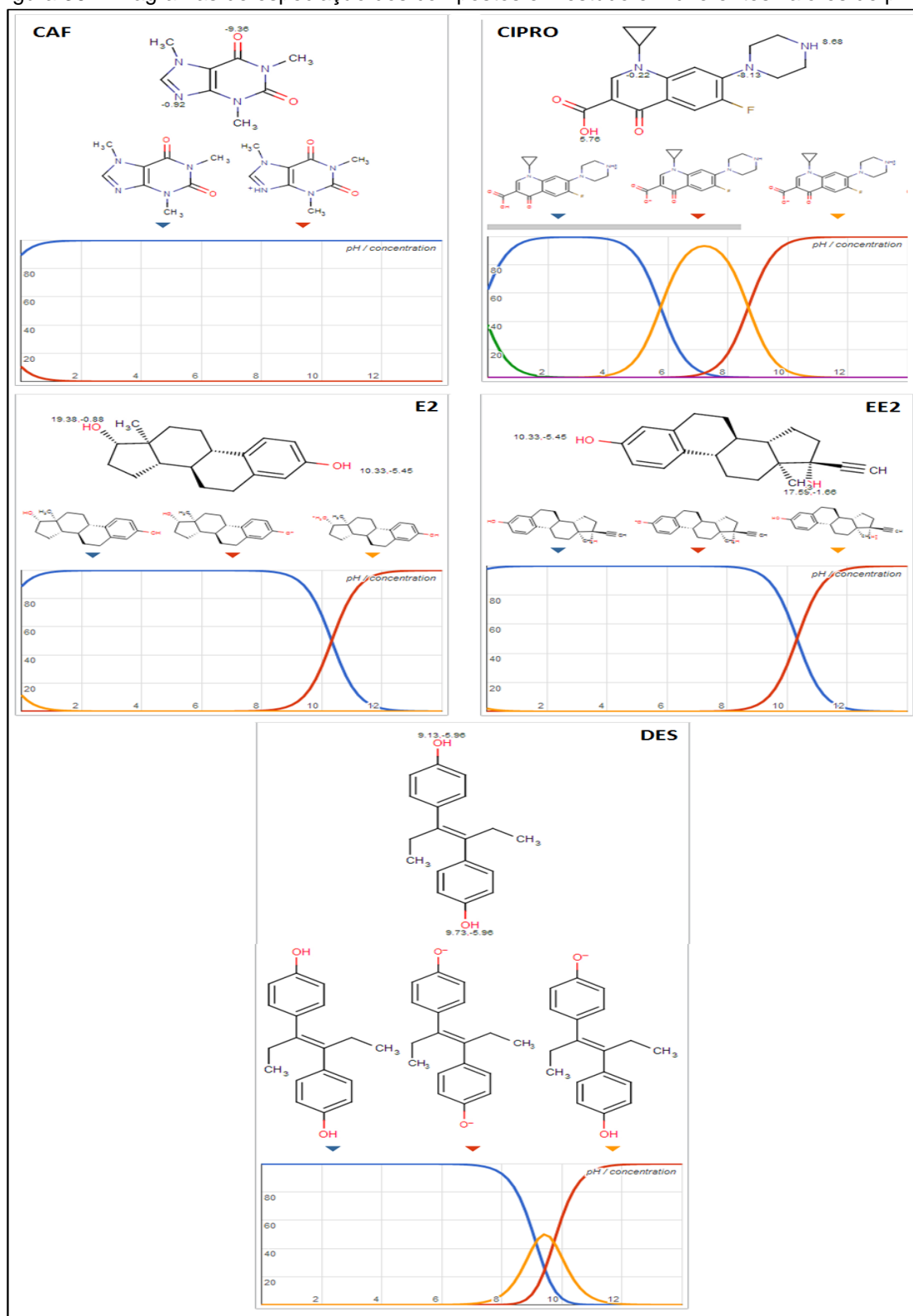
Quando utilizou cartucho C18 e 500 mL de amostra, Raimundo (2007) alcançou níveis de recuperação para cafeína na ordem de 102%.

No seu estudo de otimização das condições de extração dos hormônios E2 e EE2 por SPE, Pessoa (2012) também otimizou o volume de 500 mL de amostra como sendo ótimo na recuperação desses compostos. Nossos resultados também concordam com os obtidos por Bizkarguenaga *et al.* (2012), ao analisarem três volumes de amostra (100, 250 e 500 mL), a alíquota de 500 mL apresentou a melhor resposta.

O pH da amostra apresentou efeito significativo apenas para o composto CIPRO quando interage com o fator volume de amostra (interação AB), conforme Figura 30. No gráfico de superfície de resposta da CIPRO, Figura 32, observa-se que melhores respostas são alcançadas quando há a transferência do nível mais alto (+1) para o nível mais baixo (-1), ou seja, quando o pH é 3. Para os outros compostos não é observado nenhum efeito significativo quando há variação de pH. A Figura 36 mostra os diagramas de especiação dos compostos em diferentes valores de pH.



Figura 36 – Diagramas de especiação dos compostos em estudo em diferentes valores de pH.



Fonte: Adaptado de CHEMICALIZE (2014).

A análise dos diagramas de especiação nos dois valores de pH estudados, 3 e 7,5, indica que, com exceção da CIPRO, todos os outros compostos apresentam-se sob a mesma forma durante toda a faixa de pH estudada. Na CIPRO, a forma catiônica (azul) prevalece em pH 3, e em pH 7,5 a forma zwitteriônica (laranja). Assim, a afinidade do analito, na forma catiônica, com a fase estacionária C18 (adsorvente) do cartucho foi mais significativa do que na forma zwitteriônica.

Portanto, a acidificação da amostra em pH 3,0 foi adotada nesta pesquisa como sendo o valor ótimo de pH para todos os compostos.

Esses resultados concordam com os estudos de Turiel *et al.* (2003), os quais conseguiram uma recuperação entre 87 – 101% de CIPRO em amostras de água superficial ajustadas em pH 4,0 utilizando cartuchos C18 na SPE.

Nos estudos de Pessoa (2012) e Pedrouzo *et al.* (2009), também não foram encontradas diferenças significativas ao analisar os hormônios E2, EE2 e DES nos mesmos valores de pH aqui apresentados (pH 3 e pH 7,5).

A Tabela 20 apresenta o resultado das condições de otimização de SPE adotadas para os compostos estudados.

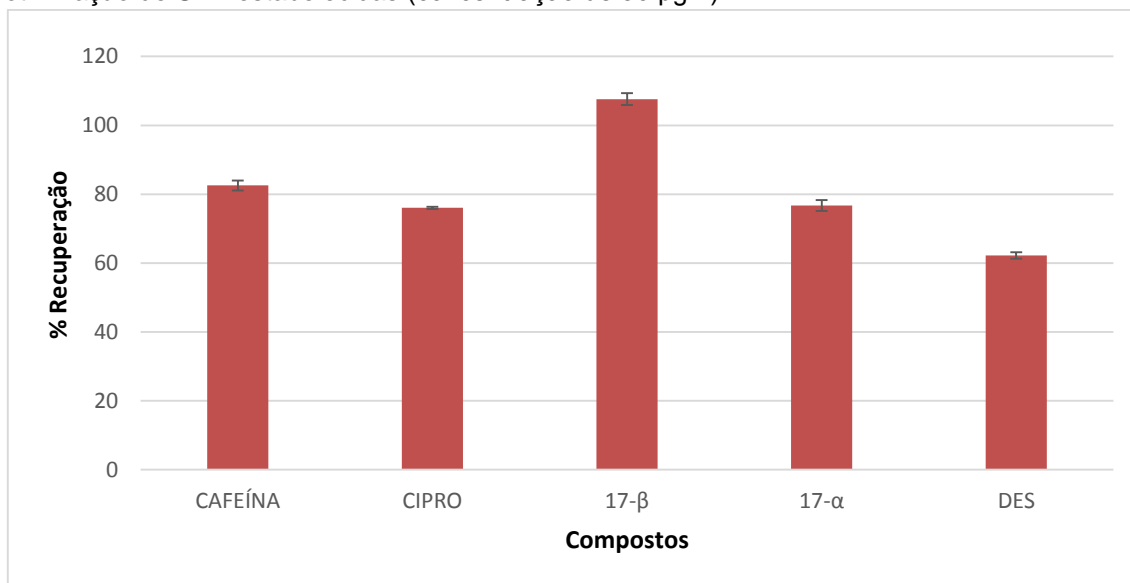
Tabela 20 – Resultados das condições de otimização de SPE adotada para compostos estudados.

Composto	Cartucho	Vol. amostra, mL	pH	Vol. eluição, mL
CAF				
CIPRO				
E2	C-18	500	3	2
EE2				
DES				

Fonte: Autora, 2014.

A eficiência de recuperação dos compostos estudados, com as condições da otimização de SPE estabelecidas no planejamento fatorial, são apresentadas na Figura 37.

Figura 37 – Eficiência de recuperação dos compostos estudados com as condições de otimização de SPE estabelecidas (concentração de 50 µg/L).



Fonte: Autora, 2014.

Observa-se que a eficiência de recuperação para todos os compostos está acima de 60%, estando, portanto, de acordo com a *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)* (1998), que estabelece uma faixa de recuperação aceitável de 60 a 115%, Tabela 7.

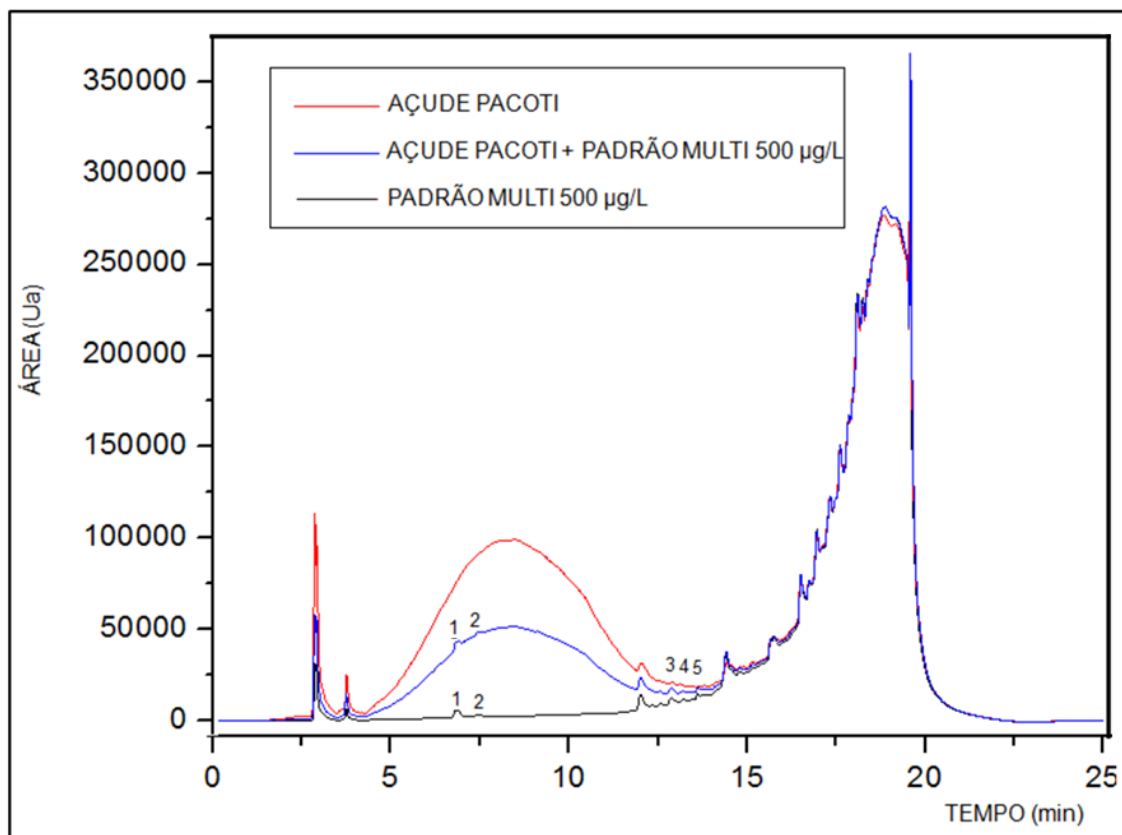
### 5.3 Validação do método analítico

#### 5.3.1 Figuras de mérito do método cromatográfico

##### 5.3.1.1 Seletividade

O estudo envolveu a comparação entre três cromatogramas referentes a uma amostra do açude Pacoti; a mesma amostra do açude Pacoti dopada com os cinco analitos em concentração de 500 µg/L; e um padrão multi dos cinco analitos de concentração 500 µg/L cada, foi realizada pela análise da Figura 38.

