



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARIA NATANIELA DA SILVA

DETERMINAÇÃO DE DESREGULADORES
ENDOCRINOS NA ÁGUA E NO SEDIMENTOS DO
AÇUDE SANTO ANASTÁCIO NA CIDADE DE
FORTALEZA/CE

FORTALEZA

2016

MARIA NATANIELA DA SILVA

DETERMINAÇÃO DE DESREGULADORES ENDOCRINOS
NA ÁGUA E NO SEDIMENTOS DO AÇUDE SANTO
ANASTÁCIO NA CIDADE DE FORTALEZA/CE

Dissertação submetida à Comissão Julgadora do
Curso de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal do Ceará, como um dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientadora: Dra. Helena Becker

Co-orientador: Dr. Ronaldo F. do Nascimento

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S581d Silva, Maria Nataniela da.

Determinação de desreguladores endócrinos nas águas e sedimentos do açude Santo Anatócio na cidade de Fortaleza/CE / Maria Nataniela da Silva. – 2016.
95 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Helena Becker.

Coorientação: Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento.

1. Desreguladores endócrinos. 2. Açude Santo Anastácio. 3. SPE. 4. QuEChERS. 5. HPLC – DAD. I. Título.

CDD 540

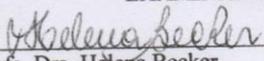
Esta Dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química Analítica, outorgada pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.



Maria Nataniela da Silva

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 24/02/2016.

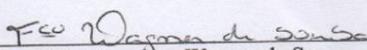
EXAMINADORES:



Profa. Dra. Helena Becker
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Francisco Wagner de Sousa
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – IFCE

À Deus.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, força e coragem para enfrentar os obstáculos na realização desse desafio...

À minha mãe pelo amor sem limites. Minha irmã, meu sobrinho Pablo, pela compreensão nos momentos de ausência

A grande orientadora e profissional brilhante, Profa. Dra. Helena Becker, meu profundo agradecimento pelos conhecimentos adquiridos, apoio incondicional, paciência, confiança, respeito, conselho e por muitas vezes o colo de mãe...

Ao Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento, pela co-orientação, pela oportunidade concedida para realização deste trabalho e disponibilidade do laboratório, por acreditar em meu potencial desde o tempo da graduação.

A minha amiga Carla Vidal (Carlinha), o meu mais sincero e profundo agradecimento, por todos os momentos de apoio e paciência no desenvolvimento do método e pesquisa, muito obrigada.

A Letícia, aquela que foi meus braços direito e esquerdo, por ter desempenhado o seu trabalho com responsabilidade e competência além do esperado...

A todos do LAQA, pela caracterização das amostras de água e sedimento, em especial a Clara, Herivelto e Samuel pelo apoio durante as coletas, sem vocês elas não teriam sido realizadas. A vocês, o meu muito obrigada.

A Giselle, ter uma amiga como você não tem preço.

Ao Jhonyson, pelos conhecimentos compartilhados, na operação do HPLC.

À minha amiga que sempre me proporciona momentos de descontração e torce por mim, Mayza. Obrigada pela forma alegre e agradável que compartilhamos cada uma de nossas vitórias.

À minha querida amiga Crisiana, por sua preocupação e apoio em todos os momentos, acadêmicos, profissionais e pessoais, muito obrigada, pelo carinho e amizade sincera.

À amizade conquistada ao longo de todo trabalho no LANAGUA Janmylle, muito obrigado por seus abraços, por sua presença doce e meiga.

Ao Lucas, por sua amizade, momentos de descontração, desabafos e ajuda.

Ao Mário, por sua amizade e apoio nos momentos da qualificação.

Ao 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 Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa concedida.

Ao LANAGUA, novamente ao professor Ronaldo, por disponibilizar o espaço físico, material de pesquisa e equipamentos para realização deste trabalho.

Enfim, a todos aqueles que colaboraram de forma direta ou indiretamente para execução deste trabalho.

“Plante amor e paz e a vida trará colheita de paz e amor.”

Chico Xavier

RESUMO

Estrógenos naturais e sintéticos são naturalmente excretados por seres humanos e alguns vertebrados. Estes contaminantes emergentes classificados como desreguladores endócrinos (DEs) presentes, mesmo em pequenas quantidades, na água e no sedimento são capazes de afetar o sistema endócrino e as fases de crescimento e reprodução de organismos aquáticos e humanos. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivos efetuar uma caracterização físico-química e microbiológica da água do açude Santo Anastácio, localizado no Ceará, Brazil, além de desenvolver e validar um método analítico empregando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de diodos (HPLC-DAD) para determinação da cafeína e dos hormônios estrona, 17β -estradiol, estriol (naturais) e 17α -etinilestradiol (sintético) na água e no sedimento do açude mencionado. Os parâmetros físico-químicos avaliados foram fósforo, clorofila A, feofitina, nitrogênio, cloreto, sulfeto, dureza, cálcio, magnésio, pH, alcalinidade, turbidez e sólidos totais e dissolvidos. A caracterização microbiológica avaliou a presença de coliformes totais e termotolerantes. Para a determinação dos DEs por HPLC-DAD utilizou-se as técnicas de extração em fase sólida (SPE) para a amostra de água e QuEChERS para a amostra de sedimento. Os resultados das análises físico-químicas indicaram valores acima do permitido pelo CONAMA 357/05, para classe 2, apenas para fósforo e sulfeto. A caracterização microbiológica indicou a presença de coliformes muito acima dos valores estipulados pelo CONAMA. Na determinação dos DEs foram detectados as concentrações de 0,54 a 0,93 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cafeína na água, e, 0,76 a 4,94 mg kg^{-1} do 17β estradiol e estriol no sedimento. Diante disso, a água do açude encontra-se inadequada para consumo direto e recreação dentro da legislação vigente. O método analítico validado mostrou-se eficiente para determinação dos analitos podendo ser utilizado para análises de rotina uma vez que não existe legislação para a cafeína e os DEs.

Palavras-chave: Desreguladores Endócrinos. Açude Santo Anastácio. SPE. QuEChERS. HPLC – DAD.

ABSTRACT

Natural and synthetic estrogens are naturally excreted by humans and some vertebrates. These emerging contaminants classified as endocrine disruptors (EDs) present, even in small quantities, in water and sediment are able to affect the endocrine system and the stages of growth and reproduction of aquatic organisms and humans. In this context, this study aimed to perform a physical-chemical and microbiological characterization of reservoir water from *Santo Anastácio*, located in Ceará, Brazil, and the develop and validate an analytical method using High-performance liquid chromatography with detector diode array (HPLC-DAD) for the determination of caffeine (CAF) and estrone hormones, 17β -estradiol, estriol (natural) and 17α -ethinylestradiol (synthetic) for water and sediment phase of reservoir water studied. The physicochemical parameters evaluated were phosphorus, chlorophyll A, pheophytin, nitrogen, chloride, sulfide, hardness, calcium, magnesium, pH, alkalinity, turbidity and total and dissolved solids. Microbiological characterization evaluated the presence of total and fecal coliforms. For the determination of EDs by HPLC-DAD was used to extract solid phase techniques (SPE) for water sample and QuEChERS for the sediment sample. The results of physicochemical analyzes indicated above the allowed values by CONAMA 357/05 for class 2, only to phosphorus and sulfide. Microbiological characterization indicated the presence of coliforms far above the values stipulated by CONAMA. In determining the DEs concentrations from 0.54 to 0.93 $\mu\text{g L}^{-1}$ were detected caffeine in water, and 0.76 to 4.94 mg kg^{-1} 17β estradiol and estriol in the sediment. Therefore, the water reservoir is unsuitable for direct consumption and recreation within the law. The validated analytical method was efficient for the determination of analytes can be used for routine analysis since there is no legislation to caffeine and EDs.

Keywords: Endocrine Disruptors. Weir *Santo Anastacio*. SPE. QuEChERS. HPLC - DAD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura básica dos hormônios esteroides.	21
Figura 2: Estrutura química dos estrógenos naturais e sintético.	21
Figura 3: Faixa de aplicação da HPLC e GC.....	29
Figura 4: Esquema da extração em fase sólida (SPE).	30
Figura 5: Representação das principais etapas do método QuEChERS.....	34
Figura 6: Açude Santo Anastácio (ASA) /Açude da Agronomia.....	43
Figura 7: Mapa indicando o sistema integrado canal-reservatório (Santo Anastácio)...	44
Figura 8: Captura de peixes.....	45
Figura 9: Coleta das amostras de água superficial.	47
Figura 10: Coleta das amostras de sedimento.	48
Figura 11: HPLC/DAD (SHIMADZU) utilizado na determinação dos compostos.....	50
Figura 12: Metodologia de extração e pré-concentração para as amostras de água.....	51
Figura 13: Bomba à vácuo utilizado na etapa de filtração.	52
Figura 14: Esquema da extração em fase sólida (SPE).	53
Figura 15: Extração em fase sólida (SPE).	54
Figura 16: Esquema dos procedimentos realizados na validação da extração por SPE.	55
Figura 17: Método para determinação de estrógenos nas amostras de sedimento.	56
Figura 18: Estrutura bidentada da amina primária secundária (PSA).	57
Figura 19: Cromatogramas do branco e da amostra dopada com $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos analitos de interesse.	66
Figura 20: Comparação visual das curvas analíticas no solvente metanol e na matriz água.	68
Figura 21: Comparação visual das curvas analíticas no solvente acetonitrila e na matriz sedimento.	69
Figura 22: Curvas analíticas obtidas para a matriz água.	70
Figura 23: Curvas analíticas obtidas para a matriz sedimento.	71
Figura 24: Resultados de recuperação média ($n = 5$) e coeficiente de variação (CV%) /níveis de concentração ($120 \mu\text{g L}^{-1}$, $12,8 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1,6 \mu\text{g L}^{-1}$) para a matriz água.	74
Figura 25: Resultados de recuperação média ($n = 3$), para a matriz sedimento.	76
Figura 26: Comparação visual do efeito de matriz na matriz água.	78
Figura 27: Comparação visual do efeito de matriz para a matriz sedimento	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Excreção diária dos estrógenos por humanos (mg/dia/indivíduo).....	22
Tabela 2: Propriedades físico-químicas dos estrógenos de interesse.	24
Tabela 3: Propriedades físico-químicas do composto Cafeína.....	26
Tabela 4: Parâmetros analisados.	49
Tabela 5: Gradiente de eluição do método empregado para análise dos compostos.....	51
Tabela 6: Propriedades Físico-Químicas dos cartuchos de SPE.	53
Tabela 8: Caracterização da amostra de água.....	63
Tabela 9: Resultados percentual de matéria orgânica na amostra de sedimento.....	65
Tabela 10: Valores dos tempos de retenção da solução multielementar de concentração 10,0 µg mL ⁻¹	66
Tabela 11: Resultados obtidos para as curvas analíticas construídas sem e com superposição de matriz.	67
Tabela 12: Resultados obtidos para as curvas analíticas dos analitos construídas sem e com superposição de matriz.	69
Tabela 13: LD e LQ para a matriz água.	71
Tabela 14: LD e LQ para a matriz sedimento.	72
Tabela 15: Resultados de recuperação média (n = 5) e coeficiente de variação (CV%) para a matriz água.	73
Tabela 16: Resultados de recuperação média (n = 3) e coeficiente de variação (CV%) para a matriz sedimento.	75
Tabela 17: Efeito matriz (%) dos compostos estudados na matriz água.	77
Tabela 18: Efeito matriz (%) dos compostos estudados na matriz sedimento.	78
Tabela 19: Concentração dos DEs e do estimulante cafeína no sedimento.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN Acetonitrila

C18 Octadecilcilano

DAD Diode Array Detection

DEs Desreguladores Endócrinos

E1 Estrona

E2 17 β -estradiol

E3 Estriol

EDCs Endocrine Disrupting Compounds or Chemicals

EDs Endocrine Disruptors

EE2 17 α -etinilestradiol

ETA Estação de Tratamento de Água

ETE Estação de Tratamento de Esgotos

FM Fase Móvel

GC Gás Chromatography

HPLC High Pressure Liquid Chromatography

IE Interferente Endócrino

Kow Coeficiente de Partição octanol/água

LANAGUA Laboratório Núcleo de Águas

LAQA Laboratório de Química Ambiental

LAT Laboratório de Análise de Traços

MeOH Metanol

MgSO₄ sulfato de magnésio anidro

NaCl cloreto de sódio

PSA Amina primaria secundária

pKa Constante de Dissociação Ácida

ϕ Solubilidade em Água

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Desreguladores Endócrinos (DEs)	19
2.2 Hormônios Estrógenos naturais e sintéticos	20
2.3 Cafeína	26
2.4 Métodos analíticos utilizados na determinação dos estrogênios e da cafeína	27
2.5 Método de extração e pré-concentração dos analitos	29
2.5.1 Extração em fase sólida (SPE)	30
2.5.2 Métodos de extração dos compostos no sedimento	32
2.6 Validação do Método	34
2.6.1 Seletividade	35
2.6.2 Linearidade.....	35
2.6.3 Sensibilidade	36
2.6.4 Limite de detecção (LD)	37
2.6.5 Limite de quantificação (LQ).....	37
2.6.6 Precisão	38
2.6.7 Exatidão.....	39
2.6.8 Avaliação do Efeito Matriz	39
3. OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo Geral	41
3.2 Objetivos específicos	41
4. METODOLOGIA	42
4.1 Padrões analíticos, solventes e reagentes	42
4.2 Área de estudo	42
4.3 Amostragem	45
4.3.1 Coleta	46
4.4 Caracterização das Amostras	48
4.4.1 Caracterização da amostra de água superficial	48
4.4.2 Caracterização da amostra de sedimento	49
4.5 Determinação dos desreguladores endócrinos e do estimulante cafeína	49
4.5.1 Determinação dos analitos de interesse presentes na amostra	49
4.5.2 Método para extração e análise dos compostos em água superficial	51
4.5.3 Método para extração e análise dos compostos no sedimento	55

4.6 Validação do método analítico	57
4.6.1 Seletividade	58
4.6.2 Faixa de trabalho, linearidade e sensibilidade.....	58
4.6.3 Limite de detecção e quantificação	60
4.6.4 Repetibilidade	60
4.6.5 Exatidão.....	61
4.6.6 Efeito Matriz	62
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	62
5.1 Caracterização da amostra de água superficial.....	62
5.2 Caracterização da amostra de sedimento superficial.....	65
5.3 Validação do método	65
5.3.1 Seletividade	65
5.3.2 Linearidade.....	67
5.3.3 Sensibilidade	70
5.3.4 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)	71
5.3.5.Exatidão.....	73
5.3.6 Avaliação do Efeito Matriz	76
5.4 Análise dos interferentes endócrinos e da cafeína na amostra ambiental..	80
6. CONCLUSÃO.....	81
7. REFERÊNCIAS	83

1. INTRODUÇÃO

O crescimento populacional e o avanço da ciência inseriram no mercado uma variedade de compostos ou substâncias químicas com os mais variados usos, tais como medicamentos de várias classes, produtos de higiene pessoal e defensivos agrícolas, entre outros, os quais tem se tornado uma preocupação, mediante as condições de saneamento em que a maioria dos países se encontra. Quando dispostos no meio ambiente, mesmo em baixas concentrações, na faixa de μg e ng , possuem potencial para causar danos ambientais tanto para o ser humano e seus descendentes, como para a fauna aquática.

Debates políticos e o interesse científico tem crescido nas últimas duas décadas, sobre os potenciais efeitos adverso causados pela exposição a um grupo de produtos químicos que são capazes de alterar o funcionamento normal do sistema endócrino da fauna silvestre e, potencialmente, dos seres humanos (WHO, 2002). Esse assunto emergiu devido ao aumento na detecção de anomalias, problemas de infertilidade e aumento na taxa de câncer nos órgãos reprodutores (CRAIN *et al.*, 2008; EERTMANS *et al.*, 2003).

Embora já existissem, desde o início do século XX, hipóteses prevendo alterações no funcionamento do sistema endócrino de algumas espécies animais expostas a determinadas substâncias químicas tóxicas, apenas recentemente esta importante questão tem recebido atenção por parte da comunidade científica, principalmente devido ao número crescente de publicações que relatam o aumento da incidência de disfunções no sistema endócrino de seres humanos (incluindo a infertilidade masculina) e, mais significativamente, efeitos fisiológicos adversos observados em espécies animais para as quais a relação causa/efeito é mais evidente (BILLA, 2007).

A Organização Mundial de Saúde (2002) através do Programa Internacional de Segurança Química definiu esse grupo de compostos químicos como Disruptores Endócrinos (DE), sendo a definição:

“Um disruptor endócrino em potencial é uma substância ou mistura exógena que possui propriedades que podem gerar uma desordem no sistema endócrino de um organismo sadio, ou seus descendentes, ou (sub) populações. ”

Neste trabalho, o termo desregulador endócrino (DE) será utilizado como sinônimo de perturbadores endócrinos, disruptores endócrinos, interferentes

endócrinos, que na literatura internacional corresponde aos *endocrine disrupting chemicals* ou *endocrine disrupting compounds* (EDC).

Os principais DEs podem ser classificados com substâncias naturais ou sintéticas, dentre os quais podem ser citados: herbicidas como atrazina; subprodutos da degradação de alquilfenóis polietoxilados como 4-nonilfenol (NP); hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA); aditivos plastificantes como dietilhexilftalato (DEHP); compostos industriais como bisfenol A (BPA); metais pesados como cádmio, mercúrio e chumbo; hormônios sintéticos como dietilestilbestrol (DES) e 17 α -etinilestradiol (EE2); fitoestrogênios como genisteína e metaresinol e os hormônios naturais estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e estriol (E3) (BILA e DEZOTTI, 2007; PESSOA 2012).

Os principais compostos que apresentam elevada atividade estrogênica são os hormônios naturais E1, E2 e E3, e o hormônio sintético EE2, principal substância ativa do contraceptivo oral (PESSOA 2012).

Devido a sua incompleta remoção nos processos convencionais de tratamento, e ao lançamento indevido de esgotos in natura, esses compostos chegam a rede de abastecimento pública. Com o aumento populacional e das taxas de urbanização verificadas nas cidades, espera-se um aumento dos volumes de esgoto gerados e da quantidade de estrogênios lançados continuamente em corpos receptores, muitos dos quais possuem baixa capacidade de diluição (WATKINSON *et al.*, 2007).

A maioria dos DEs possui características lipofílicas e, frequentemente, apresentam baixa biodegradabilidade no ambiente, apresentando um grande potencial para bioacumulação e persistência no ambiente (LINTELMANN *et al.*, 2003; de MES *et al.*, 2005; CARBALLA *et al.*, 2007).

Um dos principais desafios no monitoramento dos DEs em matrizes ambientais é a dificuldade em encontrar métodos analíticos confiáveis, principalmente devido às baixas concentrações em que se encontram no meio ambiente. Atualmente, entre os métodos de análise mais utilizados, a cromatografia gasosa e a líquida de alta eficiência, em conjunto com a espectrometria de massa, têm sido as técnicas mais utilizadas na separação, identificação e quantificação dos DEs. No entanto, trata-se de equipamentos que apresentam custo elevado e requerem mão de obra qualificada, dificultando assim, o acesso a estes equipamentos, por muitas instituições de pesquisa. Desta forma, a disponibilização de métodos analíticos

confiáveis, utilizando equipamentos de menor custo e maior facilidade na operação, atua como um estímulo à pesquisa dos DEs, ampliando o campo de atuação de diversas instituições e contribuindo para o desenvolvimento científico na região, pois embora não contemplados na legislação, os DEs apresentam características nocivas ao meio ambiente e requerem atenção por parte da sociedade e comunidade científica (MACHADO, 2010).

Segundo a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico realizada em 2008 (IBGE, 2010) 74,4% dos municípios brasileiros utilizam rios como corpos receptores, evidenciando assim a importância da análise do impacto dos efluentes nesses corpos d'água. A poluição de água doce consiste numa diminuição da disponibilidade da quantidade de água para o abastecimento público, fato extremamente crítico no nordeste do Brasil, que já sofre de escassez. Com o intuito de suprir estas necessidades, os rios são usados como fonte de abastecimento de água e, geralmente, existe a necessidade de regular o fluxo em períodos de seca. Com esse propósito, muitos rios são barrados para criar acumuladores de água ou reservatórios, que são os açudes ou reservatórios que são definidos como um conjunto constituídos por barragem ou barramento de um curso d'água e o respectivo reservatório ou lago formado (OLIVEIRA 2013). Uma das características das lagoas e dos açudes é a sua utilização como fonte de recreação pela comunidade, além de seu uso como produtor de alimento, e de água para saciar a sede e cozinhar. A Lei nº 9.433, de 08.01.1997, instituiu a Política Nacional de Recursos Hídricos e criou o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos e no seu Art. 1º determina que o uso prioritário da água é para abastecimento humano, em caso de escassez, ou falta de água (BRASIL, 1997).

Dentro dessa definição está o açude Santo Anastácio (ASA) objeto do presente estudo, localizado no Campus do Pici (UFC), Fortaleza-CE.

Portanto, diante dessa contextualização e tendo em vista a crescente preocupação ambiental dedicada aos desreguladores endócrinos, este trabalho tem por objetivo verificar a ocorrência do estimulante cafeína (CAF), que pode ser usado como um indicativo de contaminação por atividade humana, dos hormônios estrógenos naturais Estrona (E1), 17β-estradiol (E2), Estriol (E3) e o hormônio sintético 17α-etinilestradiol (EE2) em águas superficiais, utilizando a técnica de extração em fase sólida (SPE), e extração sólido-líquido QuEChERS para sedimentos

do açude Santo Anastácio com detecção por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (HPLC-DAD).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Desreguladores Endócrinos (DEs)

Muitas definições têm sido propostas para os desreguladores endócrinos (DEs). Entretanto, em todas elas existe um ponto em comum: trata-se de uma substância química que pode interferir no funcionamento natural do sistema endócrino de espécies animais, incluindo os seres humanos. Alguns pesquisadores definem um desregulador 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; JARDIM 2007).

Os interferentes endócrinos como outras classes de poluentes ambientais apresentam uma variedade de fontes (BAIRD; CANN 2002; GHISELLI; JARDIM 2007), tais podem ser classificadas como pontuais, descargas diretas para o corpo hídrico, apresentam um ponto de entrada no meio ambiente bem caracterizado, geralmente através dos cursos d’água. Como exemplo, pode-se citar as descargas de efluentes industriais e esgotos domésticos, derramamentos acidentais, atividades de mineração, enchentes, dentre outras (GHISELLI; JARDIM 2007). Por outro lado, existem as fontes não pontuais, 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. As fontes não pontuais são mais difíceis de serem controladas uma vez que o ponto de entrada dos poluentes não é identificado (BIRKETT e LESTER, 2003; GHISELLI e JARDIM, 2007).

Estas substâncias podem ser divididas em duas classes:

- Substâncias naturais: estrogênios presentes em nosso organismo, 17 β -estradiol (E2), estrona (E1) e estriol (E3) e os fitoestrogênios, como a genistéina e metarenisol.
- Substâncias sintéticas: como pesticidas, herbicidas, fungicidas e moluscicidas; 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 α -etinilestradiol (EE2) (BILA e DEZOTTI, 2007).

Dentre esses contaminantes, os hormônios estrógenos naturais e sintéticos têm merecido a atenção da comunidade científica, uma vez que são excretados naturalmente por todas as fêmeas de mamíferos, incluindo os humanos e ingeridos em formulações de fármacos. A expansão populacional faz com que haja uma alta e constante introdução destas substâncias no ambiente (BIRKETT e LESTER, 2003; GHISELLI e JARDIM, 2007).

Cabe salientar que sua persistência no ambiente e capacidade de causar possíveis efeitos adversos está relacionada ao fato de serem continuamente introduzidos, como resultado de processos industriais, descarte de produtos comerciais ou através da sua excreção na forma conjugada, livre ou metabolizada (TADEO, 2012; DIRTU et al., 2012).

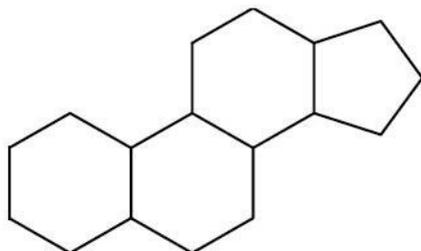
2.2 Hormônios Estrógenos naturais e sintéticos

Os hormônios esteroides são produzidos a partir do colesterol e podem ser classificados em três grupos: hormônios sexuais femininos (estrógenos), hormônios sexuais masculinos (andrógenos) e hormônios da gravidez (progestrôgenos) (REIS FILHO et al., 2006).

Os hormônios sexuais femininos ou estrógenos são definidos como uma família de hormônios responsáveis pelo desenvolvimento das características secundárias femininas e funções de reprodução. Assim como todos os esteroides, os estrógenos possuem o mesmo núcleo de anéis semelhantes ao colesterol (AZCOITIA et al., 2011. BEZERRA 2014).

A Figura 1 ilustra a estrutura, que consiste em três anéis hexagonais (A, B e C) e um pentagonal (D). Estrógenos esteroides são caracterizados pela presença de uma hidroxila na posição 3 do anel A.

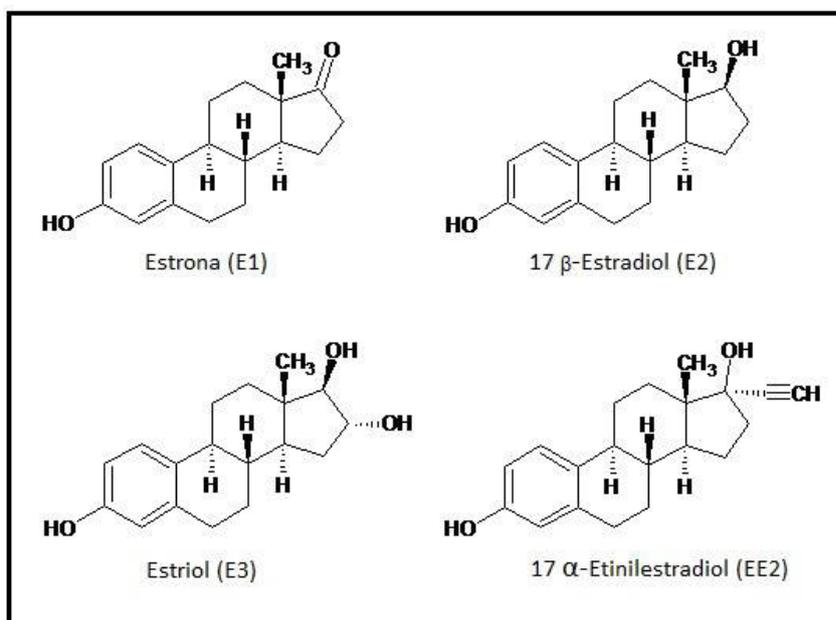
Figura 1: Estrutura básica dos hormônios esteroides.