Figura 38 – Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD para uma amostra padrão multi 500 µg/L dos cinco compostos, e duas amostras do açude Pacoti, uma natural e uma dopada com 500 µg/L dos cinco compostos. 1: Cafeína; 2: Ciprofloxacina; 3: 17β-estradiol; 4: 17α-etinilestradiol; 5: Dietilestilbestrol.



Fonte: Autora, 2014.

Analisando a Figura 38 verifica-se que não foi observado nenhum pico interferente eluindo no mesmo tempo de retenção dos compostos de interesse, pois os mesmos estão bem separados dos demais compostos presentes na amostra. Dessa forma o método cromatográfico mostrou ser seletivo para os compostos de interesse.

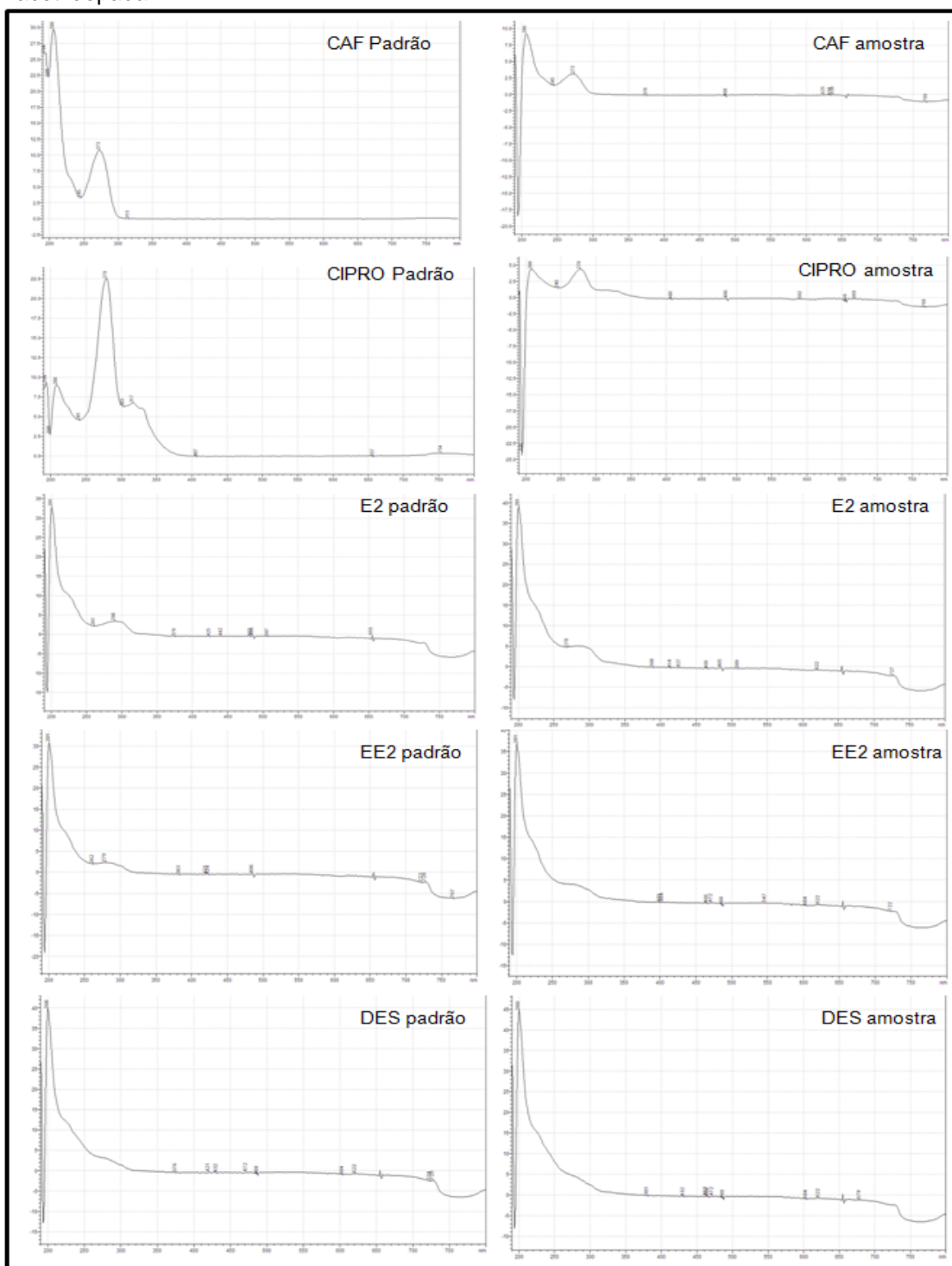
A diferença do desvio da linha de base observada no início do cromatograma (a partir de 5 min) está relacionado com a absorção no UV de substâncias húmicas comumente presentes em amostras de água de lagos, lagoas, estuários, etc., que causa esta característica devido ao seu sistema conjugado de anéis aromáticos (MADUREIRA *et al.*, 2010).

O desvio da linha de base observado nos três cromatogramas após 12 minutos está relacionado com o gradiente de eluição, pois o fluxo da fase

móvel sofre uma mudança repentina de 1 mL/min para 2 mL/min a partir de 10,5 minutos de corrida cromatográfica.

Com a utilização do detector de arranjo de diodos – DAD foi possível avaliar os espectros de absorção no comprimento de onda característico de cada composto na amostra do açude Pacoti dopada e compará-los com o dos padrões, Figura 39.

Figura 39 – Espectro de absorção no UV dos compostos nos padrões e na amostra do açude Pacoti dopada.



Fonte: Autora, 2014.

De acordo com Ribani *et al.* (2004), a comparação entre os espectros pode indicar a pureza do composto. A técnica de comparação dos espectros dos

padrões e dos analitos da amostra geralmente aumenta a seletividade do método.

A análise qualitativa dos espectros obtidos pelo detector DAD possibilitou a estimativa da pureza dos picos cromatográficos, os valores são dados de acordo com a Tabela 21. Para a quantificação dos analitos foram usados os cromatogramas obtidos com absorção UV nos comprimentos de onda característicos de cada composto.

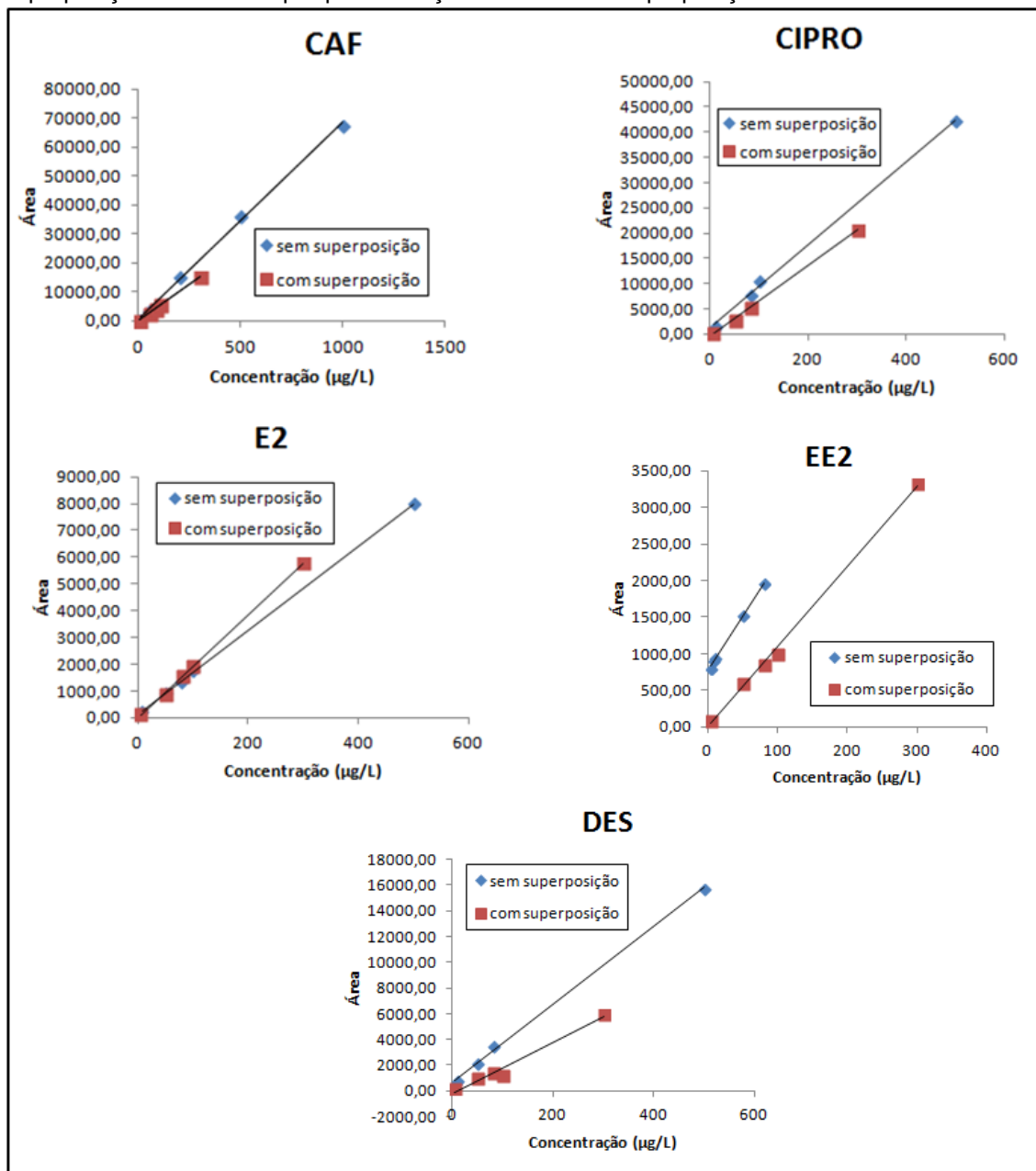
Tabela 21 – Comprimentos de onda, tempos de retenção e pureza dos picos dos compostos estudados.

Composto	Comprimento de onda característico (nm)	Tempo de retenção (min)	Pureza do pico (%)
CAF	272	6,836	99,99
CIPRO	278	7,457	99,75
E2	215	12,878	98,70
EE2	215	13,191	99,29
DES	239	13,615	98,77

Fonte: Autora, 2013.

Conforme observado na Figura 40, pode-se afirmar também que o método cromatográfico implementado para a análise da cafeína, ciprofloxacina, 17- $\beta$  estradiol, 17- $\alpha$  etinilestradiol e dietilestilbestrol é seletivo. Como observado a comparação entre as curvas analíticas com padrão externo e com a matriz (superposição) indica que as curvas analíticas apresentaram-se paralelas, considerando uma diferença entre os coeficientes angulares (*slop*) menor que 25%. Segundo Ribani *et al.* (2004) quando isso ocorre pode-se dizer que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse. Portanto, recomenda-se o uso do método do padrão externo.

Figura 40 – Curvas analíticas obtidas para os compostos por padronização externa sem superposição de matriz e por padronização externa com superposição de matriz.



Fonte: Autora 2013.

### 5.3.1.2 Linearidade e sensibilidade

A faixa de linearidade do método para os compostos foi avaliada através do coeficiente de correlação ( $R$ ) obtido por regressão linear e dos coeficientes de regressão das curvas de calibração obtidos por regressão linear.



Uma satisfatória faixa de linearidade foi encontrada para todos os compostos estudados, Tabela 22.

Tabela 22 - Curvas de calibração dos analitos, faixa linear e coeficientes de correlação.