Fonte: Adaptado de Bezerra (2014).

Nos estrógenos naturais, são adicionados grupos hidroxila e carbonila no anel pentagonal (D) nas posições 17 e 16, enquanto grupos etinil são encontrados na estrutura do estrógeno sintético (posição 17 do anel pentagonal), 17- α -etinilestradiol, um dos principais componentes dos medicamentos contraceptivos (Figura 2).

Figura 2: Estrutura química dos estrógenos naturais e sintético.



Fonte: Adaptado de Bezerra (2014).

Os estrógenos naturais fazem parte de um grupo de hormônios esteroides lipofílicos produzidos principalmente nos ovários e nos testículos em humanos e outros vertebrados, originários do colesterol ou acetil coenzima-A (TAPIERO et al., 2002; TAIEB e LACHGAR-KELTOUM, 2011). O 17 β -estradiol é estrógeno mais abundante e potente, de ocorrência natural nos seres humanos, estimula o desenvolvimento do endométrio e influencia a libido, seguido pelos hormônios estrona e estriol (principal produto de degradação do hormônio 17 β -estradiol) (PESSOA2012). Segundo Nakamura e colaboradores (2002), o 17 β -estradiol é doze vezes mais ativo que a estrona e oitenta vezes mais que o estriol.

Estes hormônios são metabolizados por glucuronidação ou sulfatação, e os conjugados, solúveis em água, são excretados diariamente por mamíferos do sexo feminino e em menor quantidade pelos do sexo masculino pela urina, na forma conjugada, biologicamente inativa e, em menor proporção nas fezes, na forma livre. Os hormônios conjugados são inativos, pois perdem completamente a capacidade de ligação ao receptor estrogênico (LUCCI et al., 2011), entretanto podem ser subsequentemente transformados em seus correspondentes esteroides livres, biologicamente ativos (LaFLEUR e SCHUG, 2011; TADEO et al., 2012). A Tabela 1 apresenta dados de excreção de estrógenos por humanos.

Tabela 1: Excreção diária dos estrógenos por humanos (mg/dia/indivíduo)

Hormônio	Mulheres em idade reprodutiva	Mulheres durante a gravidez
Estrona	5,0 -31	600-940
17 β Estradiol	3,0-19	170-330
Estriol	4,0-33	4500-6500

Fonte: Combalbert e Hernandez - Raquet. (2010).

Os estrógenos sintéticos, encontrados em produtos farmacêuticos, são hormônios que tiveram suas estruturas moleculares alteradas. Estes compostos têm a tendência de serem mais potentes do que os estrógenos naturais e conseqüentemente, mais ativos (RAIMUNDO, 2007). Os derivados sintéticos dos estrógenos são bastante empregados como contraceptivos e também administrados no controle dos sintomas da menopausa, distúrbios fisiológicos, e no tratamento do câncer de próstata e mama (SUN et al., 2010). Para fins terapêuticos, a ingestão diária recomendada do

hormônio sintético 17 α -etinilestradiol (EE2) situa-se entre 20 - 60 μg para contracepção e cerca de 10 μg para controle dos distúrbios da menopausa. Considerando-se que cerca de 30-90% da ingestão seja excretado na urina e fezes, o montante total excretado de estrógenos no meio ambiente por humanos, tem sido estimado em aproximadamente 4,4 kg/ano/milhão de habitantes (COMBALBERT e HERNANDEZ - RAQUET, 2010).

Devido à liberação natural e contínua de estrógenos por humanos para o sistema de esgoto e a sua eliminação incompleta pelos sistemas de tratamento, os hormônios entram no ambiente aquático na faixa de ng L-1 (GONZÁLEZ et al., 2012). Esses compostos também podem atingir as águas superficiais através do escoamento superficial tendo como fonte o esterco animal proveniente da criação extensiva de mamíferos ou, em menor escala, de animais selvagens (WENZEL, 2003; TADEO et al., 2012).

Por esse motivo, os efluentes domésticos, tratados ou in natura, representam a principal fonte para entrada desses contaminantes no ambiente (MARFIL-VEGA et al, 2010). Em estações de tratamento de esgoto (ETE) pode ocorrer ainda o processo de quebra da conjugação pelo contato com a elevada população de *Escherichia coli* produtora das enzimas glucuronidase e arilsulfatase (D'ASCENZO et al., 2003).

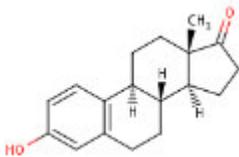
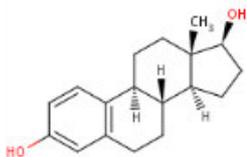
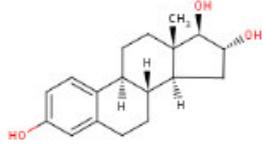
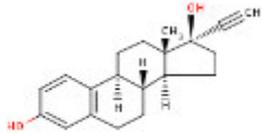
Sob condições ambientais, os estrógenos conjugados são rapidamente hidrolisados, levando aos hormônios livres e aos seus metabólitos. No ambiente aquático, E2 é biodegradado a E1, que degrada a E3 (LaFLEUR e SCHUG et al., 2011). Além disso, como alguns hormônios estão naturalmente em equilíbrio entre si, tais como o 17 β -estradiol (forma reduzida) e a estrona (forma oxidada), durante os processos de tratamento e no ambiente aquático, pode haver a conversão de um estrógeno em outro, em função das condições oxidantes/redutoras do meio (LOPES et al., 2010).

2.2.1 Propriedades físico-químicas

A distribuição dos contaminantes no ambiente aquático pode ser explicada por suas propriedades físico-químicas e pelas condições ambientais do meio em que estão inseridos (AZZOUZ et al., 2012). Os hormônios naturais e sintéticos apresentam natureza lipofílica que, sob condições específicas de temperatura, pH,

salinidade, existência de substâncias húmicas ou material particulado, sofrem influência significativa na sua solubilidade e destino, facilitando ou dificultando sua degradação no meio natural (GABET et al., 2007). Apesar de possuírem meia vida relativamente curta (2 – 6 dias) (REIS FILHO et al., 2006) quando comparado a outros micropoluentes, os estrógenos são continuamente introduzidos no ambiente. Uma vez no compartimento aquático, esses compostos orgânicos podem sofrer advecção (transporte através da corrente), biotransformação, oxidação ou redução, adsorção nos sedimentos e resuspensão quando incorporadas ao material particulado. A Tabela 2 apresenta as propriedades físico-químicas dos estrógenos naturais e sintéticos inseridos nesse trabalho.

Tabela 2: Propriedades físico-químicas dos estrógenos de interesse.

Composto	Fórmula Molécula	MM (g/mol)	ϕ_{sat} 25°C (mg/L)	Log K_{ow}	Pka	Estrutura Molecular	Uso
Estrona (E1)	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270,4	0,8 – 12,4	3,43	10,3		Estrogênio natural
17 β estradiol (E2)	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272,4	3,9- 13,3	4,01	10,4-10,7		Estrogênio natural
Estriol (E3)	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	288,4	441,0	2,45	10,4		Estrogênio natural
17 α -etinilestradiol (EE2)	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296,4	11,0	3,67	10,5		Estrogênio sintético

Fonte: Raimundo (2011); Raimundo e Jardim (2011); Vidal (2015); Araújo (2014)

Um fator de maior importância na redução dos estrógenos na fase aquosa é a mobilidade desses contaminantes orgânicos para o sedimento, dependendo esse fator dos seus coeficientes de adsorção (K_d), coeficiente de adsorção normalizado

em relação a matéria orgânica (Koc) e coeficiente de partição octanol-água (Kow), teor de matéria orgânica, salinidade e do pH do meio principalmente para os compostos facilmente ionizáveis. Devido à baixa solubilidade em água, a baixa volatilidade, a natureza hidrofóbica, aos altos coeficientes de partição octanol/água (Kow) e de partição matéria orgânica/água intersticial (Koc) desses contaminantes emergentes, a matriz sedimento pode agir como reservatório desses micropoluentes podendo afetar negativamente organismos aquáticos (GRUND et al., 2010; SCHÄFER et al., 2011).

No entanto, como os estrógenos são excretados principalmente nas formas associadas a ácido glucurônico ou sulfato, são mais hidrofílicos e menos ativos biologicamente que os estrógenos livres e, portanto, podem permanecer por mais tempo em ambientes aquáticos o que pode favorecer sua dispersão ambiental (BIRKETT e LESTER, 2003).

Os valores dos coeficientes (Kow, Koc e Kd), utilizados em estudos de destino ambiental para contaminantes, para maior praticidade são comumente expressas como o log destes coeficientes (log Kow, log Koc e log Kd). Desta maneira, valores elevados são considerados indicadores de que uma substância pode ter tendência à sorção, enquanto que baixos valores indicam mobilidade ambiental uma vez que não é sorvido pela matéria orgânica do sedimento e por isso, existe alta probabilidade de ser encontrado na fase aquosa. Em geral, pode-se dizer que os estrógenos se apresentam moderadamente sorvidos às partículas sedimentares devido a seus valores de log Kd (2,1 - 2,9), log Koc (2,9 – 4,0) e log Kow (> 3,0) (PAL et al., 2010). Além disso, o pKa dos estrógenos também contribui para adsorção nos sedimentos. Como os valores de pKa são maiores que 10,0 e normalmente o pH dos sedimentos é menor do que 7,0, principalmente em locais com alto teor de matéria orgânica na água, como as regiões de clima tropical, os grupamentos fenólicos estão na forma ácida consequentemente menos solúveis em água e mais facilmente adsorvidos as partículas do sedimento. Em águas salinas, o coeficiente de partição sedimento/água para os estrógenos é maior, resultando na diminuição da sua solubilidade em água (PAL et al., 2010).

2.3 Cafeína

Identificado como 1,3,7-trimetilxantina, cafeína é um alcaloide, 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*). Pode ser achado em outros produtos vegetais, particularmente no cacau (*Theobroma cocoa*), no guaraná (*Paullinia cupana*) e na erva-mate (*Ilex paraguayensis*).

A cafeína é um composto básico com valores de $pK_a = 10,1$ e apresenta alta solubilidade em água, $\log KOW < 0,01$ (Tabela 3). A cafeína dificilmente se bioacumula, pois apresenta baixa afinidade com tecidos gordurosos.

Tabela 3: Propriedades físico-químicas do composto Cafeína.

Composto	Fórmula Molecular	MM (g mol ⁻¹)	pKa	Log Kow	Log Koc	ϕ 25°C (mg L ⁻¹)	Uso
Cafeína (CAF)	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194,2	10,1	<0,01	<0,01	21700	Estimulante

Fonte: Raimundo (2011); Araújo 2014

Uma parcela da população consome a cafeína na forma de fármacos, como por exemplo antigripais e analgésicos sendo grande parte deste alcaloide 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).

Segundo Maria e Moreira (2002) a substância cafeína é um dos alcaloides mais ingeridos no planeta. Com ação farmacológica variada provocando, dentre outros efeitos, alterações no sistema nervoso central, sistema cardiovascular e homeostase de cálcio. 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, 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).

Segundo estudos 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 $\mu\text{g L}^{-1}$, são compatíveis aos teores determinados em amostras de esgoto na Alemanha, com valores médios de 54,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ (WEIGEL *et al.*, 2004).

2.4 Métodos analíticos utilizados na determinação dos estrogênios e da cafeína

Existem atualmente uma grande variedade de procedimentos analíticos que vem sendo empregadas na análise de amostras ambientais como água, solo, sedimento e ar. Entre as técnicas utilizadas para a determinação de compostos em nível de traços, na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ até ng L^{-1} , 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 (PESSOA, 2012; ARAUJO 2014).

Devido à presença de uma infinidade de compostos que podem interferir na análise, as amostras ambientais são consideradas matrizes complexas. Além disso, à ausência de 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, segundo Bilae Dezotto (2003) a análise de fármacos residuais em matrizes ambientais requer ainda o desenvolvimento de métodos mais sensíveis para a detecção de concentrações na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} .

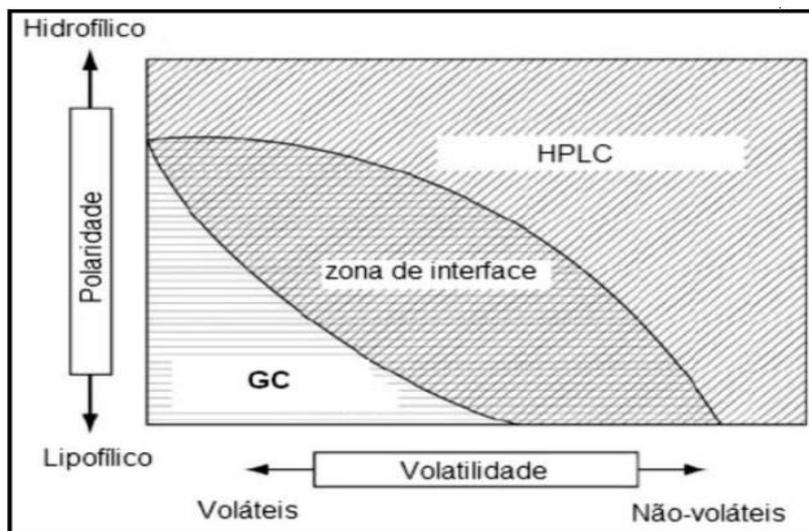
Alguns fatores devem ser levados em consideração ao selecionar o método de análise, como: disponibilidade, adaptabilidade e capacidade total da técnica instrumental escolhida para a quantificação, tempo de análise e custos envolvidos, seletividade, detectabilidade, precisão, repetibilidade e reprodutibilidade, robustez, faixa de aplicação, dentre outros (GHISELLI, 2006).

As técnicas mais comumente reportadas para análise de hormônios sexuais são: Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (CG/EM) (MOL et al., 2000; BRAUN et al., 2003; GHISELLI, 2006), Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa no modo tandem (CG/EM/EM) e Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massa (CL/EM) (RODRIGUEZ-MOZAZ et al., 2004; MOREIRA, 2008).

Atualmente, a técnica de cromatografia gasosa (CG) vem sendo menos utilizada do que cromatografia líquida (CL) em análise de estrogênios devido à dificuldade na etapa de preparação da amostra incluindo a necessidade de derivatização, (TOMSÍKOVÁ et al., 2012).

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 6 pode ser interpretada da seguinte forma: poluentes voláteis e semivoláteis, não polares/lipofílicos são frequentemente separados por cromatografia gasosa (SILVA e COLLINS, 2011).

Figura 3: Faixa de aplicação da HPLC e GC.



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 (SILVA e COLLINS, 2011).

No trabalho de Sodr e e colaboradores (2007) 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 extra o 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 -estradiol e 17 -etinilestradiol nas faixas de concentra o entre 0,005 até 41,7 $\mu\text{g L}^{-1}$.

2.5 Método de extra o e pr -concentra o dos analitos

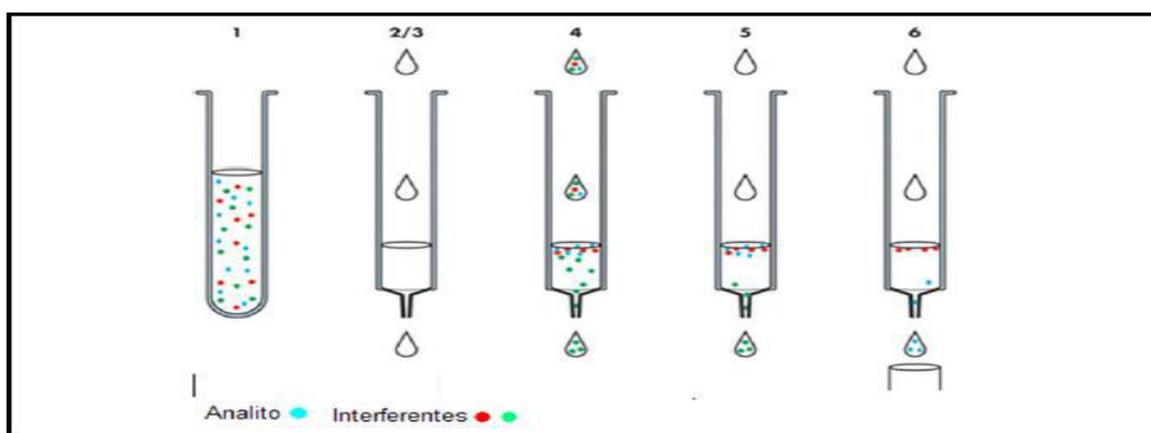
A análise de traços de compostos orgânicos em água e sedimento pode ser considerada como um desafio. Segundo Araújo (2006) determina o de hormônios estrógenos no ambiente constitui em tarefa difícil, primeira, devido   complexidade das matrizes ambientais, e segundo, por causa de sua baixa concentra o (ordem de ng L^{-1}).

Na maioria das análises que envolve amostras “reais”, é necessário o enriquecimento substancial do analitos 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 analíto de interesse. No caso de análises cromatográficas, além de evitar a interferência dos contaminantes da matriz que possam co-eluir com o analíto 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; ARAÚJO, 2006).

2.5.1 Extração em fase sólida (SPE)

Devido às baixas concentrações dos analitos encontrados nas matrizes ambientais é necessária a realização da etapa de pré-concentração da amostra, sendo a extração em fase sólida (SPE) a técnica mais utilizada para concentração dos estrogênios. Na Figura 4 está apresentado o esquema da SPE e suas etapas durante a concentração do analíto.

Figura 4: Esquema da extração em fase sólida (SPE).



Legenda: 1) amostra; 2 e 3) condicionamento do cartucho; 4) concentração dos analitos através da passagem da amostra; 5) remoção dos interferentes (*Clean up*); 6) eluição do analíto de interesse.

Fonte: Pessoa, 2012.

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 (SALVADOR et al., 2007). Um dos materiais bastante empregado na concentração de estrogênios é a sílica modificada octadecilsilano (C-18) (KELLY, 2000; INGRAND et al., 2003; GIROTTO et al., 2007). Outro material indicado, inclusive pelo método 1694 (USEPA, 2007) 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 (QUINTANA et al., 2004; KIM et al., 2007; PEDROUZO et al., 2009). O cartucho Strata X® é similar ao Oasis HLB® (Waters). O cartucho Strata X® é composto por um monômero contendo dois grupos diferentes, um hidrofílico composto pelo grupo pirrolidona e outro lipofílico composto pelo grupo benzila. Sendo assim, ele tem a capacidade de reter analitos polares e não polares (QUEIROZ, 2011).

O desenvolvimento da etapa de SPE muitas vezes é realizada com processos de erro-tentativas visando sua otimização, a qual é baseada na interação das propriedades físico-químicas e termodinâmicas entre material adsorvente, analitos e solventes de eluição (BIELICKA-DASZKIEWICZ e VOELKEL, 2009).

Um outro parâmetro essencial que deve ser otimizado é a faixa de pH da matriz a ser analisada, conforme relatado em estudos anteriores (QUINTANA *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2004a) a metodologia cromatográfica deve ser avaliada em relação ao ajuste de pH da amostra, uma vez que a retenção das substâncias húmicas presentes na amostra nos cartuchos poderia ser influenciada pelo pH da matriz. Quintana *et al.* (2004) observaram um aumento na performance da extração em valor de pH neutro, obtendo-se conseqüentemente um melhor cromatograma para os compostos estudados, dentre eles os estrogênios. Liu *et al.* (2004a) realizaram um estudo analisando o efeito da variação do pH na etapa de extração em fase sólida, analisando as três faixas de pH (ácido, neutro e básico) e concluíram que não havia diferença significativa entre a faixa de pH ácido e neutro. Vega-Morales *et al.* (2010) afirmam que a acidificação para pH < 3 previne a perda dos analitos por reações abióticas, como a hidrólise, e degradação biológica. Devido às essas divergências reportadas na literatura científica não há uma faixa de pH estabelecida.

Geralmente a eficiência do material adsorvente frente à concentração dos compostos traços é dada em termos de recuperação, a qual é determinada mediante a

adição de uma concentração de analito na matriz permitindo ao analista determinar se há efeito matriz na amostra analisada (DEAN, 1998). A faixa esperada de concentração (recuperação) depende da matriz amostral, do procedimento de recuperação utilizado e da concentração dos analitos (AOAC, 1998). Na Tabela 4 são apresentados valores de recuperação estimados em função da concentração do analito na amostra.

Para a eluição dos analitos do material da fase sólida, diversos solventes podem ser utilizados, sendo o mais comum metanol, acetona, acetonitrila ou ainda uma mistura dos mesmos.

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 L e o tempo de extração pode chegar a 3 horas (WANG *et al.*, 2005).

2.5.2 Métodos de extração dos compostos no sedimento

Em matrizes mais complexas tais como sedimento, material particulado ou lodo de esgoto, são muito menos descritos (GONG *et al.*, 2011; LUO *et al.*, 2011; SUN *et al.*, 2010), principalmente porque são mais ricas em matéria orgânica e, portanto, necessitam de tratamento mais complexo em relação a matrizes aquosas.

Comumente a extração de compostos orgânicos em sedimento (e outras matrizes sólidas) é realizada por técnicas tradicionais envolvendo a extração sólido-líquido tais como extração Soxhlet (ZENG *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2014), que requer alto consumo de tempo e solvente.

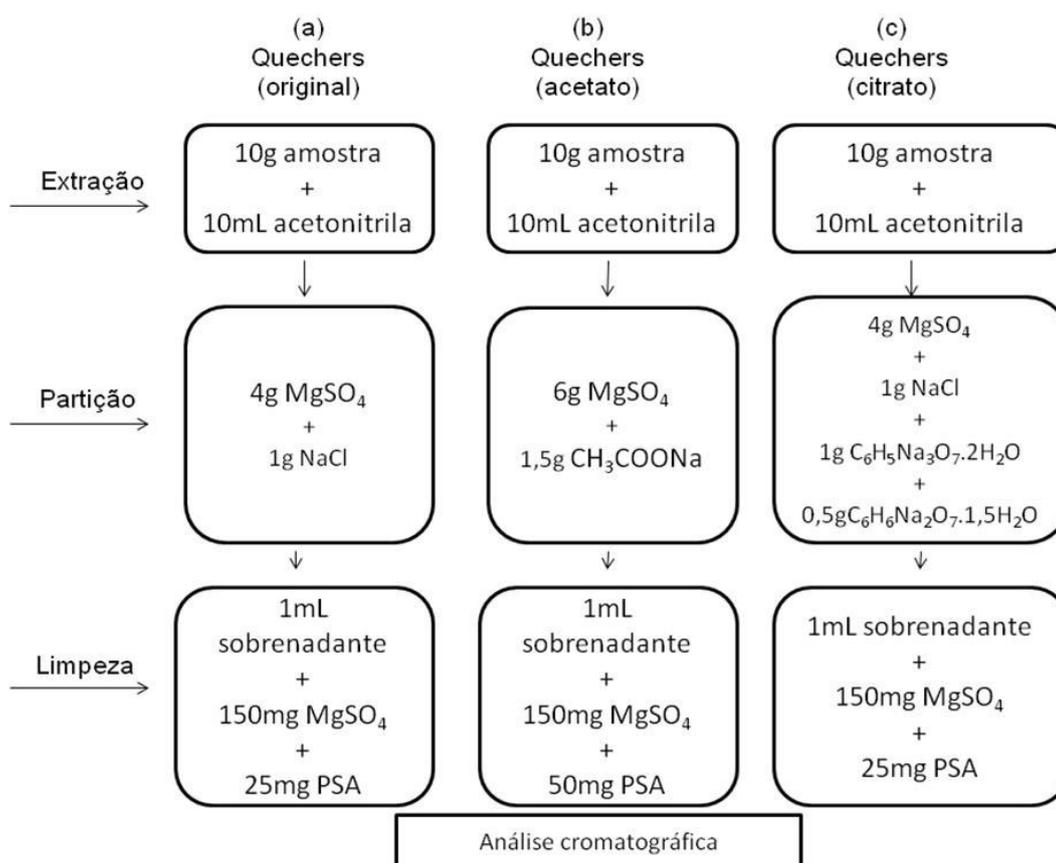
Entretanto, novas abordagens para extração de contaminantes orgânicos de matrizes sólidas têm sido desenvolvidas para substituir a extração Soxhlet, incluindo extração assistida por micro-ondas (MAE, do inglês microwave assisted extraction), extração por solventes em banho de ultrassom (USE, do inglês ultrasound extraction) e extração com líquido pressurizado (PLE, do inglês pressurized liquid extraction). Além disso, outros métodos de preparação de amostra têm sido desenvolvidos para ser mais ambientalmente amigáveis, seletivos, rápidos e miniaturizados, requerendo menor quantidade de solvente, amostra e tempo, tais como a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês matrix solid phase dispersion) e o QuEChERS, abreviatura das características do processo de extração: quick, easy, cheap, effective,

robust and safe (TADEO et al., 2012) que foi desenvolvido em 2003 inicialmente para extração de pesticidas em amostras de frutas. Modificações no método original (ANASTASIADES et al., 2003) permitem aplicações para determinação de pesticidas em outras matrizes como sedimento (BRONDI et al., 2011), solo (ZHANG et al., 2012; DROŹDŹYŃSKI et al., 2009) e tecido de peixe (NORLI et al., 2011), entre outros.

Esse método envolve uma extração inicial com acetonitrila, seguido por uma etapa de partição líquido-líquido após adição da mistura de $MgSO_4$ e $NaCl$, os quais facilitam a remoção de uma quantidade significativa de componentes polares da matriz, e finalmente, uma etapa simples de purificação por extração em fase sólida dispersiva (D-SPE Dispersive Solid-Phase Extraction), onde o extrato é misturado com uma quantidade de sorvente PSA (amina primária e secundária) e $MgSO_4$ anidro original (ANASTASIADES et al., 2003). A evolução deste método está descrita de forma esquemática na figura 5.

Durante o desenvolvimento desse método, grande ênfase foi colocada para a obtenção de um procedimento moderno e dinâmico, que pudesse ser aplicado em qualquer laboratório, devido à simplificação ou cortes de etapas lentas e trabalhosas. Foi desenvolvido para gerar extratos que são diretamente aplicáveis tanto para análise em CG quanto por CL (PRESTES, 2009).

Figura 5: Representação das principais etapas do método QuEChERS.



Fonte: Cerqueira 2013. a) original; b) acetato e c) citrato.

A combinação de métodos tradicionais e recentes pode, e já tem sido utilizada no intuito de aperfeiçoar a quantificação de compostos orgânicos. O método para determinação de estrógenos naturais e sintético em águas residuais proposto por Gunatilake e colaboradores (2014) incluiu a preparação da amostra utilizando SPE (cartuchos Oasis HLB) seguido pelo clean up proposto no processo QuEChERS (MgSO₄ + amina primária-secundária + C18), derivatização e determinação por LC-MS/MS. As recuperações obtidas para os estrógenos variaram de 81 - 103 %, com elevada precisão (n = 3, RSD ≤ 9%) e limite de quantificação entre 0,6 - 0,9 ng L⁻¹.