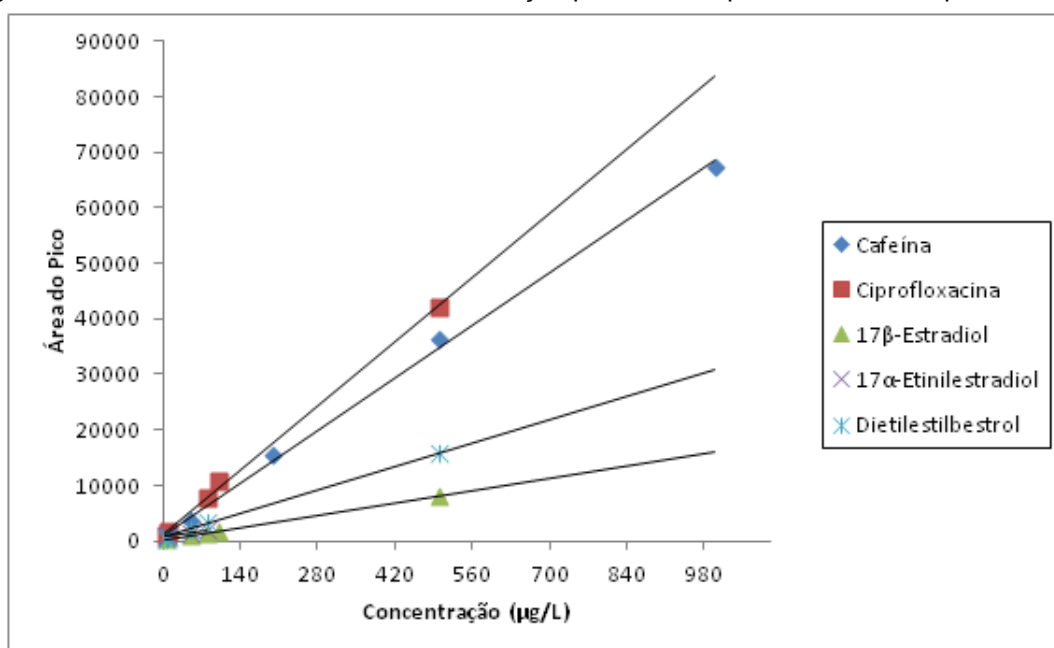
Composto	Faixa linear (µg/L)	Curva analítica	R
CAF	10 - 1000	$y = 63,939x + 688,02$	0,992
CIPRO	5 - 500	$y = 83,212x + 775,75$	0,997
E2	5 - 500	$y = 15,61x + 177,82$	0,999
EE2	5 - 80	$y = 14,937x + 765,82$	0,999
DES	5 - 500	$y = 30,342x + 717,28$	0,997

Fonte: Autora, 2014.

De acordo com a Tabela 22 observa-se que, dentro das faixas lineares estudadas, o método analítico por HPLC-DAD atendeu as exigências da ANVISA (BRASIL, 2003), pois os valores dos coeficientes de correlação (R) foram superiores a 0,99.

A sensibilidade foi expressa pela inclinação da curva analítica. A Figura 41 mostra as curvas analíticas dos compostos estudados.

Figura 41 – Curvas analíticas obtidas com solução padrão multi para os cinco compostos.



Fonte: Autora, 2014.

Pela Figura 41 é possível observar as tendências da sensibilidade usando o detector DAD. O composto que apresenta a maior sensibilidade dentre os cinco é a ciprofloxacina, seguida pela CAF > DES > E2 > EE2, conforme valores dos coeficientes angulares das curvas analíticas dadas na Tabela 22.

### 5.3.1.3 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica (coeficientes angular e linear), conforme equações 4 e 5. Os valores calculados são mostrados na Tabela 23.

Tabela 23 - Limite de detecção e limite de quantificação dos cinco compostos determinados por HPLC-DAD.

Composto	LD (µg/L)	LQ (µg/L)
CAF	1,543	5,142
CIPRO	1,349	4,496
E2	0,283	0,944
EE2	0,383	1,275
DES	1,154	3,845

Fonte: Autora, 2014.

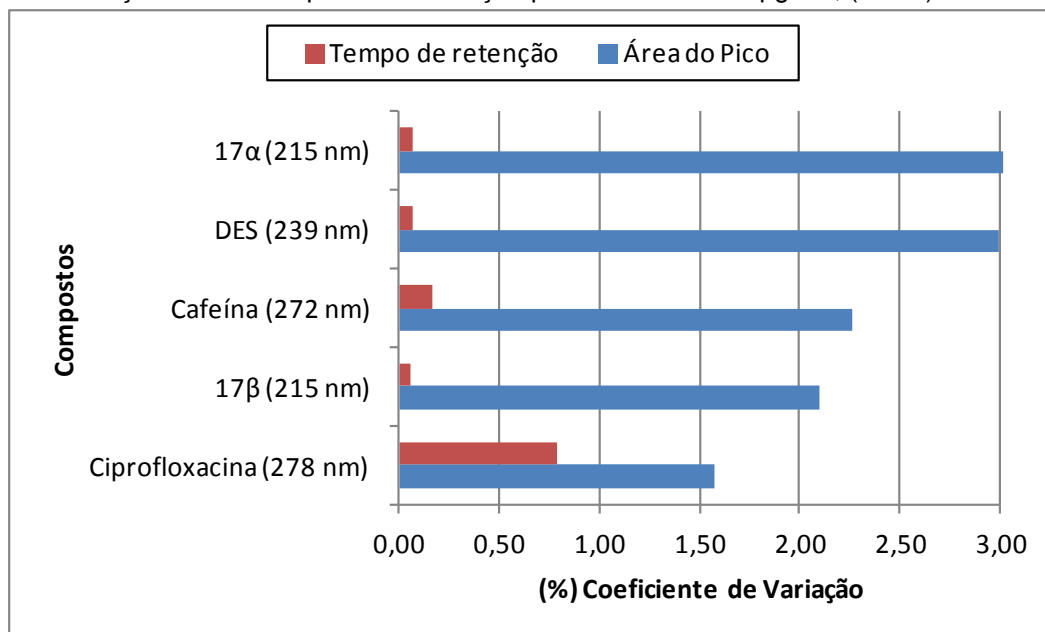
No estudo de Verbinnen, Nunes e Vieira (2010), os mesmos encontraram um LD igual a 1,25 µg/L para o E2 e o EE2. No estudo de Zarzycki, Włodarczyk e Baran (2009) o LD variou de 0,001 – 0,026 µg/L para os hormônios E2, EE2 e DES, enquanto que no de Alda e Barceló (2001) o LD foi igual a 0,015 µg/L para esses mesmos hormônios. Rao, Venkateswarlu e Narsimha (2008) encontraram LD igual a 0,6 µg/L e LQ igual a 2,0 µg/L para ciprofloxacina juntamente com outros antibióticos. Raimundo (2007) encontrou um LD igual a 22 µg/L e LQ igual a 74 µg/L para a cafeína juntamente com outras classes de fármacos.

#### 5.3.1.4 Precisão

A precisão do método cromatográfico empregado neste trabalho foi avaliada por meio da repetibilidade intradia. A precisão intradia foi representada pela concordância entre os resultados de dez medidas sucessivas do método, efetuadas pelo mesmo analista, sob as mesmas condições de análise, no mesmo instrumento, no mesmo local e no mesmo dia, no intervalo de tempo de horas.

A precisão foi determinada com base nas áreas dos picos e tempo de retenção dos compostos de uma mesma amostra, Figura 42.

Figura 42 – Precisão do método cromatográfico por meio da repetibilidade intradia. Condições: amostra do açúcar Gavião dopada com solução padrão multi de 50 µg/mL, (n =10).



Fonte: Autora, 2014.

A ANVISA não admite valores de CV% superiores a 5 % para determinação de fármacos em medicamentos (BRASIL, 2003), de acordo com os valores encontrados, percebe-se que o presente método atende as exigência da ANVISA para todos os compostos em estudo, uma vez que os coeficientes de variação (%CV) calculados foram inferiores a 3%.

### 5.3.1.5 Robustez

Os resultados das 4 análises realizadas representados por letras de *s* a *v* no ensaio de robustez foram utilizados para avaliar o efeito de cada variável (diferença entre a média dos resultados das 2 análises com letra maiúscula e a média dos resultados das 2 análises com letra minúscula), bem como o desvio padrão entre os 4 resultados.

Valores de efeito maior do que o desvio padrão (*s*) multiplicado pela raiz quadrada de dois ( $s\sqrt{2}$ ) são considerados significantes, portanto, alteram a resposta analítica (GEHRING *et al.*, 2011; Youden e Steine, 1975).

A Tabela 24 e a Tabela 25 apresentam os resultados do efeito de cada variável estudada sobre a área do pico e tempo de retenção dos compostos de interesse, respectivamente.

Tabela 24 - Valores de efeitos obtidos a partir dos resultados da área do pico dos compostos de interesse de acordo com o teste de Youden e Steine (1975).

Variável	Efeito				
	CAF	CIPRO	E2	EE2	DES
pH da fase móvel	0,4712	0,3772	0,4388	0,4462	0,4619
Concentração da fase móvel	0,5288	0,6228	0,5612	0,4705	0,5381
Temperatura da coluna	0,5288	-0,2888	-0,4095	0,5295	0,2740
$s\sqrt{2}^*$	0,5987	0,6395	0,6709	0,6835	0,6207

\*  $s\sqrt{2}$  = Desvio padrão entre os resultados das 4 combinações experimentais (Tabela 12) multiplicado por raiz quadrada de 2.

Fonte: Autora, 2014.

Tabela 25 - Valores de efeitos obtidos a partir dos resultados do tempo de retenção dos compostos de interesse de acordo com o teste de Youden e Steine (1975).

Variável	Efeito				
	CAF	CIPRO	E2	EE2	DES
pH da fase móvel	-0,0143	0,1548	0,0105	0,0060	-0,0058
Concentração da fase móvel	0,0287	0,1373	0,0035	-0,0065	-0,0248
Temperatura da coluna	0,0287	-0,0852	-0,0095	-0,0040	0,0153
$s\sqrt{2}$	0,0352	0,1827	0,0119	0,0079	0,0242

Fonte: Autora, 2014.

Pode-se observar que nenhum efeito foi maior do que o critério  $s\sqrt{2}$ , o que significa que nenhuma variável testada influencia significativamente na resposta analítica.

A partir desses resultados, pode-se deduzir que o método cromatográfico é considerado robusto para todas as variáveis estudadas, uma vez que as respostas analíticas, área do pico e tempo de retenção, não sofreram alterações significativas.

### **5.3.2 Validação das curvas de calibração**

Utiliza-se a análise por regressão linear para estabelecer o ajuste de uma curva de calibração e suas incertezas associadas, isso é frequentemente utilizado para indicar a melhor reta que passa entre os pontos experimentais (x,y) e que pode ser considerada sem erros determinados. Os cálculos estatísticos são utilizados com o propósito de aprimorar os julgamentos relacionados à qualidade de medidas experimentais (COSTA *et al.*, 2006; SKOOG *et al.*, 2010). Isso requer cálculos de intervalo de confiança dos coeficientes linear (interseção) e angular (inclinação) passando pela origem, e com o uso do branco.

O conceito estatístico do coeficiente correlação  $R$  em muitas vezes é mal interpretado e utilizado como critério de aceitação da linearidade da regressão por alguns analistas, quando utilizado em análise química. Ainda que se observem os altos valores de  $R$ , ou seja, próximos da unidade, porém abaixo de 0,999, é possível que a curva de calibração apresente erros determinados. Sendo assim, devem-se verificar por meio de testes estatísticos de comparação de variâncias, tais como o teste de validade da regressão (CHUI *et al.*, 2001).

#### **5.3.2.1 Teste de validação da análise de regressão linear (significância da regressão)**

Uma regressão linear significativa é aquela na qual a variação nos valores de  $y$  decorrentes da relação linear prevista é grande quando comparada com aquela devido aos erros (resíduos). Contudo, quando a regressão é significativa, ocorre um valor grande de  $F_{\text{calculado}}$  (SKOOG *et al.*, 2010).

Desse modo, a indicação da existência de relação linear entre as variáveis  $x$  e  $y$  foi significativa para todos os compostos estudados, dado o elevado valor de  $F_{\text{calculado}}$ . A confirmação da significância estatística ocorre por

meio do teste  $F$ , na Tabela 26 são apresentados os resultados referentes ao teste estatístico.

Tabela 26 – Teste de linearidade das curvas analíticas preparadas em metanol. Utilizando 95% de confiança e  $F_{\text{crítico}} = 6,61$

Composto	$F_{\text{calculado}}$	Teste $F$
Cafeína	293,19	
Ciprofloxacina	940,09	
17 $\beta$ -estradiol	7381,5	$F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{crítico}}$
17 $\alpha$ -etinilestradiol	1054,4	
Dietilestilbestrol	907,89	

Fonte: Autora, 2014.

### 5.3.2.2 Teste de significância dos parâmetros de calibração

Idealmente, as linhas de regressão obtidas para as curvas de calibração deveriam passar pela origem, ou seja, com intercepto da curva passando pelo ponto (0,0) dos eixos cartesianos (LIGIERO, 2009; NETO; PIMENTEL; ARAÚJO, 2002). Como pode ser observado na Tabela 22, as curvas obtidas possuem desvios positivos em seus coeficientes lineares (interceptos).

Devido aos desvios observados, foi realizado teste estatístico de significância dos parâmetros das curvas de calibração (coeficientes angulares e lineares), para avaliar a magnitude de significância desses parâmetros para as equações das curvas de calibração utilizadas nos cálculos de concentração dos analitos (LIGIERO, 2009; NETO; PIMENTEL; ARAÚJO, 2002).