2.6 Validação do Método

Para validação do método analítico envolvido na análise das amostras ambientais aplicou-se os parâmetros: seletividade, linearidade, sensibilidade, limite de quantificação, limite de detecção, precisão e exatidão.

No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE no 899, de 2003 e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2011. Além desses documentos foi utilizado a literatura científica RIBANI et al., 2004.

2.6.1 Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma clara, os analitos de interesse na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI et al., 2004; SOUZA, 2011; ARAUJO, 2014). Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas. A matriz da amostra pode conter vários componentes que interferem no desempenho da medição (INMETRO, 2011). Em 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 ou espectrometria de massas) são interessantes para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente (ANVISA, 2003).

2.6.2 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração dos analitos de interesse, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI et al., 2004; SOUZA 2011).

A linearidade é avaliada por meio de uma curva de calibração (curva analítica) que pode ser construída pelos seguintes métodos: padronização externa, padronização interna, superposição de matriz ou adição de padrão. Recomenda-se que a curva analítica seja formada por no mínimo cinco níveis de concentração (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2011). A curva analítica descreve matematicamente por meio de uma equação de reta (Equação 1) a correlação entre o

sinal analítico medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada (RIBANI *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2008).

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

Sendo:

y = sinal analítico (absorbância, altura ou área do pico, etc.);

x = concentração do analito;

a = coeficiente angular;

b = coeficiente linear.

Matematicamente, a estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além dos coeficientes de regressão **a** e **b**, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação **R**. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI *et al.*, 2004; SOUZA 2011). Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA 2003 recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO 2011 um valor acima de 0,90.

2.6.3 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 (INMETRO, 2006).

2.6.4 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção (LD) é definido como a menor concentração do analito que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2011). Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis de concentração do analito, como por exemplo, análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método. (INMETRO, 2011). O LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (GUEDES 2014; RIBANI *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2008). Nos métodos instrumentais, tais como os métodos cromatográficos, o LD pode ser estimado como a concentração do analito que produz um sinal igual ou superior a três vezes a razão sinal / ruído do equipamento. Outra maneira de estimar o LD para os métodos que empregam curva de calibração é por meio do método que se baseia nos parâmetros da curva analítica, onde LD é estimado por intermédio da Equação 2 (ARAUJO, 2014; GUEDES 2014; RIBANI *et al.*, 2004; ANVISA 2003).

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

Sendo:

s = a estimativa do 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 = a inclinação (“slope”) ou coeficiente angular da curva analítica.

2.6.5 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) ou limite de determinação é definido como o menor nível de concentração que pode ser quantificado com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; MAPA, 2011). Pode ser definido a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as

condições experimentais estabelecidas, dessa maneira o LQ é estimado através da Equação 3 (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

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

Sendo:

s = a estimativa do 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 = a inclinação (“slope”) ou coeficiente angular da curva analítica.

O LQ representa um compromisso entre a concentração, à precisão e a exatidão. Por conseguinte, quando decresce o nível de concentração do LQ, a medição torna-se menos precisa (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

Segundo RIBANI *et al.* 2004 O melhor caminho para resolver este problema do cálculo do LD e LQ é utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica, que é estatisticamente mais confiável.

2.6.6 Precisão

Normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as três formas mais comuns de expressá-la são: por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação (INMETRO, 2011).

O coeficiente de variação (CV, usualmente expresso em %), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR), é calculado da seguinte forma equação 5 (INMETRO, 2011):

$$CV = DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (5)$$

Sendo:

DP = desvio-padrão;

CMD = concentração média determinada

2.6.7 Exatidão

A exatidão é um parâmetro de validação que representa o grau de proximidade entre o valor medido e um valor de referência considerado como verdadeiro (ANVISA, 2003). Os procedimentos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são: uso de materiais de referência certificados (MRC), comparação de métodos, ensaios de recuperação (INMETRO, 2006). A exatidão deverá ser verificada em três níveis de concentração, alta, intermediária e baixa, e no mínimo com determinações em triplicata (ANVISA, 2003).

A exatidão de um método pelo estudo da 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, INMETRO, 2006). (Equação 6)

$$R (\%) = \left(\frac{c_1 - c_2}{c_3} \right) \times 100 \quad (6)$$

Sendo:

R (%) = percentual de recuperação do analito adicionado;

C₁ = concentração determinada na amostra adicionada;

C₂ = concentração determinada na amostra não adicionada;

C₃ = concentração adicionada do analito (teórica).

2.6.8 Avaliação do Efeito Matriz

A avaliação da possível existência de efeito matriz causado pela matriz da amostra ambiental nas análises pode ser executada mediante comparações entre as inclinações das curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato da matriz. O cálculo da magnitude do efeito matriz é calculado por meio da Equação 7 (MARTINS, 2010; GUEDES, 2014; SALVIA; CREN-OLIVÉ; VULLIET, 2013):

$$\text{Efeito Matriz (\%)} = \frac{x_1 - x_2}{x_2} \times 100 \quad (7)$$

Sendo:

X_1 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada analito, preparadas na matriz;

X_2 = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada analito, preparadas em solvente.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a ocorrência e distribuição entre as fases aquosa e sedimento dos desreguladores endócrinos e do estimulante Cafeína no Açude Santo Anastácio Fortaleza-Ceará.

3.2 Objetivos específicos

✓ Desenvolver e validar um método para determinação dos estrógenos naturais estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e estriol (E3) bem como do sintético 17 α -etinilestradiol e do estimulante cafeína nas matrizes ambientais de águas superficiais através do método de extração por SPE e no sedimento pelo método de extração com QueChERS, seguido de análise simultânea por HPLC/DAD;

✓ Caracterizar as amostras de água e sedimento, através de parâmetros físico e químicos;

✓ Realizar estudo do efeito matriz;

✓ Avaliar a ocorrência desses compostos no sedimento e na água do reservatório.

4. METODOLOGIA

4.1 Padrões analíticos, solventes e reagentes

Os padrões dos estrógenos estrona (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3), 17 α - etinilestradiol (EE2) e o estimulante cafeína foram adquiridos da Sigma-Aldrich, (EUA), todos com grau de pureza > 98%. As soluções padrão estoque (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) individuais dos estrógenos foram preparadas em acetonitrila (ACN, grau HPLC). Os solventes acetonitrila, metanol (MeOH) e ácido acético glacial (CH_3COOH) foram adquiridos todos em grau HPLC.

Foram utilizados, ainda, o sorbente C18 (45 μm , Agilent, USA), PSA (47-60 μm , Varian; 45 μm , Agilent), MgSO_4 (VETEC) e NaCl (VETEC). Para o desenvolvimento do processo de extração em fase sólida foram utilizados cartuchos de fase polimérico comercial, um divinilbenzeno-N-vinilpirrolidona - Oasis [®] HLB (Waters).

4.2 Área de estudo

O açude Santo Anastácio, também conhecido como açude da Agronomia, é um pequeno reservatório parcialmente localizado no Campus Universitário do Pici da Universidade Federal do Ceará e suas coordenadas são 3°44'36"S e 38°34'15"W. Sua construção data de 1918, e foi feita pelo represamento do riacho Alagadiço Grande, efluente da lagoa de Parangaba, sendo está situada na bacia do rio Maranguapinho (FARIAS, 2007). Situada a oeste do Município de Fortaleza, a bacia do Maranguapinho apresenta os rios Ceará e o Maranguapinho, sendo este último o principal. Seu perímetro é de 2.858 m, sua profundidade média é de 1,67 m, sendo a máxima de 3,24 m e a profundidade mínima navegável de 0,64 m (LIMA, 2011), envolve uma bacia hidráulica com cerca de 12,8 hectares e uma bacia hidrográfica com aproximadamente 143.400 m². Sua barragem possui 182 m de comprimento. As margens do ASA encontram-se totalmente habitadas, exceto a parte física que se localiza na área do Campus do Pici. A população que habita esta área é, em sua maioria, de baixa renda e sem acesso a uma educação ambiental esclarecedora, o que

faz com que contribua com dejetos humanos (lixo e esgoto doméstico) para o processo de eutrofização e assoreamento do ASA. (FARIAS, 2008)

O açude é contornando pelos bairros do Padre Andrade, Parquelândia, Amadeu Furtado, Bela Vista, Pan Americano, Pici e Antônio Bezerra, sendo mais da metade da sua área inundada sendo Universidade Federal do Ceará (Figura 6)

Figura 6: Açude Santo Anastácio (ASA) / Açude da Agronomia



Fonte: adaptado de ARAUJO *et. al.*, 2014.

O ASA recebe as águas vertidas da Lagoa da Parangaba (Figura 7), além de contribuições de drenagem das águas pluviais, esgotos brutos e resíduos sólidos ao longo do seu percurso de aproximadamente 2,5 km. Ressalta-se que cerca de 70% da extensão do canal é aberta à atmosfera, sendo o restante coberto em concreto armado.

Figura 7: Mapa indicando o sistema integrado canal-reservatório (Santo Anastácio).



Fonte: adaptado de ARAUJO *et. al.*, 2014.

Conforme projeto disponibilizado pela Prefeitura Municipal de Fortaleza, o canal apresenta seção retangular com largura de 5,0 m e altura de 1,5 m., no entanto, ressalta-se a existência de uma camada de sedimento depositada no fundo do mesmo com altura de aproximadamente 0,3 m (ARAUJO *et. al.*, 2014).

O reservatório é monitorado desde 2007 pelo Laboratório de Química Ambiental (LAQA) do Departamento de Química Analítica e Físico Química da UFC, onde foi observado que esse corpo d'água apresenta alto índice de poluição devido ao descarte indevido de resíduos, tanto de efluentes como lixo doméstico, provocando também assoreamento, eutrofização, contaminação principalmente por coliformes fecais e grande concentração de metais em seus sedimentos (BECKER, 2010). Chaves et al (2013) também verificaram que a comunidade íctica do ASA está sendo influenciada pelo distúrbio contínuo e de alta magnitude que atua neste ecossistema (poluição e introdução de espécies de peixes exóticas), ocorrendo uma substituição das espécies de peixes mais sensíveis a estas perturbações (em sua maioria nativas), por espécies oportunistas e mais tolerantes.

Nesse açude inúmeros pescadores, figura 8, utilizam diversos aparelhos-de-pesca na captura de peixes, com destaque para tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*; traíra, *Hoplias malabaricus*; muçum, *Synbranchus marmoratus*, que são

utilizados, em parte, para consumo próprio em parte para venda ao público local. (REIS, 2010).

Figura 8: Captura de peixes



Fonte: Autora 2015.

A Resolução nº 357 do CONAMA (BRASIL, 2005) enquadra as águas doces em quatro classes (especial, classe 2, classe 3 e classe 4) de acordo com seus usos preponderantes. As águas que se destinam ao abastecimento para o consumo humano após tratamento convencional, à aquicultura e à atividade de pesca e que sejam também usadas à recreação de contato primário deveriam estar enquadradas na classe 2, caso do Açude Santo Anastácio.

Assim, este trabalho tem como objetivo principal avaliar o grau de poluição desse reservatório através da determinação dos níveis de cafeína (CAF) (estimulante e traçador de atividade humana) e dos hormônios estrógenos: estrona (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3), e 17 α -etinilestradiol (EE2).

4.3 Amostragem

Para que se pudesse desenvolver um procedimento analítico capaz de identificar e quantificar a ocorrência e distribuição dos desreguladores endócrinos e do estimulante cafeína na fase aquosa e no sedimento do reservatório, o trabalho de amostragem foi dividido em duas etapas:

✓ Na primeira etapa do trabalho, foi verificado a ocorrência dos compostos de interesse e validado um método analítico na fase aquosa. Foram realizadas três campanhas amostrais em setembro de 2014, maio e agosto de 2015;

✓ Na segunda etapa do trabalho foi verificada também a ocorrência dos compostos de interesse e validado um método analítico no sedimento. Foi realizada uma campanha amostral no mês de agosto de 2015.

Foram escolhidos pontos chaves, de forma a detectar as influências mais representativas da fonte poluidora desse corpo d'água, que é o despejo do esgoto sanitário das comunidades ribeirinhas (Figura 9):

ASA1 - próximo às habitações da comunidade;

ASA2 - ponto central do reservatório;

ASA3 - próximo à sua barragem.

Figura 9: Mapa indicando os pontos de coleta do reservatório (Santo Anastácio).



Fonte: Adaptado de Google Earth, acesso em 03/06/2015.

4.3.1 Coleta

Foi utilizada a estrutura operacional da COGERH para a realização das atividades de campo. O transporte entre os pontos de amostragem foi realizado com

barco a motor. As amostragens foram realizadas sempre no período da manhã, entre 8:00 h e 11:30 h.

A coleta de água superficial (Figura 10) foi realizada utilizando-se garrafas de vidro âmbar (1L) previamente limpas com detergente neutro e secas em estufa. Os frascos eram mergulhados a uma profundidade máxima de 30,0 cm. Após a coleta, as amostras foram mantidas em caixa isotérmica para transporte até o laboratório.

Figura 9: Coleta das amostras de água superficial.



Fonte: Autora 2015.

A coleta da amostra do sedimento superficial foi realizada utilizando uma draga Van Veen (capacidade 5 kg) previamente limpa com detergente neutro e água deionizada. Uma quantidade representativa da amostra foi transferida para recipientes de alumínio (Figura 11), acondicionada em caixa isotérmica com gelo reciclável, para transporte ao laboratório. Uma vez no laboratório, as amostras foram armazenadas em freezer (-4 °C).