O valor de  $t_{\text{calculado}}$  para os parâmetros foi comparado com o valor de  $t_{\text{crítico}}$  tabelado, para o nível de confiança de 95% e o número de graus de liberdade (GL) é dado por  $GL = N - 2$ , sendo  $N$  o número de pontos das curvas analíticas. Quando  $t_{\text{crítico}}$  é maior do que  $t_{\text{calculado}}$  a hipótese de que o desvio é insignificante estatisticamente é aceita, sendo assim, o coeficiente linear ( $b$ ) é

excluído da equação ( $y = ax + b$ ) para o cálculo das concentrações dos analitos (LIGIERO *et al.*, 2009). Os resultados são expressos na Tabela 27.

Os resultados da análise estatística dos parâmetros das equações das curvas analíticas evidenciam que todos os coeficientes angulares são significativos para todos os compostos ( $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$ ).

Os coeficientes lineares das equações dos compostos  $17\beta$ -estradiol,  $17\alpha$ -etinilestradiol e dietilestilbestrol são estatisticamente significativos ( $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$ ).

No entanto, os coeficientes lineares das equações dos compostos cafeína e ciprofloxacina não apresentam significância estatística ( $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$ ), ou seja, podem ser considerados zero nos cálculos das concentrações dos analitos. Portanto, os coeficientes lineares das equações das curvas analíticas da cafeína e ciprofloxacina foram desconsiderados das equações, tornando-as do tipo  $y = a.x$ .



Tabela 27 - Resultados do teste estatístico de significância dos parâmetros das equações das curvas de calibração (do tipo  $y = ax + b$ ).  $a$  = coeficiente angular;  $s_a$  = desvio do coeficiente angular;  $IC_a$  = intervalo de confiança do coeficiente angular;  $b$  = coeficiente linear;  $s_b$  = desvio do coeficiente linear;  $IC_b$  = intervalo de confiança do coeficiente linear;  $t_{calc,a}$  = valor de  $t$  calculado para coef. angular ;  $t_{calc,b}$  = valor de  $t$  calculado para coef. linear.

Composto	Coeficiente angular					Coeficiente linear					Equação da curva analítica corrigida
	$a$	$s_a$	$IC_a$	$t_{calc,a}$	Teste $t$	$b$	$s_b$	$IC_b$	$t_{calc,b}$	Teste $t$	
CAF	63,939	3,7341	63,939 ± 9,6003	16,855	$t_{cal} > t_{crit}$	688,02	1967,1	688,02 ± 5057,4	0,34976	$t_{cal} < t_{cri}$	$y = 63,939x$
CIPRO	83,212	2,7139	83,212 ± 6,9775	30,292	$t_{cal} > t_{crit}$	775,75	1177,0	775,75 ± 1368,1	1,4579	$t_{cal} < t_{cri}$	$y = 83,212x$
E2	15,610	0,18169	15,610 ± 0,4671	80,412	$t_{cal} > t_{crit}$	177,82	35,623	177,82 ± 91,588	4,9917	$t_{cal} > t_{crit}$	$y = 15,610x + 177,82$
EE2	14,937	0,45999	14,937 ± 1,4637	30,298	$t_{cal} > t_{crit}$	765,82	19,612	765,82 ± 71,787	39,048	$t_{cal} > t_{crit}$	$y = 14,937x + 765,82$
DES	30,342	1,0069	30,342 ± 2,5889	29,138	$t_{cal} > t_{crit}$	717,28	197,43	717,28 ± 507,601	3,6330	$t_{cal} > t_{crit}$	$y = 30,342x + 717,28$

Fonte: Autora, 2014.

### 5.3.3 Figuras de mérito do método de extração

#### 5.3.3.1 Precisão e exatidão

A precisão do método de extração, ou precisão intra-ensaio, foi avaliada em termos de recuperação dos analitos de interesse pela estimativa do coeficiente de variação (% CV).

A exatidão do método foi calculada como percentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra em três níveis de concentração.

A Tabela 28 apresenta os valores obtidos em solvente puro (água Milli-Q) e em matriz ambiental (água açude).

De acordo com Ribani *et al.* (2004), em método de análise de traços ou impurezas, são aceitos CV (%) de até 20%, dependendo da complexidade da amostra. A análise dos valores de CV (%) do método proposto mostra que nos três níveis de concentração estudados, composto CIPRO não atende essa exigência nos níveis de concentração de 5,0 e 80 µg/L em solvente puro. O composto E2 também apresenta valor superior ao máximo estabelecido no nível de concentração de 5,0 µg/L em matriz ambiental.

De acordo com a norma ABNT-NBR 14029 (2005), os valores limite de CV (%) variam de acordo com a concentração do analito na amostra, onde nos níveis de concentração do presente estudo, os limites são de 35%, 32% e 23% para as concentrações, 5,0; 80 e 300 µg/L, respectivamente. Nesse caso, todos os compostos apresentam precisão satisfatória nos três níveis de concentração estudados.

Quanto as eficiências de recuperação, os intervalos aceitáveis para análise de traços geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até ± 20%. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até ± 15% (RIBANI *et al.*, 2004).

Mais uma vez o composto CIPRO não atendeu ao intervalo aceitável de recuperação na concentração de 5,0 µg/L em matriz ambiental. O composto

DES também não atendeu ao intervalo aceitável nas concentrações de 80 e 300 µg/L em solvente puro.

De acordo com a norma ABNT-NBR 14029 (2005), os intervalos aceitáveis de recuperação também variam de acordo com a concentração do analito na amostra, onde nos níveis do presente estudo, os intervalos são de 40 – 120%, 60 – 115% e 80 – 110% para as concentrações, 5,0; 80 e 300 µg/L, respectivamente.

De acordo com esta norma, o valor de recuperação da CIPRO em 5,0 µg/L (46,1%) é aceita. No entanto, o DES não atende a essa norma nos níveis de concentração de 80 e 300 µg/L nas duas matrizes estudadas.

A Tabela 29 apresenta os percentuais de recuperação dos compostos em estudo relatados na literatura.

Tabela 28 – Figuras de mérito do método de extração (n = 3).

Composto	Concentração (µg/L)	Matriz			
		Solvente Puro		Matriz ambiental	
		Precisão (%CV)	Recuperação (%)	Precisão (%CV)	Recuperação (%)
CAF	5	4,40	87,7	3,92	90,3
	80	3,17	84,0	1,37	84,9
	300	2,61	75,2	1,24	81,8
CIPRO	5	21,6	50,41	19,6	46,1
	80	24,0	94,6	17,3	111
	300	1,56	83,8	1,92	83,4
E2	5	16,4	107	25,4	119
	80	7,33	104	6,88	110
	300	5,72	106	4,05	113
EE2	5	10,2	117	5,91	72,0
	80	5,97	67,6	6,93	71,6
	300	5,70	70,3	5,42	74,0
DES	5	10,71	123	9,29	108
	80	2,91	46,9	6,34	54,9
	300	1,41	41,8	2,91	63,7

Fonte: Autora, 2014.

Tabela 29 – Eficiência de recuperação dos compostos em estudos relatados na literatura.

Composto	Matriz	Tipo de sorvente	Concentração de dopagem (µg/L)	Recuperação (%)	Quantificação	Referência
CAF	Água superficial	Polimero estireno-divinilbenzeno (StrataX)	NI <sup>1</sup>	83	CG-MS	SODRÉ <i>et al.</i> (2010a).
	Água Milli-Q	C18 (Supelco)	1,0 10	74 102	HPLC-DAD	RAIMUNDO (2007).
CIPRO	Água superficial	Discos C18	0,025	95,6	LC-UV	TURIEL <i>et al.</i> (2003).
		Oasis HLB	0,06 0,2	81 79	LC-FD	PRAT <i>et al.</i> (2004)
	Água Milli-Q	C18 (Agilent)	5,0	84	HPLC-DAD	VERBINNEN e NUNES (2010).
E2	Água superficial	C18 (Agilent)	0,05	96	LC-FD	LOPES <i>et al.</i> (2010).
	Água Milli-Q	C18 (Supelclean)	0,1	99,5	HPLC-DAD	ZARZYCKI <i>et al.</i> (2009).
	Água Milli-Q	C18 (Hypersep)	20	99,2	LC-DAD	LIZ <i>et al.</i> (2012).
EE2	Água Milli-Q	C18 (Agilent)	5,0	107	HPLC-DAD	VERBINNEN e NUNES (2010).
	Água Milli-Q	C18 (Supelclean)	0,1	96,4	HPLC-DAD	ZARZYCKI <i>et al.</i> (2009).
	Água Milli-Q	C18 (Hypersep)	20	98,8	LC-DAD	LIZ <i>et al.</i> (2012).
	Água Milli-Q	C18 (Supelclean)	0,1	77,8	HPLC-DAD	ZARZYCKI <i>et al.</i> (2009).
DES	Água superficial	C18 (LiChrolut)	0,1	42	LC-MS/MS	KUSTER <i>et al.</i> (2009).
	Água Milli-Q		0,1	65		

Fonte: Autora, 2014.

### 5.3.4 Controle de qualidade aplicado no estudo dos IEs nas amostras dos açúdes estudados

Os resultados dos percentuais de recuperação de cada analito e do padrão *surrogate* (PS) nas duas matrizes aquosas estudadas são mostrados na Tabela 30.

Tabela 30 – Recuperação (%) dos analitos e do padrão *surrogate* (PS) estudados nas duas matrizes.

	Analitos de interesse					PS
	CAF	CIPRO	E2	EE2	DES	ESTRONE-2,4-D <sub>2</sub>
Matriz Ambiental	84,9	122,0	128,1	66,9	40,7	88,4
	89,2	101,3	130,7	71,8	36,3	96,0
	85,8	127,0	111,3	59,3	31,8	79,0
Média	86,6	116,8	123,4	66,0	36,3	87,9
RSD	2,6	11,7	8,6	9,5	12,3	9,4
Solvente Puro	85,8	113,5	129,9	74,0	36,2	92,8
	80,3	125,5	127,6	72,1	33,1	95,0
	79,5	101,6	125,7	72,3	30,4	93,4
Média	81,9	113,5	127,7	72,8	33,2	93,8
RSD	4,2	10,5	1,7	1,4	8,8	1,2

Fonte: Autora, 2014.

Para se conhecer o fator de relação ( $F_R$ ) entre o padrão *surrogate* (PS) utilizado e os analitos de interesse, foram utilizados os dados apresentados na Tabela 30 juntamente com a Equação 13. Os valores de  $F_R$  calculados, para cada matriz utilizada, apresentam-se na Tabela 31.

Tabela 31 –  $F_R$  dos analitos de interesse com o padrão *surrogate*.

	Fator de Relação ( $F_R$ )	
	Solvente puro	Água de açúde
CAF/PS	0,87±0,11	0,99±0,20
CIPRO/PS	1,21±0,29	1,34±0,68
E2/PS	1,36±0,08	1,40±0,11
EE2/PS	0,78±0,05	0,75±0,01
DES/PS	0,35±0,08	0,41±0,11

Fonte: Autora, 2014.

A diferença observada nos valores dos  $F_R$  para cada composto deve-se ao fato de que cada analito apresenta propriedades físico-químicas diferentes, portanto a relação entre o analito de interesse e o padrão *surrogate* pode variar de acordo com essas propriedades.

Foi também realizado o teste t, com 95% de confiança, para avaliar a diferença entre os valores dos  $F_R$  calculados entre o solvente puro e a água do açude. O teste revelou que não há diferença estatisticamente significativa entre os dois valores. Assim, podemos considerar que o comportamento do padrão *surrogate* foi o mesmo nas duas matrizes estudadas.

Os valores de  $F_R$  calculados foram posteriormente utilizados na Equação 14, e as concentrações dos compostos de interesse das amostras dos açudes foram corrigidas utilizando esse controle de qualidade.

#### **5.4 Análise das amostras dos açudes que abastecem a RMF**

O método desenvolvido foi utilizado nas análises de dez pontos amostrados dos açudes que participam do abastecimento de água para a região metropolitana de Fortaleza.

Os resultados das análises dos compostos de interesse são apresentados na Tabela 32. Os resultados encontrados foram corrigidos utilizando o controle de qualidade proposto pelo fator de relação ( $F_R$ ) e o padrão *surrogate* adicionado nas amostras.

Tabela 32 – Dados das concentrações dos compostos de interesse detectados nas amostras.

Amostras	Resultados (ng/L)			
	E2	E2 <sup>a</sup>	EE2	EE2 <sup>a</sup>
CPR -01	< LD	< LD	393	680
GAV-05	893	710 <sup>b</sup>	< LD	< LD
	549	437 <sup>c</sup>	< LD	< LD
GAV-08	989	839 <sup>b</sup>	< LD	< LD
	929	788 <sup>c</sup>	< LD	< LD
GAV-14	1132	906 <sup>b</sup>	< LD	< LD
	555	444 <sup>c</sup>	660 <sup>c</sup>	980 <sup>c</sup>

Fonte: Autora, 2014.

Legenda: <sup>a</sup> Concentração corrigida, Equação 14. <sup>b</sup> Coleta dia 11/09/2013. <sup>c</sup> Coleta dia 03/12/2013.

Em todos os pontos amostrados dos açudes, os compostos cafeína, ciprofloxacina e o dietilestilbestrol não foram detectados, ou ainda, os mesmos se encontravam em uma concentração abaixo do limite de detecção do método. Os hormônios E2 e o EE2 também não foram detectados nos pontos ACA-09, PCT-18, CRG-01 e RIA-10. Esses resultados corroboram com os reportados por Kuster *et al.* (2009) em análises de águas superficiais no Brasil (estado do Rio de Janeiro) para os estrogênios E2, EE2 e DES.

No ponto CPR-01, foi identificado o hormônio EE2, numa concentração de 680 ng/L. Neste ponto não foi detectado o hormônio E2.

No açude Gavião, onde foi realizado duas amostragens, com exceção dos pontos GAV-15 e GAV-16, foram determinados os hormônios E2 e o EE2 em diferentes concentrações. O hormônio E2 foi identificado nos pontos GAV-05, GAV-08 e GAV-14, em concentrações variando de 437 a 906 ng/L. O hormônio EE2 também foi identificado no ponto GAV-14 numa concentração de 980 ng/L.

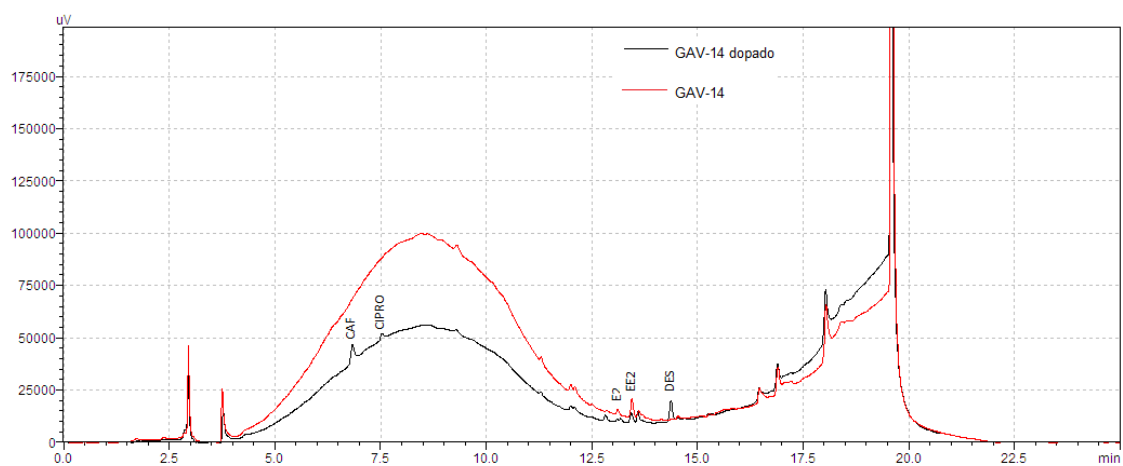
Pessoa (2012) também detectou a presença de E2 (256 ng/L) em amostras de águas superficiais do rio Cocó em Fortaleza-CE. Nos seus estudos Moreira *et al.* (2011) também detectaram a presença do E2 (62,6 ng L<sup>-1</sup>) em amostras de águas superficiais no estado de Minas Gerais. Bicchi *et al.* (2009) reportaram a presença do composto EE2 em corpos receptores próximos à ETEs (2 km a jusante) na concentração máxima de 4381,6 ng/L. Os autores atribuem a elevada concentração do compostos em águas superficiais à elevada



estabilidade aos processos de tratamento, além da clivagem dos estrogênios conjugados para suas formas livres.

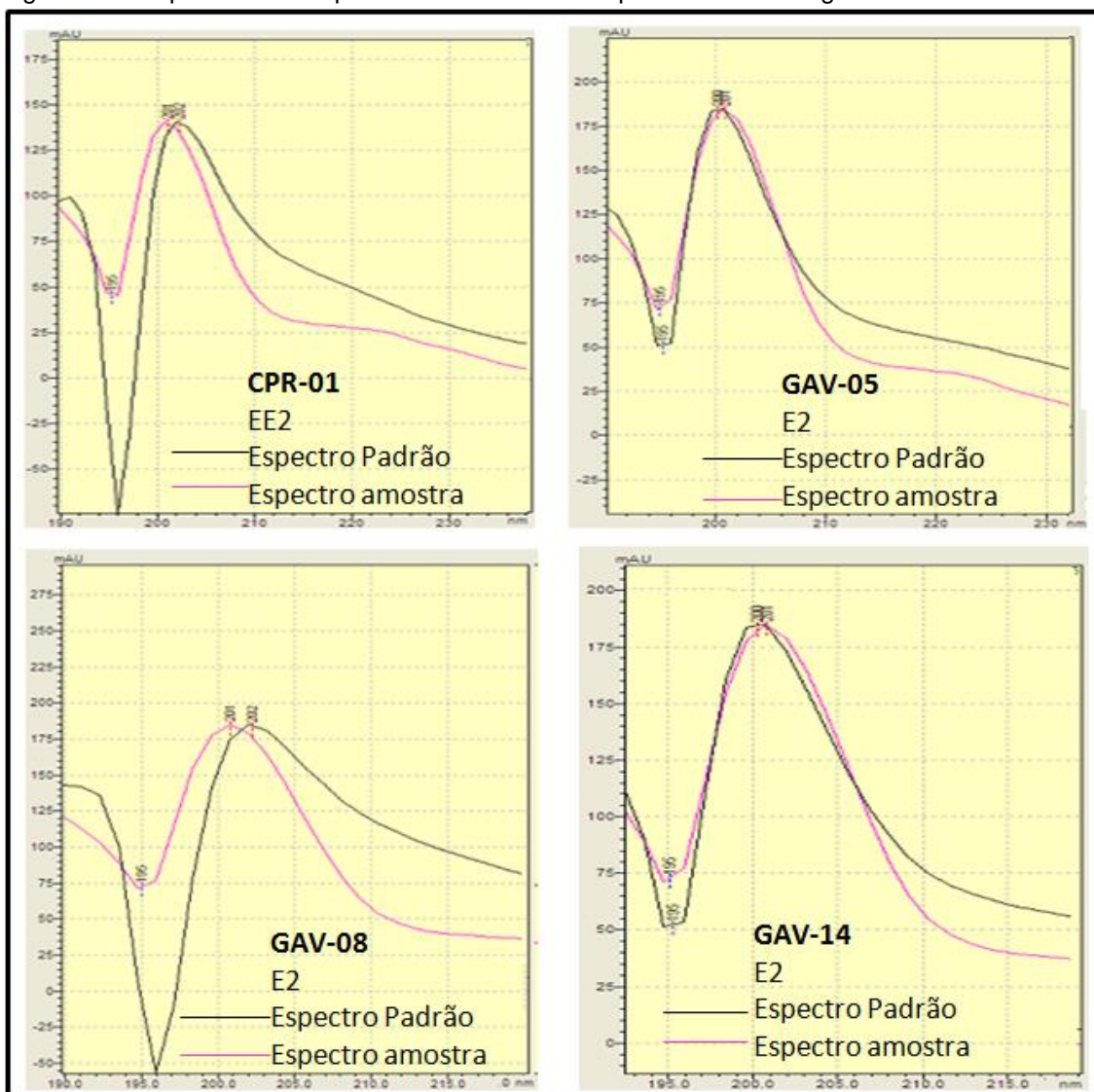
A Figura 43 mostra o cromatograma da análise da amostra do ponto GAV-14 mostrando os picos dos compostos identificados, e a Figura 44 apresenta os espectros dos compostos identificados nos pontos de amostragem comparados com o espectro do composto em solução padrão.

Figura 43 – Cromatograma da análise do ponto GAV-14.



Fonte: Autora, 2014.

Figura 44 – Espectro do compostos identificados nos pontos de amostragem.



Fonte: Autora, 2014.

Os resultados das análises físico-químicas realizadas nos pontos estudados são mostrados da Tabela 33.

Os resultados obtidos indicam a presença de contaminação antropogênica, uma vez que parâmetro fósforo total apresentou valores acima do máximo permitido pela Resolução CONAMA (357/2005) em todos os açudes estudados, sendo as águas superficiais analisadas provavelmente utilizadas como corpos receptores de esgoto *in natura* diretamente ou de seus tributários (BRASIL, 2005).

Tabela 33 – Parâmetros físico-químicos dos pontos amostrados.

Pontos	Condutividade (mS/cm)	Turbidez (UNT)	OD (mg/L)	DBO (mg/L)	Temperatura (°C)	Cloretos (mg Cl <sup>-</sup> /L)	Cor verdadeira (mg Pt/L)	Ferro (mg Fe/L)	pH
ACA-09	397	14	9,36	-	27,6	-	-	-	-
PCT-18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CPR-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RIA-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CRG-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAV-05	0,62 <sup>3</sup>	4,09 <sup>3</sup>	8,18 <sup>3</sup>	4,74 <sup>3</sup>	28,4 <sup>3</sup>	117,54 <sup>3</sup>	10,00 <sup>3</sup>	< LQ <sup>3</sup>	8,14 <sup>3</sup>
GAV-08	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAV-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAV-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAV-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VMP <sup>1</sup>	NE <sup>4</sup>	100 UNT	NE	5 mg/L	NE	250 mg/L	75 mg Pt/L	0,3 mg/L	6 a 9

Fonte: Autora, 2014.

Legenda: <sup>1</sup> Valor máximo permitido segundo Resolução CONAMA n°357/2005 - Classe II Águas Doces (BRASIL, 2005). <sup>2</sup> Coleta dia 11/09/2013. <sup>3</sup> Coleta dia 03/12/2013. <sup>4</sup> Não estabelecido.

Continuação da Tabela 33 – Parâmetros físico-químicos dos pontos amostrados.

Pontos	STD (mg/L)	ST (mg/L)	Sulfato (mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> /L)	Nitrogênio total (mg N/L)	Fósforo total (mg/L)	Ortofosfato (mg P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> /L)	Clorofila a (µg/L)	E. coli (NMP/100 mL)
ACA-09	-	-	-	0,620	0,214	< 0,01	76,36	-
PCT-18	-	-	-	0,674	0,156	-	-	-
CPR-01	-	-	-	0,786	0,159	-	-	-
RIA-10	-	-	-	0,683	0,176	-	-	-
CRG-01	-	-	-	0,949	0,164	-	-	-
GAV-05	-	-	-	0,954 <sup>2</sup>	< 0,013 <sup>2</sup>	< 0,01 <sup>2</sup>	3,31 <sup>2</sup>	-
	412,50 <sup>3</sup>	416,50 <sup>3</sup>	15,00 <sup>3</sup>	0,950 <sup>3</sup>	0,161 <sup>3</sup>	< 0,01 <sup>3</sup>	5,78 <sup>3</sup>	1,000 <sup>3</sup>
GAV-08	-	-	-	1,190 <sup>2</sup>	0,022 <sup>2</sup>	< 0,01 <sup>2</sup>	5,49 <sup>2</sup>	-
	-	-	-	0,367 <sup>3</sup>	0,169 <sup>3</sup>	< 0,01 <sup>3</sup>	1,25 <sup>3</sup>	-
GAV-14	-	-	-	0,805 <sup>2</sup>	0,020 <sup>2</sup>	< 0,01 <sup>2</sup>	7,83 <sup>2</sup>	-
	-	-	-	1,517 <sup>3</sup>	0,183 <sup>3</sup>	< 0,01 <sup>3</sup>	2,49 <sup>3</sup>	-
GAV-15	-	-	-	0,723 <sup>2</sup>	0,029 <sup>2</sup>	< 0,01 <sup>2</sup>	3,47 <sup>2</sup>	-
	-	-	-	1,143 <sup>3</sup>	0,243 <sup>3</sup>	< 0,01 <sup>3</sup>	0,00 <sup>3</sup>	-
GAV-16	-	-	-	1,728 <sup>2</sup>	< 0,013 <sup>2</sup>	< 0,01 <sup>2</sup>	3,72 <sup>2</sup>	-
	-	-	-	0,798 <sup>3</sup>	0,107 <sup>3</sup>	< 0,01 <sup>3</sup>	2,76 <sup>3</sup>	-
VMP <sup>1</sup>	500 mg/L	NE <sup>4</sup>	250 mg/L	1,27 mg/L)	0,030 mg/L	NE	30 µg/L	1000 NMP/100 mL

Fonte: Autora, 2014.