Figura 10: Coleta das amostras de sedimento.



Fonte: Autora 2015.

4.4 Caracterização das Amostras

Existe uma grande variedade de indicadores de qualidade, para esse estudo foram escolhidos os parâmetros abaixo, no sentido de caracterizar as amostras de água e sedimento do Açude Santo Anastácio.

4.4.1 Caracterização da amostra de água superficial

Todos os métodos de análise descritos na tabela 6, foram baseados na 21ª edição do “Standard methods for the examination of water and wastewater – APHA-AWWA-WPCF”, 2005.

Tabela 4: Parâmetros analisados.

PARÂMETRO	PARÂMETRO
1. Fósforo total	12. Sulfeto
2. Ortofosfato	13. Dureza Total
3. Fosforo orgânico	14. Cálcio
4. Clorofila a	15. Magnésio
5. Feoftina	16. pH
6. Nitrogênio total	17. Alcalinidade
7. Nitrogênio orgânico	18. Turbidez
8. Nitrito	19. STD
9. Nitrato	20. ST
10. Nitrogênio amoniacal	21. Coliformes Totais
11. Cloreto	22. E. coli

Fonte: Autora, 2016.

4.4.2 Caracterização da amostra de sedimento

O teor do carbono orgânico do sedimento pode ser predito pelo valor de matéria orgânica (MO). Normalmente, quanto maior o teor, maior a concentração de substâncias húmicas e fúlvicas, responsáveis pela capacidade de adsorção.

As análises de teor de matéria orgânica da amostra de sedimento foram realizadas no Laboratório de Química Ambiental (LAQA). Para determinação de MO total (%), as amostras foram submetidas à secagem em estufa a 45^oC por 24 h, e analisadas pelo método volumétrico com dicromato de potássio (EMBRAPA, 1999).

4.5 Determinação dos desreguladores endócrinos e do estimulante cafeína

4.5.1 Determinação dos analitos de interesse presentes na amostra

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 12.

Figura 11: HPLC/DAD (SHIMADZU) utilizado na determinação dos compostos.



Fonte: Autora 2016.

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 μm de tamanho de partícula. O volume de injeção manteve-se constante e igual a 20,0 μL em todas as medidas. Com eluição por gradiente ACN/HCl 0,1% (Tabela 5). A temperatura do forno foi mantida em 35°C. O pH utilizado para este estudo foi 3, uma vez que estudos de PESSOA (2012) e GIROTTO et al. (2007) indicaram ser o pH ideal para pré-concentração dos compostos utilizados no presente trabalho.

Tabela 5: Gradiente de eluição do método empregado para análise dos compostos.

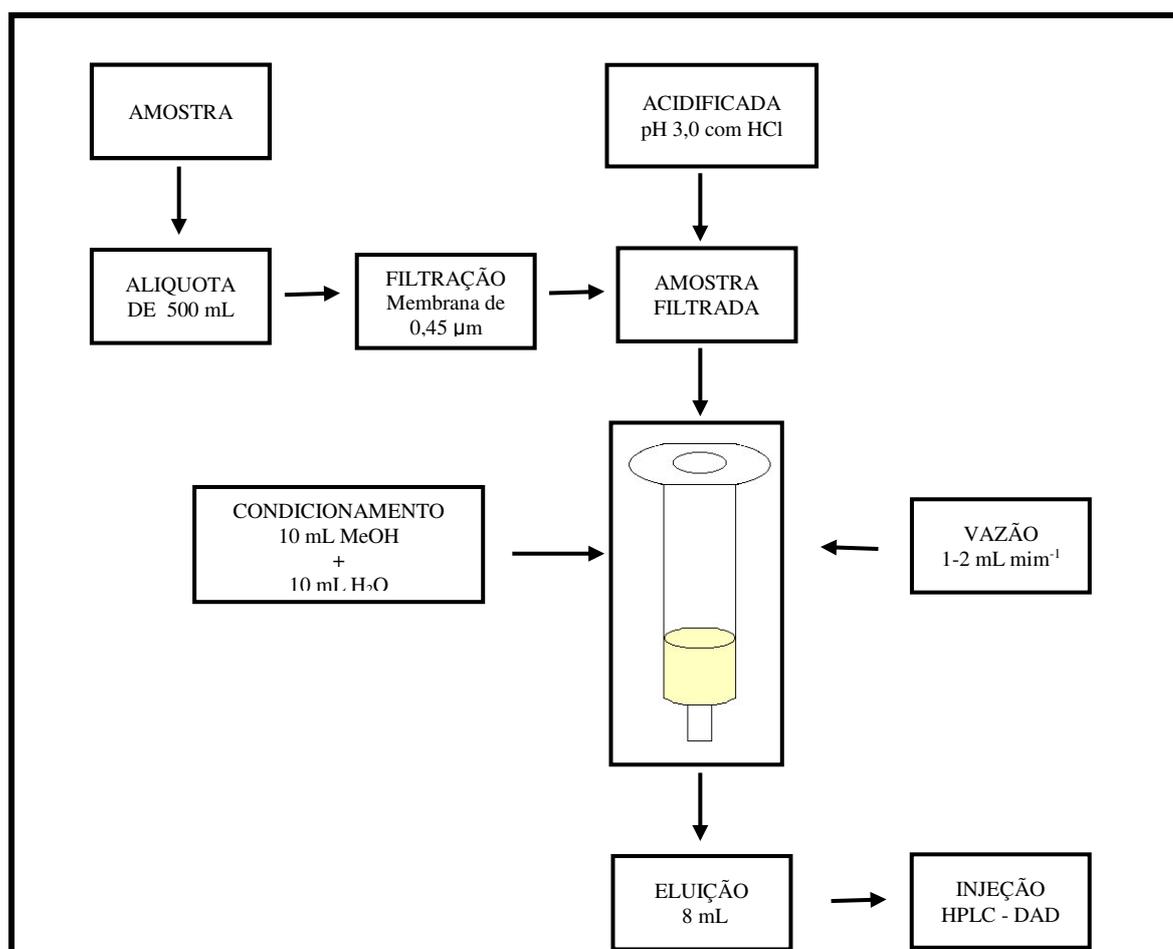
Tempo (min)	ACN/HCl 0,1%	H ₂ O	Fluxo (mL min ⁻¹)
0,0	10	90	1,0
10,0	50	50	1,0
10,5	50	50	2,0
17,0	80	20	2,0
19,0	10	90	1,0
25,0 (Final)	10	90	1,0

Fonte: Autora 2016

4.5.2 Método para extração e análise dos compostos em água superficial

A metodologia de extração e pré-concentração utilizada para determinação dos analitos foi realizada nas seguintes etapas (Figura 13).

Figura 12: Metodologia de extração e pré-concentração para as amostras de água.



Fonte: Autora 2016.

As etapas do desenvolvimento analítico serão detalhadas nos itens a seguir.

- *Etapa de Filtração da amostra ambiental*

Durante a etapa de filtração das amostras foi utilizado um sistema de filtração de vidro (MILLIPORE) com bomba à vácuo (Figura 14) e papel de filtro de fibra de vidro com diâmetro 47 mm e porosidade 0,45 μm (SARTORIUS).

Figura 13: Bomba à vácuo utilizado na etapa de filtração.

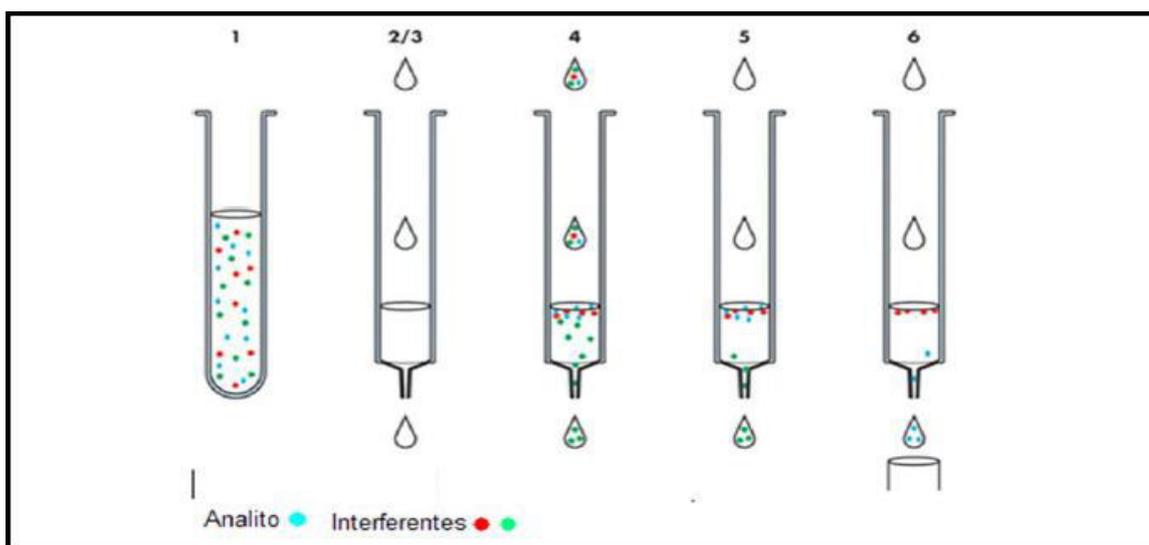


Fonte: Autora 2015

- *Etapa de extração em fase sólida (SPE)*

Devido às baixas concentrações dos analitos, encontrados nas matrizes ambientais, é necessária a realização da etapa de pré-concentração da amostra, sendo a extração em fase sólida (SPE) a técnica mais utilizada para concentração dos estrogênios. Na Figura 15 está apresentado o esquema da SPE e suas etapas durante a concentração dos analitos.

Figura 14: Esquema da extração em fase sólida (SPE).



Legenda: 1) amostra; 2 e 3) condicionamento do cartucho; 4) concentração dos analitos através da passagem da amostra; 5) remoção dos interferentes (*Clean up*); 6) eluição do analito de interesse.

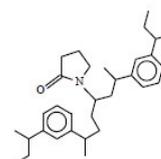
Fonte: Pessoa, 2012.

A SPE pode também ser utilizada para transporte e estocagem de amostras, as quais se encontrem distantes dos locais de análise. Nesse caso a extração é realizada no local de coleta e transportado ao laboratório.

Para etapa de extração o cartucho polimérico comercial, um divinilbenzeno-N-vinilpirrolidona - Oasis® HLB (Waters). As propriedades físico-químicas do cartucho estão presentes na Tabela 6.

Tabela 6: Propriedades Físico-Químicas dos cartuchos de SPE.

Parâmetros	Oasis® HLB
Área Superficial (m ² g ⁻¹)	823
Diâmetro do poro (Å)	82,0
Volume de poro (mL g ⁻¹)	1,34
Tamanho da partícula (µm)	30,3
Massa do adsorvente (mg)	200
Natureza do adsorvente	Polímero
Grupo Funcional	



Fonte: Vidal (2015)

Para a realização da etapa de extração dos analitos de interesse foi utilizado um processador manual Vacuum Manifold (modelo Speed Mate 12; da marca Applied Separations), conforme ilustrado na Figura 16, o qual era conectado a uma bomba de vácuo (modelo VP-24; marca MFS) que mantinha um fluxo médio de 1 - 2 mL min⁻¹. Após etapa de concentração dos analitos os mesmos foram eluídos com 8 ml de metanol 100%.

Figura 15: Extração em fase sólida (SPE).

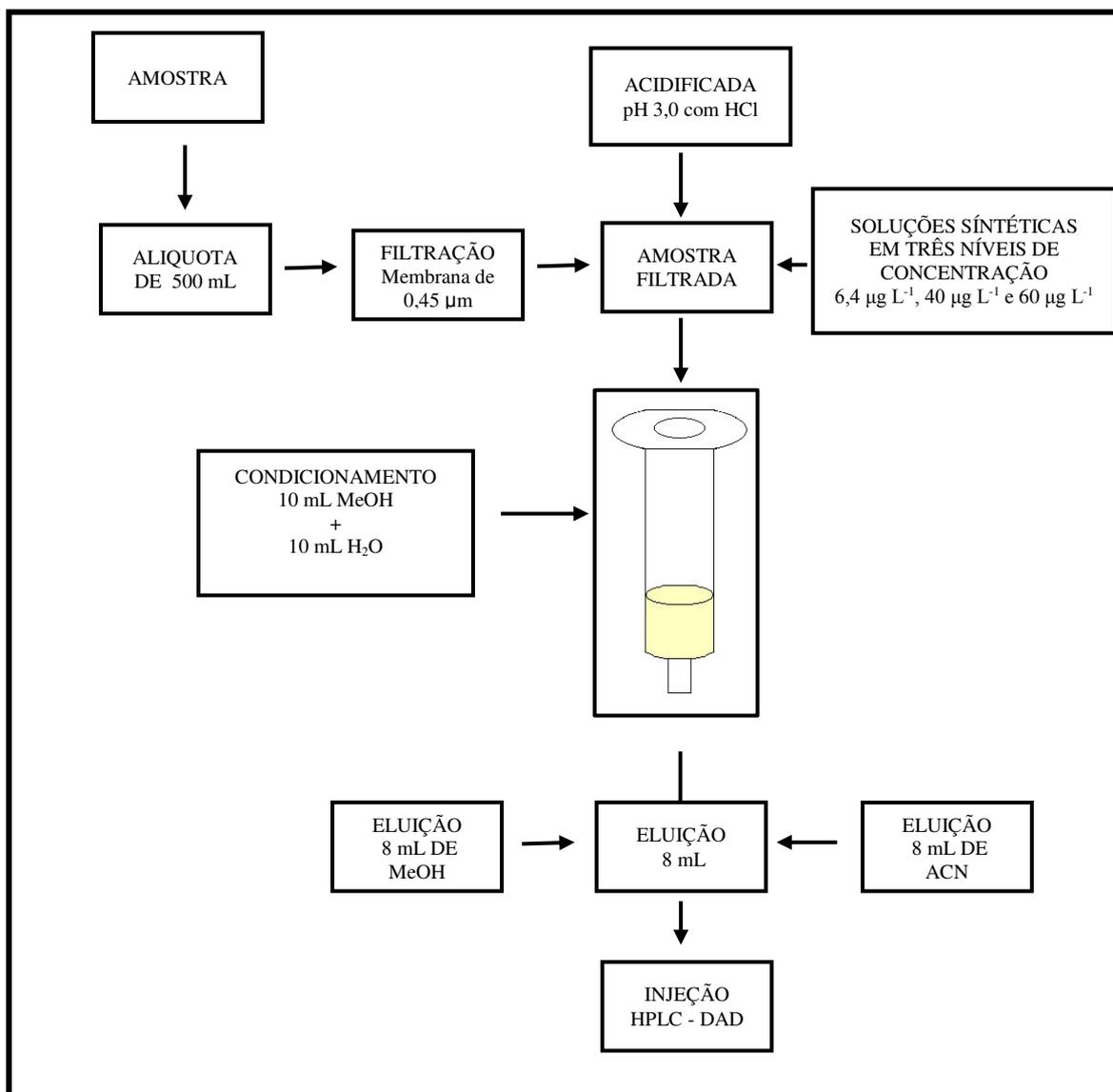


Fonte: Autora 2016.