Legenda: <sup>1</sup> Valor máximo permitido segundo Resolução CONAMA nº357/2005 - Classe II Águas Doces (BRASIL, 2005). <sup>2</sup> Coleta dia 11/09/2013. <sup>3</sup> Coleta dia 03/12/2013. <sup>4</sup> Não estabelecido.

## 6 CONCLUSÕES

O desenvolvimento da metodologia analítica para a identificação e quantificação dos poluentes orgânicos emergentes cafeína, ciprofloxacina, 17  $\beta$ -estradiol, 17  $\alpha$ -etinilestradiol e dietilestilbestrol águas superficiais utilizando a técnica de extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos foi realizada com êxito.

As condições cromatográficas estabelecidas para a determinação simultânea dos compostos estudados consistiu de fase móvel formada por acetonitrila (ACN) e água acidificada pH 2, no modo gradiente, com fluxo variando de 1,0 a 2,0 mL/min e temperatura do forno mantida ambiente ( $28 \pm 2$  °C).

O método de extração em fase sólida (SPE) dos analitos foi aperfeiçoada nos parâmetros, material adsorvente, pH, volume de amostra e volume de eluição, através do planejamento fatorial, conseguindo-se uma faixa aceitável de recuperação para os analitos estudados.

Melhores eficiências de extração são alcançadas utilizando-se cartucho com fase sólida octadecilsilano (C18), 500 mL de volume de amostra, pH 3 e volume de eluição igual a 3 mL de MeOH 100%.

O método cromatográfico utilizado foi considerado validado, uma vez que os resultados de seletividade, linearidade, precisão, recuperação e robustez foram satisfatórios quando comparado com valores estimados na literatura.

O ajuste estatístico das equações das curvas de calibração revelou que a análise da regressão linear é significativa, com 95 % de confiança, ou seja, os coeficientes angulares das equações das curvas são diferentes de zero.

O teste de significância dos parâmetros de calibração das equações das curvas de calibração, pelo método da padronização externa, mostrou que os coeficientes lineares das equações das curvas dos compostos cafeína e ciprofloxacina, não apresentaram significância estatística, e foram considerados zero nos cálculos das concentrações dos analitos.

A estratégia do controle de qualidade proposta utilizando um padrão *surrogate* e o fator de relação foi apropriado quando aplicada na determinação dos compostos estudados nas amostras dos açudes.

Nas análises das amostras dos açudes foi detectado a presença dos hormônios 17  $\beta$ -estradiol e 17  $\alpha$ -etinilestradiol numa faixa de concentração entre 437 a 906 ng/L no açude Gavião e no canal Pacoti-Riachão. Os compostos cafeína, ciprofloxacina e dietilestilbestrol não foram detectados ou encontravam-se abaixo do limite de detecção do método.

## **7 RECOMENDAÇÕES**

Acrescentar outros tipos de compostos considerados interferentes endócrinos ao método proposto;

Avaliar a eficiência de tratamento da ETA Gavião na remoção dos compostos considerados interferentes endócrinos;

Aplicar o método em outros tipos de matrizes ambientais, como efluente das estações de tratamento de esgoto e águas subterrâneas;

Realizar estudos ecotoxicológicos com diferentes bioindicadores, como as bactérias luminescentes, os cladóceros (p.e. espécies do gênero *Daphnia*), algas e peixes, avaliando os efeitos dos interferentes endócrinos em diferentes níveis tróficos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Agrotóxicos e afins – Validação de métodos analíticos**. ABNT NBR 14029. 19f, 2005c.
- 2 AGILENT TECHNOLOGIES. The Benefits of a Photodiode Array for UV-Vis Spectroscopy. Disponível em <[http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/instruments-systems/molecular-spectroscopy/8453-uv-vis-diode-array-system/Pages/photodiode\\_array\\_benefits.aspx](http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/instruments-systems/molecular-spectroscopy/8453-uv-vis-diode-array-system/Pages/photodiode_array_benefits.aspx)>. Acesso em: 12 Fevereiro 2013.
- 3 ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extraction – liquid chromatography – diode array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 911, p. 203 – 210, 2001.
- 4 ALDA, M. J. L.; DÍAZ-CRUZ, S.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 503 – 526, 2003.
- 5 AOAC - Association of Official Analytical *Chemists*. **Peer-Verified Methods Program: Manual on Policies and Procedures**, Arlington, VA. 1998.
- 6 ARAÚJO, J. C. **Estudo da eficiência do tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara-SP na remoção de hormônios sexuais**. 2006, 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Química Analítica) – Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Carlos-SP, 2008.
- 7 BAIRD, C. **Química Ambiental**, 2<sup>a</sup> ed., Bookman: Porto Alegre, 2002, cap. 6 e 7.
- 8 BALL, P. Quinolone generations: natural history or natural selection? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 17 – 24, 2000.
- 9 BEAUSSE, J. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p. 753 – 761, 2004.
- 10 BICCHI, C.; SCHILIRÓ, T.; PIGNATA, C.; FEA, E.; CORDERO, C.; CANALE, F.; GILLI, G. Analysis of environmental endocrine disrupting chemicals using the E-screen method and stir bar sorptive extraction in wastewater treatment plant effluents. **Science of Total Environment**, v.407, p. 1842-1851, 2009.
- 11 BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v.26, n.4, p.523-530, 2003.



- 12 BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process**, 1<sup>st</sup> ed., Lewis Publishers, 2003.
- 13 BIZKARGUENAGA, E.; ROS, A.; IPARRAGUIRRE, A.; NAVARRO, P.; VALLEJO, A.; USOBIAGA, A.; ZULOAGA. Solid-phase extraction combined with large volume injection-programmable temperature vaporization–gas chromatography–mass spectrometry for the multiresidue determination of priority and emerging organic pollutants in wastewater. **Journal of Chromatography A**, v. 1247, p.104– 117, 2012.
- 14 BOWER, C. K.; DAESCHEL, M. A. Resistance responses of microorganisms in food environments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 33 – 44, 1999.
- 15 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Resolução RE nº899 de 29/05/2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2003.
- 16 BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Resolução nº. 357/2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente, Brasília, 2005.
- 17 BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria MS Nº 2914/2011**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Ministério da Saúde, Brasília, 2011.
- 18 BROSEUS, R.; VICENTE, S.; ABOULFADL, K.; DANESHVER, A; SAUVÉ, S.; BARBEAU, B; PREVOST, M. Ozone oxidation of pharmaceuticals, endocrines disruptors and pesticides during drink water treatment. **Water Res.** v. 43, p. 4707, 2009.
- 19 CARLSEN, E.; GIWERCMAN, A.; KEIDING, N.; SKAKKEBAEK, N. Evidence for Decreasing Quality of Semen During Past 50 Years. **British Medical Journal**, n.305, p.609-613, 1992.
- 20 CASTIGLIONI, S. *et al.* A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. **Journal of Chromatography A**, v. 1092, p. 206 – 215, 2005.
- 21 CAVALCANTE, R. M.; LIMA, D. M.; FERNANDES, G. M.; DUAVÍ, W. C. Relation factor: A new strategy for quality control in the determination of pesticides in environmental aqueous matrices. **Talanta**, 93, 212 – 218, 2012.

- 22 CÉSAR, I. C.; PIANETTI, G. A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 2, abr/jun, 2009.
- 23 CHEMICALIZE. Disponível em: < <http://www.chemicalize.org/> >. Acesso em dezembro 2014.
- 24 CHEN *et al.* Pharmaceutical and endocrine disruptors in wastewater treatment effluents and in the water supply system of Calgary, Alberta, Canada. **Water Qual. Res. J. Canada**. v. 41, p. 351, 2006.
- 25 CHEN, P.; PAVELIC, P.; DILLON, P.; NAIDU, R. Determination of caffeine as a tracer of sewage effluent in natural waters by SPE-LC-DAD. **Water Research**, v. 36, p. 4830-4838, 2002.
- 26 CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. . **Química Nova**. v. 24, p. 374-380, n. 3, 2001.
- 27 CINQUINA, A., L. *et al.* Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goat milk by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. Optimization and validation. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 221 – 226, 2003.
- 28 COGERH - COMPANHIA DE GESTÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS. **Bacia Hidrográfica Metropolitana – Características Gerais**. Disponível em < <http://portal.cogerh.com.br/categoria2/Ativ-Gerenc-BaciaMetropolitanas-atual1.pdf>>. Acesso em 24 Fevereiro 2013a.
- 29 COGERH - COMPANHIA DE GESTÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS. Disponível em <<http://portal.cogerh.com.br/eixos-de-atuacao/monitoramento-quantitativo-e-qualitativo-dos-recursos-hidricos/>>. Acesso em 21 Abril 2013b.
- 30 COGERH - COMPANHIA DE GESTÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS. Disponível em < [http://portal.cogerh.com.br/nivel-dos-acudes?cod\\_bacia=10&bacia=Bacia%20Metropolitana&dadosboletimunico\\_template%3Amethod=Pesquisar](http://portal.cogerh.com.br/nivel-dos-acudes?cod_bacia=10&bacia=Bacia%20Metropolitana&dadosboletimunico_template%3Amethod=Pesquisar)>. Acesso em 24 Fevereiro 2013.
- 31 COGERH - COMPANHIA DE GESTÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS. **Revisão do Plano de gerenciamento das águas das Bacias Metropolitanas e elaboração dos planos de gerenciamento das águas das bacias do Litoral, Acaraú e Coreaú do estado do Ceará**. 2010, 358 p.
- 32 COGERH - COMPANHIA DE GESTÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS. **Revisão do Plano de gerenciamento das águas das Bacias**

- Metropolitanas, Fase 1: Estudo Básico e Diagnóstico – Relatório Final.** 2010a, 612p.
- 33 COLBORN, T.; DUMANOSKI, D.; MYERS, J. P. O Futuro Roubado. (Tradução: Claudia Buchweitz) Porto Alegre. L&P. 354 p., 1997.
- 34 COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia.** 1. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2006. 453p.
- 35 COSTA, Maria Clélia Lustosa; DANTAS, Eustógio Wanderley Correia [organizadores]. **Vulnerabilidade socioambiental na região metropolitana – Fortaleza.** Edições UFC, 2009. 298 p.
- 36 COSTA, T. M. S.; OLIVEIRA, R. S.; LUNA, A. S. Utilização de planilha eletrônica para calibração instrumental, análise da variância e testes de significância de um método espectrométrico. **Revista Analytica.** p. 46-51, n.21, 2006.
- 37 DASTON, G. P.; GOOCH, J. W.; BRESLIN, W. J.; SHEREY, D. L.; NIKIFOROV, A. I.; FICO, T. A.; GORSUCH, J. W. Environmental estrogens and reproductive health: a discussion of the human and environmental data. **Reproductive Toxicology**, v. 11, n. 4, p. 465-481, 1997.
- 38 DATSENKO, I. S. **Estudo da Qualidade da Água dos Reservatórios do Estado do Ceará.** Relatório não Publicado. Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental da Universidade de Fortaleza do Ceará, Fortaleza, 1999.
- 39 DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Determination of antimicrobial residues and metabolites in the aquatic environment by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, n° 4, p. 973 – 985, 2006.
- 40 DUJAKOVIĆ, N., GRUJIĆ, S., RADIŠIĆ, M., VASILJEVIĆ, T., LAUŠEVIĆ, M. Determination of pesticides in surface and ground waters by liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 678, p. 63 – 72, 2010.
- 41 ECKERT, R.; RANDALL, D. J.; BURGGREN, W. W.; FRENCH, K. **Fisiologia animal: mecanismos e adaptações.** Rio de Janeiro, 729 p., 4ª Ed., 2008.
- 42 FATTA, D.; NIKOLAOU, A.; ACHILLEOS, A.; MERIC, S. Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 515 – 533, 2007.
- 43 FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, p. 122–159, 2006.
- 44 FOLMAR, L. C.; HEMMER, M.; HEMMER, R.; BOWMAN, C.; KROLL, K.; DENSLOW, N. D. Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol

- and diethylstilbestrol in an in vivo, male sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*), vitellogenin bioassay. **Aquatic Toxicology**. v. 49, p. 77-88, 2000.
- 45 FUNCEME - Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos. **Volume armazenado – Reservatórios**. Disponível em <<http://www.hidro.ce.gov.br/reservatorios/volume/nivel-diario>> Acesso em 09 Abril de 2013.
- 46 FUNCEME - Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos. **Volume armazenado – Reservatórios**. Disponível em <<http://www.hidro.ce.gov.br/reservatorios/reservatorios-media-mensal>> Acesso em 09 Abril de 2013.
- 47 GARDINALI, P.R.; ZHAO, X. Trace determination of caffeine in surface water samples by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (LC-APCI-MS). **Environment International**, v. 28, p. 521-528, 2002.
- 48 GEHRING, P. A. F.; SANTOS, O. M. M.; PEREIRA, G. R.; ARAÚJO, M. B.; BONFILIO, R. Estabelecimento de condições para ensaio de dissolução de cápsulas de cinarizina empregando planejamento fatorial. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 455-461, 2011.
- 49 GEROLIN, E. R. R. **Ocorrência e remoção de disruptores endócrinos em águas utilizadas para abastecimento público de Campinas e Sumaré – SP**. 2008, 190 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- 50 GHISELLI, G. **Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP)**. 2006, 181f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- 51 GHISELLI, G.; JARDIM, W.F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v.30, n.3, p.695-706, 2007.
- 52 GIROTTO, G.; NOGUEIRA, K.L.; MOURA, J.A.; SOUZA, J.B.; GIACOMETTI, L.L.; MARCHI, M.R.R.; TOGNOLLI, J.O. Estrógenos em água: otimização da extração em fase sólida utilizando ferramentas quimiométricas. **Eclética Química**, v.32, n.2, p.61-67, 2007.
- 53 GOLOUBKOVA, T.; SPRITZER, P. M. Xenoestrogênios: o exemplo do bisfenol-A. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 44, p. 323 - 329, 2000.