- *Escolha do eluente para fase de extração e pré concentração*

Para os experimentos de escolha do eluente, foram preparadas soluções sintéticas em três níveis de concentração (6,4 µg L⁻¹, 40 µg L⁻¹ e 60 µg L⁻¹), dos cinco compostos de interesse e mantidas por 2h em frasco fechado à temperatura ambiente para promover o equilíbrio entre analito e solução, até o momento do procedimento de extração. O extrato foi eluído com 8,0 mL de MeOH e um segundo teste com 8,0 mL ACN para análise por HPLC-DAD, conforme detalhado na Figura 17.

Figura 16: Esquema dos procedimentos realizados na validação da extração por SPE.

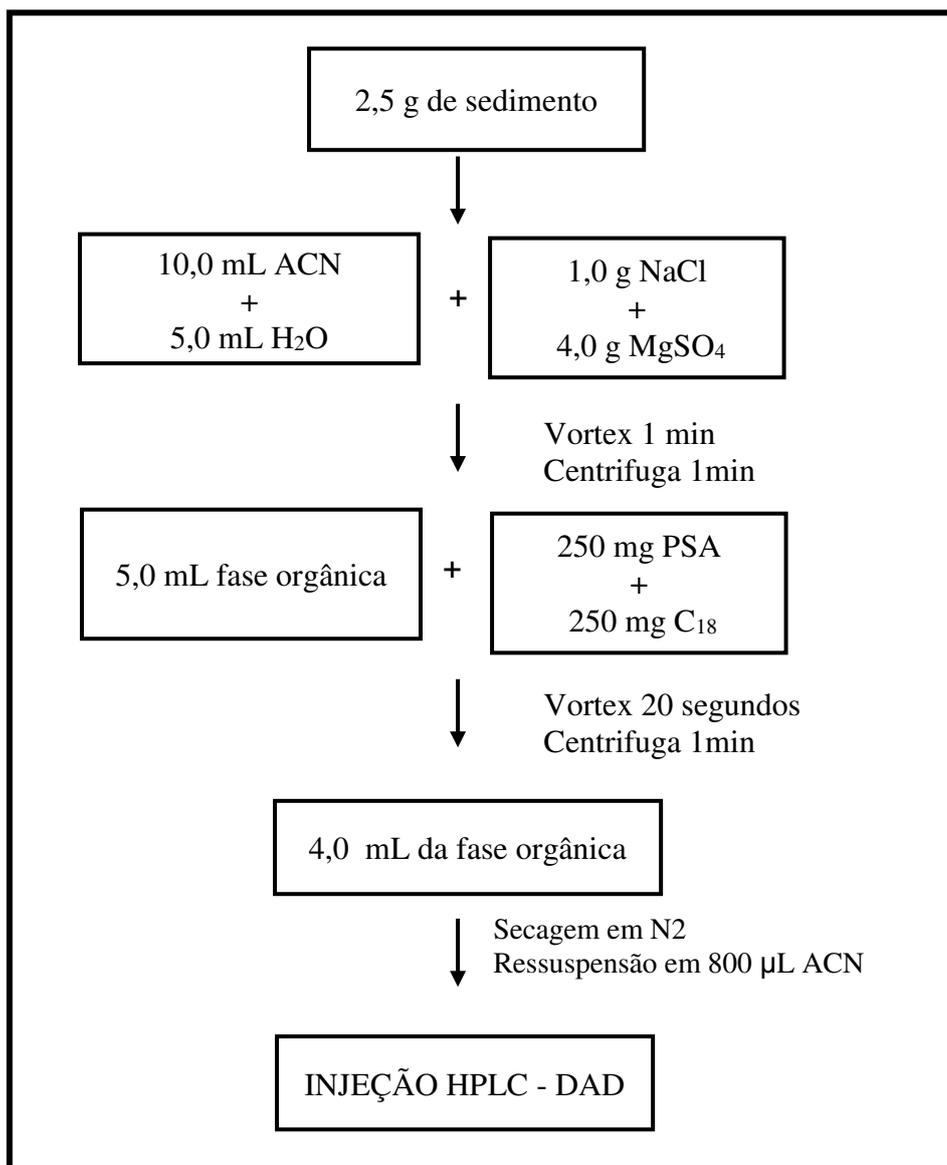


Fonte: Autora 2016.

4.5.3 Método para extração e análise dos compostos no sedimento.

O procedimento de extração foi adaptado a partir do método QuEChERS original (ANASTASIADES, 2003), adotando algumas modificações para que fosse possível a extração de analitos menos polares, como os estrógenos, em matriz complexa, o sedimento. O método compreende uma extração com acetonitrila e partição promovida pela adição de sais, seguido de uma extração e análise dos compostos, conforme detalhado na Figura 18.

Figura 17: Método para determinação de estrógenos nas amostras de sedimento.



Fonte: Adaptado Bezerra 2014. * ACN/CH₃COOH 0,1%

A utilização de uma menor quantidade de amostra 2,5 g comparada ao método original foi essencial para aumentar a área de contato da amostra com o solvente extrator, melhorando a eficiência de extração (BEZERRA, 2014).

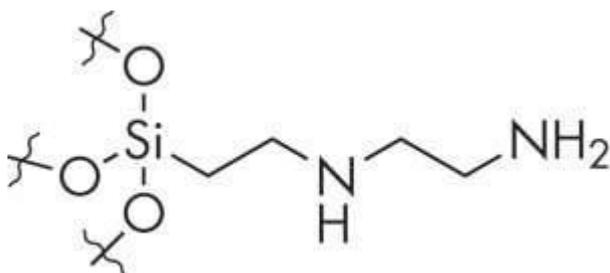
Segundo Mastovská e Lehotay, (2004) a acetonitrila é mais eficiente para a extração de compostos estrógenos em sedimento, pois necessita apenas da adição dos sais para separar-se facilmente da água e a transferência dos analitos para a fase orgânica é melhorada sem a necessidade da adição de co-solventes apolares que poderiam diluir o extrato (POUECH et al., 2012). Este solvente foi acidificado para

tentar melhorar a eficiência da extração, considerando que os analitos pudessem estar fortemente adsorvidos na matéria orgânica do sedimento. A adição do ácido acético (CH_3COOH) ao solvente extrator proporciona a protonação dos analitos e da superfície negativa das substâncias húmicas, principal componente da matéria orgânica, liberando os estrógenos para a fase orgânica que será analisada, aumentando a eficiência da extração (BEZERRA 2014).

A adição dos sais NaCl e MgSO_4 durante a etapa de extração/partição, mantidas do método original, promove o efeito salting out promovendo a separação das fases orgânica e aquosa. Além disso, a hidratação do sulfato de magnésio é uma reação exotérmica com aquecimento entre $40 - 45^\circ\text{C}$, o que favorece a extração de compostos pouco polares, como os estrógenos (PRESTES et al., 2009).

Após a etapa de extração/partição, a SPE dispersiva permite o clean up de maneira rápida e simples. A amina primária-secundária (PSA), característica da SPE dispersiva no QuEChERS, devido a sua estrutura bidentada com grupos amino primário e secundário (Figura 19) retém fortemente compostos polares presentes na matriz. Assim, optou-se pela combinação da PSA com o C18 a fim de reter também substâncias menos polares da matriz e que pudessem interferir na análise e quantificação dos estrógenos.

Figura 18: Estrutura bidentada da amina primária secundária (PSA).



Fonte: BEZERRA, 2014

4.6 Validação do método analítico

Segundo Lanças (2004), 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 (BRASIL, 2003; INMETRO, 2006; LANÇAS, 2004b) e literatura científica (RIBANI et al., 2004).

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).

4.6.1 Seletividade

A seletividade pode ser obtida de várias maneiras. A primeira forma de se avaliar a seletividade é comparando a matriz isenta da substância de interesse (branco) e a matriz adicionada com as substâncias pesquisadas (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra (RIBANI et al., 2004)

Para obtenção da seletividade do método foi comparado os espectros da matriz ambiental isenta dos analitos e da matriz ambiental adicionada dos analitos com concentrações conhecidas, a fim de verificar a existência de algum interferente na matriz ambiental, ou seja, alguma substância que saia no mesmo tempo de retenção dos compostos de interesse (coeluição).

4.6.2 Faixa de trabalho, linearidade e sensibilidade

- *Água superficial*

Para comprovar a linearidade do método analítico foram construídas curvas de calibração com sete níveis de concentrações dos analitos estudados, sendo a faixa de trabalho entre 0,05 e 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

✓ Padronização Externa: A partir de um padrão da solução padrão multielementar de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, preparam-se soluções padrões com concentrações de 0,05; 0,1; 0,4; 0,8; 1,0; 4,0; e $8,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, em metanol grau HPLC da MARCA VETEC, para obtenção do cromatograma correspondente a cada uma delas e, em um gráfico, serão relacionados as áreas obtidas com as concentrações.

✓ Superposição de matriz: A partir da amostra coletada, procedeu-se com as etapas filtração e extração, recolheu-se o eluato e foram preparadas soluções padrões com concentrações de 0,05; 0,1; 0,4; 0,8; 1,0; 4,0; e $8,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, para obtenção do cromatograma correspondente a cada uma delas e, em um gráfico, serão relacionadas as áreas obtidas com as concentrações.

- *Sedimento*

Foram construídas curvas de calibração com seis níveis de concentrações dos analitos estudados, sendo a faixa de trabalho entre 0,4 e $8,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

✓ Padronização Externa: A partir de um padrão da solução padrão multielementar de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparam-se soluções padrões com concentrações de 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 4,0; e $8,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, em acetonitrila grau HPLC da MARCA VETEC, para obtenção do cromatograma correspondente a cada uma delas e, em um gráfico, serão relacionadas as áreas obtidas com as concentrações.

✓ Superposição de matriz: A partir da amostra coletada, procedeu-se com a etapa extração, recolheu-se o extrato e foram preparadas soluções padrões com concentrações de 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 4,0; e $8,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, para obtenção do cromatograma correspondente a cada uma delas e, em um gráfico, serão relacionadas as áreas obtidas com as concentrações.

As curvas analíticas obtidas por padronização externa e por superposição da matriz foram analisadas em triplicatas e a linearidade foi avaliada pelo método de

regressão linear, sendo calculado o coeficiente de correlação linear (R), devendo este apresentar um valor igual ou superior a 0,99, recomendando pela ANVISA 2011.

A sensibilidade para as duas matrizes foi avaliada pela inclinação (coeficiente angular) da curva analítica.

4.6.3 Limite de detecção e quantificação

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 apresentadas nas Equações 8 e 9.

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (8)$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (9)$$

Sendo:

s = a estimativa do 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 = a inclinação (“slope”) ou coeficiente angular da curva analítica

4.6.4 Repetibilidade

A repetibilidade 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 0,6 µg mL⁻¹ dos analitos de interesse seguida de extração por SPE e a amostra de sedimento foi dopada com 1,0 µg mL⁻¹. Foram realizadas dez injeções

repetitivas e sequenciais do extrato, sendo calculado o coeficiente de variação (CV), de acordo com a Equação 10.

$$CV(\%) = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração Média}} \times 100 \quad (10)$$

4.6.5 Exatidão

A exatidão do método de extração, 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 segundo a Equação 11.

$$R (\%) = \left(\frac{c_1 - c_2}{c_3} \right) \times 100 \quad (11)$$

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.

- *Água*

Foram realizados ensaios de fortificação da amostra ambiental isenta dos analitos: em três diferentes níveis de concentração, $120 \mu\text{g L}^{-1}$, $12,8 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1,6 \mu\text{g L}^{-1}$, em triplicata cada ponto, seguida das etapas de filtração, pré-concentração e análise por HPLC/DAD.