- 54 GUARDABASSI, L.; WONG, D. M. A. L.; DALSGAARD, A. The effects of tertiary wastewater treatment on the prevalence of antimicrobial resistant bacteria. **Water Research**, v. 36, p. 1955 - 1964, 2002.
- 55 GUIA RELACRE Nº 13 (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal). **Validação de métodos internos de ensaio em análise química**. 2000, 50p. Disponível em <<http://www.relacre.pt/assets/relacreassets/files/commissionsandpublications/Guia%20RELACRE%2013.pdf>> Acesso em 16 de Dezembro de 2013.
- 56 GUILLETTE, L. J. J.; PICKFORD, D. B.; CRAIN, D. A.; ROONEY, A. A.; PERCIVAL, H. F. Reduction in Penis Size and Plasma Testosterone Concentrations in Juvenile Alligators Living in a Contaminated Environment. **General and Comparative Endocrinology**, v. 101, p. 32-42, 1996.
- 57 GUYTON, A. C. T. **Tratado de Fisiologia Humana**. Rio de Janeiro, 844 p., 6a Ed., 1996.
- 58 HUBER, L. **Validation and qualification in analytical laboratories**. 2th Ed. Waldbronn: Informa Healthcare, 2007. 303p.
- 59 HUBER, M. M.; KORHONEN, S.; TERNES, T. A.; GUTEN, U. Oxidation of pharmaceuticals during water treatment with chlorine dioxide. **Water Res.** v. 39, p. 3607, 2005.
- 60 INGERSLEV, F.; TORÄNG, L.; LOKE, M. L.; HALLING-SORENSEN, B.; NYHOLM, N. Primary biodegradation of veterinary antibiotics in aerobic and anaerobic surface water simulation systems. **Chemosphere**, v. 44, p. 865 – 872, 2001.
- 61 INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Documento orientativo DOQ-CGCRE-008. 2006.
- 62 IPCE - INSTITUTO DE PESQUISA E ESTRATÉGIA ECONÔMICA DO CEARÁ. **Ceará em Números 2011**. Disponível em <[http://www2.ipece.ce.gov.br/publicacoes/ceara\\_em\\_numeros/2011/completa/Ceara\\_em\\_Numeros\\_2011.pdf](http://www2.ipece.ce.gov.br/publicacoes/ceara_em_numeros/2011/completa/Ceara_em_Numeros_2011.pdf)>. Acesso em 24 Fevereiro 2013.
- 63 IRWIN, L. K.; GRAY, S.; OBERDÖRSTER, E. Vitellogenin induction in painted turtle, *Chrysemys picta*, as a biomarker of exposure to environmental levels of estradiol. **Aquatic Toxicology**, v. 55, p. 49 - 60, 2001.
- 64 JIN, X. *et al.* Determination of 4-tert-cetylphenol, 4-nonylphenol and bisphenol A in surface water from the Haihe River in Tianjin by gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring. **Chemosphere**, v. 56, p.1113-1119, 2004.
- 65 JOHNSON, A. C.; BELFROID, A.; Di CORCIA, A. Estimating steroid estrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on

- their removal from the effluent **Science of the Total Environment**. v. 256, p.163, 2000.
- 66 JONHSON, A. C.; BELFROID, A.; DI CORCIA, A. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. **Science of The Total Environment**, v. 256, p. 163 – 173, 2000.
- 67 JORGENSEN, S. E.; HALLING-SORENSEN, B. Drugs in the environment. **Chemosphere**, v. 40, p. 691-699, 2000.
- 68 KANG, I. J.; YOKOTA, H.; OSHIMA, Y.; TZURUDA, Y.; YAMAGUCHI, T.; MAEDA, M., IMADA, N.; TADOKORO, H.; HONJO, T. Effect of 17  $\beta$ -estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Chemosphere**, v. 47, p. 71, 2002.
- 69 KOESTER, C. J. Trends in Environmental Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 3737 – 3754, 2005.
- 70 KOLÁR, M.; URBÁNEX, K.; LÁTAL, T. Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 17, n. 5, p. 357-363, 2001.
- 71 KOLPIN, D. W.; FURLOG, 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 & Technology**, v. 36, p. 1202 - 1211, 2002.
- 72 KUSTER, M.; ALDA, M. J. L.; HERNANDO, M. D.; PETROVIC, M.; MARTÍN-ALONSO, J.; BARCELÓ, D. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). **Journal of Hydrology**, v. 358, p. 112 - 123, 2008.
- 73 KUSTER, M.; AZEVEDO, D.A.; LOPEZ DE ALDA, M.J.; AQUINO NETO, F.R.; BARCELÓ, D. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). **Environment International**, v. 35, p. 997-1003, 2009.
- 74 LANÇAS, F.M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004a.
- 75 LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: Rima, 2004b. 62p.
- 76 LEE, H.; PEART, T. E.; SVOBADA, M. L. Determination of ofloxacin, norfloxacin, and ciprofloxacin in sewage by selective solid-phase extraction, liquid chromatography with fluorescence detection, and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1139, p. 45-52, 2007.

- 77 LEE, L. S.; STROCK, T. J.; SARMAH, A. K.; SURESH, P.; RAO, C. Sorption and dissipations of testosterone, estrogens and their primary transformation products in soil and sediment. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 18, p. 4098-4105, 2003.
- 78 LEI, B.; HUANG, S.; ZHOU, Y.; WANG, D.; WANG, Z. Levels of six estrogens in water and sediment from three rivers in Tianjin area, China. **Chemosphere**, 76, p. 36 - 42, 2009.
- 79 LIGIERO, C. B. P. *et al.* Comparação entre métodos de quantificação em cromatografia gasosa: um experimento para cursos de química. **Química Nova**, v. 32, p. 1338-1341, n. 5, 2009.
- 80 LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A. Endocrine disruptors in the environment – IUPAC Technical Report. **Pure Applied Chemistry**, v. 75, nº5, p. 631-681, 2003.
- 81 LIU, B.; LIU, X. Direct photolysis of estrogens in aqueous solutions. **Science of the Total Environment**, v. 320, p. 269-274, 2004.
- 82 LIZ, M. V.; NAGATA, N.; PERALTA-ZAMORA, P. Considerações sobre o preparo de amostras contendo micropoluentes estrogênicos. **Química Nova**, v. 35, nº 6, p. 1213 – 1215, 2012.
- 83 LOKE, M. L.; INGERSLEV, F.; HALLING-SORENSEN, B.; TJORNELUND, J. Stability of Tylosin A in manure containing test systems determined by high performance liquid chromatography. **Chemosphere**, v.40, p. 759 – 765, 2000.
- 84 LOPES, L.G.*et al.* Estrogênios em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal – São Paulo. **Química Nova**, v.33, nº3, p. 639 - 643, 2010.
- 85 MADUREIRA, T. V.; ROCHA, M. J.; CASS, Q. B.; TIRITAN, M. E. Development and optimization of a HPLC-DAD method for the determination of diverse pharmaceuticals in estuarine surface Waters. **Journal of Chromatographic Science**, 48, p. 176 – 182, 2010.
- 86 MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: Revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v. 30, p. 99 – 105, 2007.
- 87 MAYER, M.L.; POOLE, S.W.; POOLE, C.F. Retention characteristics of octadecylsiloxane-bonded silica and porous polymer particle-loaded membranes for solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 697, p.89-99, 1995.
- 88 MCKEON, D. M.; CALABRESE, J. P.; BISSONNETTE, G. K. Antibiotic-resistant gram - negative bacteria in rural groundwater supplies. **Water Research**, v. 29, p. 1902-908, 1995.

- 89 MIRANDA, C. D.; CASTILLO, G. Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater. **Science of The Total Environment**, v. 224, p. 167 – 176, 1998.
- 90 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, p. 1452 – 1462, 2011.
- 91 MOREIRA, D.S. **Desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia/espectrometria de massas para avaliação da ocorrência de perturbadores endócrinos em mananciais de abastecimento da região metropolitana de Belo Horizonte**. 2008, 108f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, 2008.
- 92 MOREIRA, M.; AQUINO, S.; COUNTRIN, M.; SILVA, J.; AFONSO, R. Determination of endocrine-disrupting compounds in waters from Rio das Velhas, Brazil, by liquid chromatography/high resolution mass spectrometry (ESI-LC-IT-TOF/MS). **Environmental Technology**, v.32, n.12, 1409-1417, 2011.
- 93 MULROY, A. When the Cure Is the Problem. **Water environment & technology**, v. 13, p. 32 – 37, 2001.
- 94 NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed., Porto Alegre: Bookman, 2010.
- 95 NETO, B. B; PIMENTEL, M. F.; ARAUJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica – Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**. v. 25, p. 856-865, n. 5, 2002.
- 96 OBSERVATÓRIO DAS METRÓPOLES. **Região Metropolitana de Fortaleza**. Disponível em <[http://www.observatoriodasmetrosoles.ufrj.br/como\\_anda/como\\_anda\\_RM\\_fortaleza.pdf](http://www.observatoriodasmetrosoles.ufrj.br/como_anda/como_anda_RM_fortaleza.pdf)>. Acesso em 24 Fevereiro 2013.
- 97 OWEN, T. **Fundamentals of Modern UV-Visible Spectroscopy**. Agilent Technologies, Santa Clara, p. 39 – 43, 1996.
- 98 PANTER, G. H.; THOMPSON, R. S.; SUMPTER, J. P. Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. **Aquatic Toxicology**, v. 42, p. 243 - 253, 1998.
- 99 PASCHOAL, J. A. R. **Resíduos de antimicrobianos em peixe: depleção residual e desenvolvimento de métodos analíticos**. 2007, 174 f. Tese



- (Doutorado em Química analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- 100 PEDROUZO, M.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ, R.M. Estrogens and their conjugates: Determination in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 78, p. 1327-1331, 2009.
- 101 PEREIRA, A. M. P. T. 2009. Dissertação. **Determinação de resíduos de fluoroquinolonas em amostras de tecidos de frangos e respectivo impacto na saúde humana.** (Mestrado em Saúde Pública) - Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra - Portugal, 2009.
- 102 PESSOA, G. P. **Avaliação de desreguladores endócrinos e do micropoluentes colesterol em estações de tratamento de esgoto sanitário.** 2012, 203f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.
- 103 PETERSON, E. W.; DAVIS, R. K.; ORNDORFF, H. A. 17  $\beta$ -Estradiol as an indicator of animal waste contamination in mantled karst aquifers. **Journal of Environmental Quality**, v. 29, n. 3, p. 826-834, 2000.
- 104 PETROVIC, M.; CRUZ, H. M. S.; BARCELÓ, D. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, p. 1 – 14, 2005.
- 105 PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**. v. 19, p. 268-277, n. 3, 1996.
- 106 PIOCOS, E. A.; de la CRUZ, A. A. Solid phase extraction and high performance liquid chromatography with photodiode array detection of chemical indicators of human fecal contamination in water. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 23, p. 1281-1291, 2000.
- 107 PISTOS, C., TSANTILI-KAKOULIDOU, A., KOUPPARIS, M. Investigation of the retention/pH profile of zwitterionic fluoroquinolonas in reversed-phase and ion interaction high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 39, p. 438 – 443, 2005.
- 108 POJANA, G.; GOMIERO, A.; JONKERS, N. Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. **Environment International**. v. 33, p. 929–936, 2007.
- 109 PRAT, M.D.; BENITO, J.; COMPAÑÓ, R.; HERNÁNDEZ-ARTESEROS, J. A.; GRANADOS, M. Determination of quinolones in water samples by

- solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorimetric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1041, p. 27–33, 2004.
- 110 RABOLLE, M.; SPLIID, N. H. Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil. **Chemosphere**, v. 40, p. 715 – 722, 2000.
- 111 RAIMUNDO, C. C. M. **Contaminantes emergentes em água tratada e seus mananciais: sazonalidade, remoção e atividade estrogênica**. 2011, 203 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.
- 112 RAIMUNDO, C.C.M. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. 2007, 108f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- 113 RAMOS, R. O. **Alterações ambientais do Rio Mogi Guaçu e reflexo nas variáveis reprodutivas e indução hormonal no curimatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836)**. 2002. 75 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2002.
- 114 RAO, R. N.; VENKATESWARLU, N.; NARSIMHA, R. Determination of antibiotics in aquatic environment by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, p. 151 – 164, 2008.
- 115 RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n°5, p.771-780, 2004.
- 116 RICHARDSON, S. D. Water analyses: Emerging contaminants and current issues. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 4645 – 4677, 2009.
- 117 RICHARDSON, S. T.; TERNES, T. A. Water analyses: Emerging contaminants and current issues. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 3807 – 3838, 2005.
- 118 RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; ALDA, M.J.L. de; BARCELÓ, D. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1045, p. 85-92, 2004.
- 119 ROSENFELDT *et al.* Destruction of strogenic activity in water using advanced oxidation. **Sci. Total Environ.** v. 377, p. 105, 2007.
- 120 ROSSNER, A; SNYDER, S. A.; KNAPPE, D. R. U. Removal of emerging contaminants of concern by alternative adsorbent. **Water Res.** v.43, p. 3787, 2009.

- 121 SAMANIDOU, V.F.; CHRISTODOULOU, E.A.; PAPADOYANNIS, I.N. Determination of fluoroquinolones in edible animal tissue samples by high performance liquid chromatography after solid phase extraction. **Journal of Separation Science**, 28, p. 555 – 565, 2005.
- 122 SCHAFFER A, M.; BOXBERGER, N. B.; BÖRNICK, H. B.; LICHA, T. A.; WORCH, E. Sorption influenced transport of ionizable pharmaceuticals onto a natural sandy aquifer sediment at different pH. **Chemosphere**, 87, p. 513 – 520, 2012.
- 123 SCHMID, T.; GONZALEZ-VALERO, J.; RUFLI, H.; DIETRICH, D. R. Determination of vitellogenin kinetics in male fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Toxicology Letters**, v. 131, p. 65 – 74, 2002.
- 124 SHARPE, R. M.; SKAKKEBAEK, N. E. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? **Lancet**, v. 341, p. 1392-1395, 1993.
- 125 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.
- 126 SILVA, C. G. A.; 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.
- 127 SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentos de química analítica**. Tradução da 8. ed. Norte-americana. 1. ed., São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- 128 SNYDER, S. A. Occurrence, treatment, and toxicological relevance of EDCs and pharmaceuticals in water. **Ozone: Sci. Eng.** v. 30, p. 65, 2008.
- 129 SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Occurrence os emerging contaminants in brazilian drinking waters: A sewage-to-tap-issue. **Water Air Soil Pollut**, v. 206, p. 57 – 67, 2010a.
- 130 SODRÉ, F. F.; MONTAGNER, M. A. F.; JARDIM, W. F. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais na região de Campinas (SP). **Journal of the Brazilian Society Ecotoxicology**, v. 2, p. 187, 2007.
- 131 SODRÉ, F. F.; PESCARA, I. C.; MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 92 – 98, 2010.
- 132 SOLÉ, M.; RALDUA, D.; BARCELÓ, D.; PORTE, C. Long-term exposure effects in vitellogenin, sex hormones, and biotransformation enzymes in female carp in relation to a sewage treatment works. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, p. 373 – 380, 2003.

- 133 SØRENSEN, B. H.; LÜTZHØFT, H. C. H; ANDERSEN, H. R.; INGERSLEV, F. Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. **Journal of antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 53 – 58, 2000.
- 134 SOUZA, Renata Rodrigues. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de disruptores endócrinos resultantes de atividades antrópicas nas águas da região do rio Paraíba do Sul, SP**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, 2011.
- 135 SUMPTER, J. P. Xenoendocrine disrupters - environmental impacts. **Toxicology Letters**, v. 102-103, p. 337-342, 1998.
- 136 TAMTAM, F.; MERCIER, F.; BOT, B. L.; EURIN, J.; DINH, Q. T.; CLÉMENT, M.; CHEVREUIL, M. Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. **Science of the Total Environment**. v. 393, p. 84-95, 2008.
- 137 TERNES, T. A. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 20, p. 419-434, 2001.
- 138 TERNES, T.A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R-D; SERVOS, M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p.81- 90, 1999.
- 139 TURIEL, E.; BORDIN, G.; RODRÍGUEZ, A., R. Trace enrichment of (fluoro) quinolone antibiotics in surface waters by solid-phase extraction and determination by liquid chromatography – ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1008, p. 145 – 155, 2003.
- 140 USEPA – United States Environmental Protection Agency. Disponível em <<http://www.epa.gov/endo/pubs/edspoverview/edstac.htm>>. Acesso em 25 Abril de 2013a.
- 141 USEPA – United States Environmental Protection Agency. Water: Contaminant Candidate List 3 – CCL. Disponível em <<http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/dws/ccl/ccl3.cfm>> Acesso em dezembro de 2013b.
- 142 USEPA – United States Environmental Protection Agency. Water: Unregulated Contaminant Monitoring Rule 3 (UCMR 3). Disponível em <<http://water.epa.gov/lawsregs/rulesregs/sdwa/ucmr/ucmr3/index.cfm>> Acesso em dezembro 2013c.
- 143 VAZQUEZ, J. L.; BERLANGA, M.; MERINO, S.; DOME`NECH, O.; VINAS, M.; MONTERO, M. T.; HERNAN`NDEZ-BORRELL, J. Determination by fluorimetric titration of the ionization constants of ciprofloxacin in solution

- and in the presence of liposomes. **Photochemistry and Photobiology**, v. 73, p. 14–19, 2001.
- 144 VERBINNEN, R.T.; NUNES, G.S.; VIEIRA, E. M. Determinação de hormônios estrogênicos em água potável usando CLAE-DAD. **Química Nova**, v. 33, nº9, p. 1837 - 1842, 2010.
- 145 VERLIEFDE et al. Priority organic micropollutants in water sources in Flanders and the Netherlands and assessment of removal possibilities with nanofiltration. **Environmental Pollution**, v.146, p. 281-289, 2007.
- 146 VIANA, F. L.; FILHO, J. G. **Utilização de Previsões Climatológicas no Gerenciamento dos Recursos Hídricos do Ceara. O Caso do Abastecimento de Água da Região Metropolitana de Fortaleza**, Companhia de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado do Ceará, COGERH, Fortaleza, CE, 1999.
- 147 WANG *et al.* Investigation of pharmaceuticals in Missouri natural and drink water using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Water Res.** v.45, p. 1818, 2011.
- 148 WANG, Y., HU, W., CAO, Z., FU, X., e ZHU, T. Occurrence of endocrine-disrupting compounds in reclaimed water from Tianjin, China. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.383, p.857–863, 2005.
- 149 WEIGEL, S.; BERGER, U.; JENSEN, E.; KALLENBORN, R.; THORESEN, H.; HUHNERFUSS, H. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. **Chemosphere**, v. 56, p. 583-592, 2004.
- 150 WESTERHOFF *et al.* Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes. **Environ. Scien. Technol.** v.39, p. 6649, 2005.
- 151 YEO, M-K; KANG, M. Photodecomposition of bisfenol A on nanomaterials – sized TiO<sub>2</sub> thin film and the associated biological toxicity to zebrafish (*Danio rerio*) during and after photocatalysis. **Water Res.** v.40, p. 1906, 2006.
- 152 YOUNG, W. J.; STEINER, E. H. **Statistical manual of AOAC - Association of Official Analytical Chemistry**. Washington: AOAC, 1975. 88 p.
- 153 YU-CHEN LIN, A.; LIN, C.; TUNG, H.; CHARY, N. Potential for biodegradation and sorption of acetaminophen, caffeine, propranolol and acebutolol in lab-scale aqueous environments. **Journal of Hazardous Materials**, 183, p. 242–250, 2010.

- 154 ZAFRA, A. *et al.* Gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in urban wastewater. **Water research**, v. 37, p. 735 - 742, 2003.
- 155 ZARZYCKI, P. K.; WŁODARCZYW, E.; BARAN, M. J. Determination of endocrine disrupting compounds using temperature-dependent inclusion chromatography II. Fast screening of free steroids and related low-molecular-mass compounds fraction in the environmental samples derived from surface waters, treated and untreated sewage waters as well as activated sludge material. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7612 – 7622, 2009.
- 156 ZERULLA, M.; LÄNGE, R.; STEGER-HARTMANN, T.; PANTER, G.; HUTCHINSON, T.; DIETRICH, D. R. Morphological sex reversal upon short-term exposure to endocrine modulators in juvenile fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Toxicology Letters**, v. 131, p. 51 – 63, 2002.
- 157 ZHAO, A.J.; JIANG, H.Y.; DING, S.Y.; LI, X.L.; WANG, G.Q.; LI, C.; SHEN, J.Z. A reliable LC method with fluorescence detection for quantification of (fluoro) quinolone residues in chicken muscle. **Chromatographia**, 65, p. 539 - 544, 2007.

## ANEXO A

### Protocolo de análise para determinação de cafeína e compostos endócrinos em água superficiais utilizando SPE e HPLC-DAD.

#### MATERIAIS

- a) Sistema de filtração acoplada à bomba de vácuo (Figura 13);
- b) Membrana de filtro de fibra de vidro de 0,45  $\mu\text{m}$ ;
- c) Ácido clorídrico (HCl) P.A;
- d) pH metro;
- e) Padrão de quantificação ou padrão *surrogate* estrone-2,4-d<sub>2</sub>;
- f) Sistema Manifold conectado a bomba de vácuo (Figura 12);
- g) Cartucho comercial com fase estacionária do tipo octadecilsilano (C-18) de 500 mg/ 6mL;
- h) Acetonitrila (ACN) grau HPLC;
- i) Metanol (MeOH) grau HPLC;
- j) Água ultrapura de sistema Milli-Q;
- k) Frascos do tipo *ependorf* ou do tipo *vial*;
- l) Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) acoplado a um detector na região do ultravioleta e visível com arranjo de diodos;
- m) Coluna de fase reversa octadecilsilano (C-18), de 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula.

#### SEQUÊNCIA DE EXECUÇÃO DO MÉTODO

##### 1. Preparo da amostra

Filtrar 500 mL da amostra através de membrana de filtro de fibra de vidro de 0,45  $\mu\text{m}$ ;

Acidificar a amostra filtrada com HCl utilizando pH metro até pH 3;

Dopar a amostra filtrada e acidificada com 5,0 mg/L do padrão *surrogate* estrone-2,4-d<sub>2</sub>.

## 2. Extração em fase sólida – SPE

Condicionar o cartucho de extração C-18 na seguinte ordem: percolar 5,0 mL de ACN 100%, seguido de 5,0 mL de MeOH 100% e 5,0 mL de água ultrapura. O condicionamento pode ser realizado utilizando uma seringa descartável comum ou por gravidade;

Após o condicionamento, secar o cartucho à vácuo utilizando o sistema Manifold por aproximadamente 30 segundos;

Realizar a percolação dos 500 mL da amostra pelo cartucho C-18 utilizando o sistema Manifold com vazão constante de 2 mL/min;

Após percolação da amostra, secar o cartucho C-18 sob vácuo durante 5 minutos;

Finalmente, realizar a eluição utilizando 1,0 mL de MeOH 100%, seguido de mais 1,0 mL de MeOH 100%. A eluição deve ser realizada por gravidade;

O extrato pode ser coletado em tubos do tipo *ependorf* ou frascos do tipo *vial*.

## 3. Análise em HPLC – DAD

A fase móvel deve ser constituída de acetonitrila grau HPLC e água ultrapura acidificada em pH 2;

O programa de gradiente de eluição é apresentado na Tabela 16 e consiste em: aumento de 10 até 50% de ACN em 10 minutos. Em seguida, durante 7 minutos, essa proporção aumenta para 100% de ACN, retornando a 10% de ACN em 8 minutos, totalizando 25 minutos de corrida cromatográfica;

O fluxo inicial é de 1,0 mL/min e após 10 minutos de corrida o fluxo é aumentado para 2,0 mL/min, a temperatura do forno é mantida a temperatura ambiente ( $28 \pm 2$  °C);

Utilizar 20 µL como volume de injeção para todas as análises;

Injetar, pelo menos, 3 vezes MeOH grau HPLC antes de injetar as amostras (branco);



Finalmente, injetar o extrato da amostra, também em triplicata.