- *Sedimento*

Para os experimentos de recuperação uma quantidade da amostra (2,5 g) foi fortificada em um nível intermediário de concentração $1,0 \mu\text{g Kg}^{-1}$ para os compostos

E1 E2, E3 e EE2, foram mantidos por 30 min, 2h e 24h em frasco fechado e à temperatura ambiente para promover o equilíbrio entre analitos e amostra, até o momento do procedimento de extração, afim de verificar qual melhor tempo de contato.

4.6.6 Efeito Matriz

A avaliação da possível existência de efeito matriz foi avalizado mediante comparações entre as inclinações das curvas analíticas preparadas no solvente e no extrato da matriz (água e sedimento). O cálculo da magnitude do efeito matriz foi calculado por meio da Equação 12 (MARTINS, 2010; GUEDES, 2014; SALVIA; CREN-OLIVÉ; VULLIET, 2013

$$\text{Efeito Matriz (\%)} = \frac{x_1 - x_2}{x_2} \times 100 \quad (12)$$

Sendo:

X₁ = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada analito, preparadas na matriz;

X₂ = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada analito, preparadas em solvente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização da amostra de água superficial

As amostras foram analisadas em duplicata, com o coeficiente de variação, de todas as análises menor que 10%, os resultados médios das três coletas estão descritos na tabela 8.

Tabela 7: Caracterização da amostra de água.

PARÂMETRO/UNID	LQ*(mg L ⁻¹)	ASA 1	ASA 2	ASA 3
1. Fósforo total - mg P L ⁻¹	0,013	2,36	2,15	1,95
2. Ortofosfato – mg P-PO ₄ ³⁻ L ⁻¹	0,01	1,16	1,04	0,92
3. Fosforo orgânico - mg P L ⁻¹	0,013	1,20	1,13	1,03
4. Clorofila a – µg L ⁻¹	0,2	42,81	69,16	95,50
5. Feoftina – µg L ⁻¹	0,2	13,70	54,95	96,20
6. Nitrogênio total - mg N L ⁻¹	0,158	9,68	6,68	2,88
7. Nitrogênio orgânico – mg N L ⁻¹	0,158	7,69	4,07	0,447
8. Nitrito – mg N-NO ₂ ⁻ L ⁻¹	0,005	0,013	0,12	0,22
9. Nitrato – mg N-NO ₃ ⁻ L ⁻¹	0,035	0,066	0,63	1,207
10. Nitrogênio amoniacal – mg N-NO ₃ ⁻ L ⁻¹	0,100	1,91	1,46	1,00
11. Cloreto – mg Cl L ⁻¹	2,65	148,95	155,00	160,98
12. Sulfeto – mg S ²⁻ L ⁻¹	1,0	3,13	2,13	<LQ
13. Dureza Total – CaCO ₃ mg L ⁻¹	8,7	307,40	317,55	327,70
14. Cálcio - mg Ca ²⁺ L ⁻¹	8,7	52,40	50,15	47,90
15. Magnésio - mg Mg ²⁺ L ⁻¹	8,7	42,80	46,65	50,50
16. pH - Adimensional	-	7,26	7,26	7,76
17. Alcalinidade - mg CaCO ₃ L ⁻¹	3,74	207,00	193,50	180,00
18. Turbidez - NTU	0,1	16,10	15,20	14,30
19. STD – mg STD L ⁻¹	-	643,00	645,00	648,00
20. ST - mg ST L ⁻¹	-	640,00	646,00	652,50
21. Coliformes Totais - NMP/ 100 mL	-	2,4 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁶
22. E. coli - NMP/100 mL	-	2,4 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁶	4,1 x 10 ³

Fonte: Autora, 2015. *LQ – Limite de Quantificação.

Para avaliar o teor de poluição, podemos destacar os valores de Fósforo Total, sulfeto, coliformes totais e *E. coli*.

As concentrações do fósforo total apresentaram valores de 2,36 mg L⁻¹ para o ASA1, de 2,15 mg L⁻¹ no ASA2 de 1,955 mg L⁻¹ no ASA3; Araújo e colaboradores (2014) encontraram valores de 1,8 mg L⁻¹ para o ponto de barragem do reservatório, semelhante ao encontrado agora. De acordo com a Resolução CONAMA 357/05, as concentrações de fósforo total para classe 2 devem ser de 0,050 mg L⁻¹ para ambientes aquáticos intermediários. Todos os pontos apresentaram valores acima da Resolução do CONAMA 357/05, isso pode ser atribuído ao lançamento de esgotos no reservatório sem o devido tratamento, contribuindo para a eutrofização do manancial. Em pesquisa realizada por Oliveira (2013), que monitorou o Açude Santo Anastácio nos anos de 2011 e 2012, apresentou valores semelhantes ao ASA 1, mostrando que o fósforo é constantemente lançado ao longo dos anos.

A concentração de sulfeto apresentada na tabela 8 variou de 3,13 mg L⁻¹ de S⁻² a 2,13 mg L⁻¹ de S⁻² durante o período amostral, ficando apenas para o ponto ASA 3 abaixo do limite estabelecido pela Resolução Conama n° 357/2005 para um corpo de água doce de classe 2 (0,002 mg L⁻¹ de S⁻²). O sulfeto aparece, nas águas naturais, por causa da contaminação destas com esgoto sanitário, sendo, portanto, a possível fonte de contaminação no trecho monitorado havendo uma redução dos níveis durante todo o trecho do reservatório.

Coliformes fecais ou *Escherichia coli* (*E. coli*) é abundante em fezes humanas e de animais, sendo somente encontrada em esgotos, águas naturais e solos desde que tenham recebido contaminação fecal recente, proveniente de efluentes domésticos.

Os resultados da determinação de *E. coli* apresentados na tabela, indicaram variações acima 4100 coliformes termotolerantes por 100 mililitros apresentando, portanto, valores de coliformes fecais acima do limite estabelecido pela Resolução Conama n° 357/2005 para um corpo de água doce de classe 2 (1.000 NMP por 100 mL). A *E. coli* poderá ser determinada em substituição ao parâmetro coliforme termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

5.2 Caracterização da amostra de sedimento superficial

Na caracterização da amostra de sedimento apresentaram valores de matéria orgânica e carbono, conforme Tabela 9, o que indica que este sedimento tenha capacidade de sorver contaminantes orgânicos, como os estrógenos.

Tabela 8: Resultados percentual de matéria orgânica na amostra de sedimento.

Composto	% MO
ASA 1	10,56
ASA 2	6,96
ASA 3	4,74

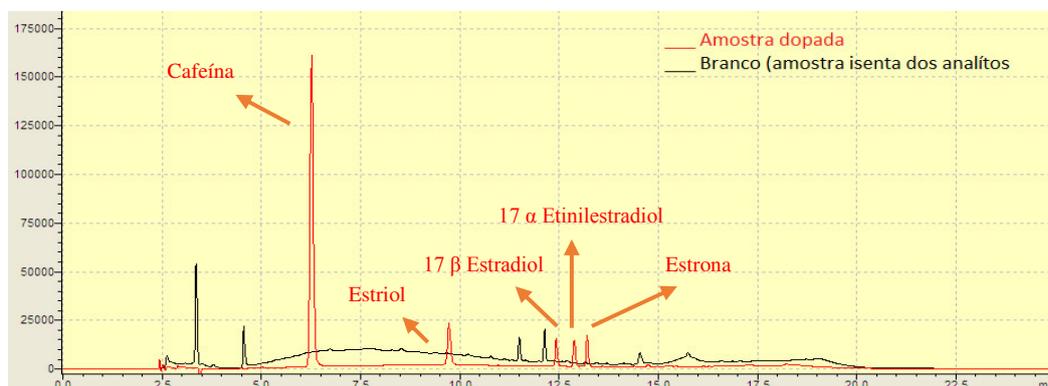
Fonte: Autora, 2016.

5.3 Validação do método

5.3.1 Seletividade

Na Figura 19 podemos observar os cromatogramas do branco (amostra ambiental isenta os analitos) e da amostra dopada, que foram sobrepostos e onde é possível observar que o método é seletivo ou não para os compostos de interesse.

Figura 19: Cromatogramas do branco e da amostra dopada com $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos analitos de interesse.



Fonte: Autora, 2015.

Analisando a Figura 19, 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.

Na Tabela 10 estão apresentados os resultados do tempo de retenção (tR) dos analitos, obtidos pela injeção de uma solução multielementar de concentração $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, dos analitos de interesse.

Tabela 9: Valores dos tempos de retenção da solução multielementar de concentração $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

COMPOSTOS	TEMPO DE RETENÇÃO (min)
Cafeína (CAF)	6,28
Estriol (E3)	9,64
17 β Estradiol (E2)	12,40
17 α Etinilestradiol (EE2)	12,94
Estrona (E1)	13,21

Fonte: Autora, 2015.

5.3.2 Linearidade

- *Água superficial*

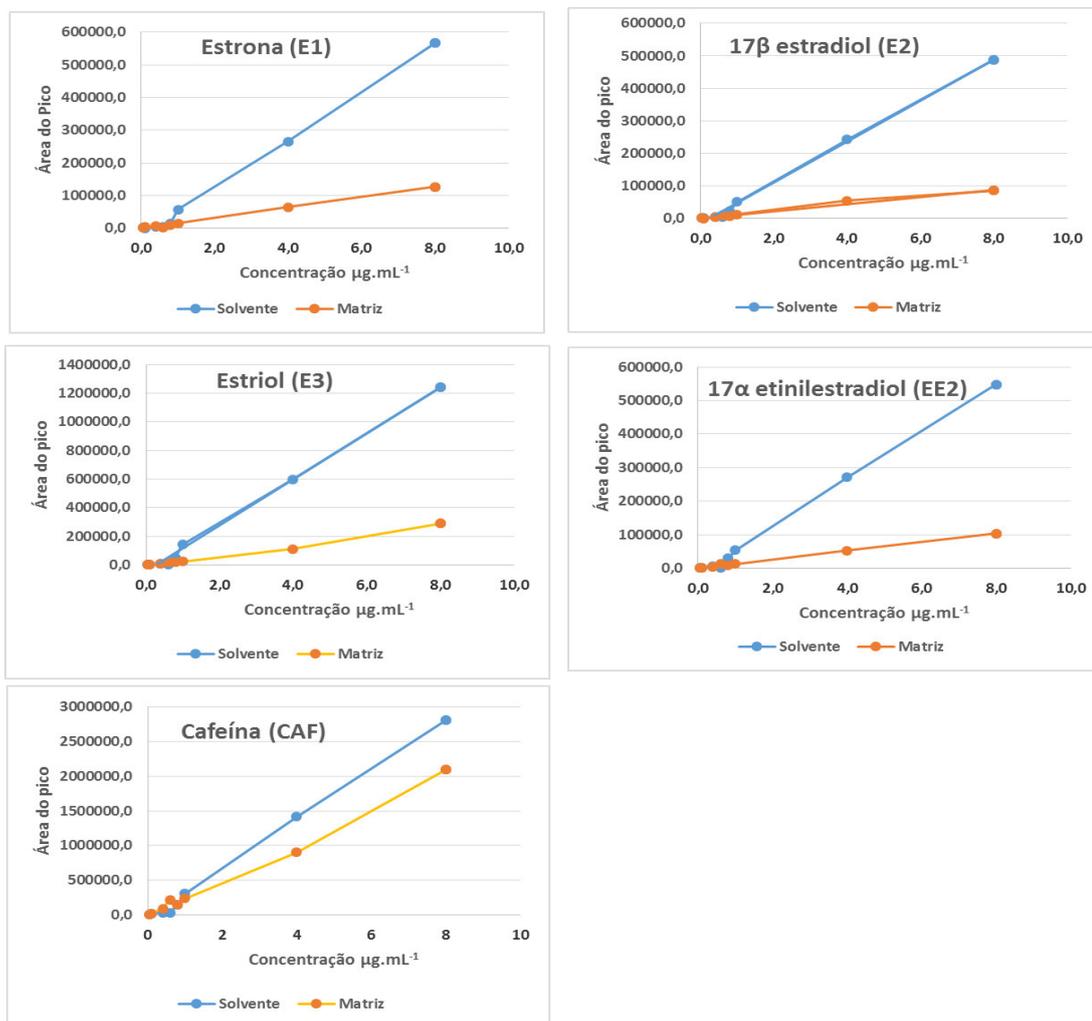
Os valores do coeficiente de correlação (R) das curvas analíticas, com intervalo linear de 0,05 – 8,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, construídas no solvente metanol e na matriz (Figura 20) revelaram-se adequados para os todos os analitos estudados (Tabela 11), sendo obtida uma correlação linear satisfatória.

Tabela 10: Resultados obtidos para as curvas analíticas construídas sem e com superposição de matriz.

Composto	Solvente		Matriz	
	Equação ($y = ax + b$)	R	Equação ($y = ax + b$)	R
Estrona (E1)	$y = 72442x - 23420$	0,997	$y = 15732x - 1218,2$	0,998
17 β estradiol (E2)	$y = 62271x - 16635$	0,998	$y = 11087x + 960,24$	0,996
Estriol (E3)	$y = 157389x - 42076$	0,997	$y = 35298x - 1863,7$	0,999
17 α etinilestradiol (EE2)	$y = 70075x - 19528$	0,998	$y = 12597x + 1068,2$	0,999
Cafeína (CAF)	$y = 353799x - 79486$	0,999	$y = 252568x - 7069,8$	0,997

Fonte: Autora, 2015.

Figura 20: Comparação visual das curvas analíticas no solvente metanol e na matriz água.



Fonte: Autora, 2015.

- *Sedimento*

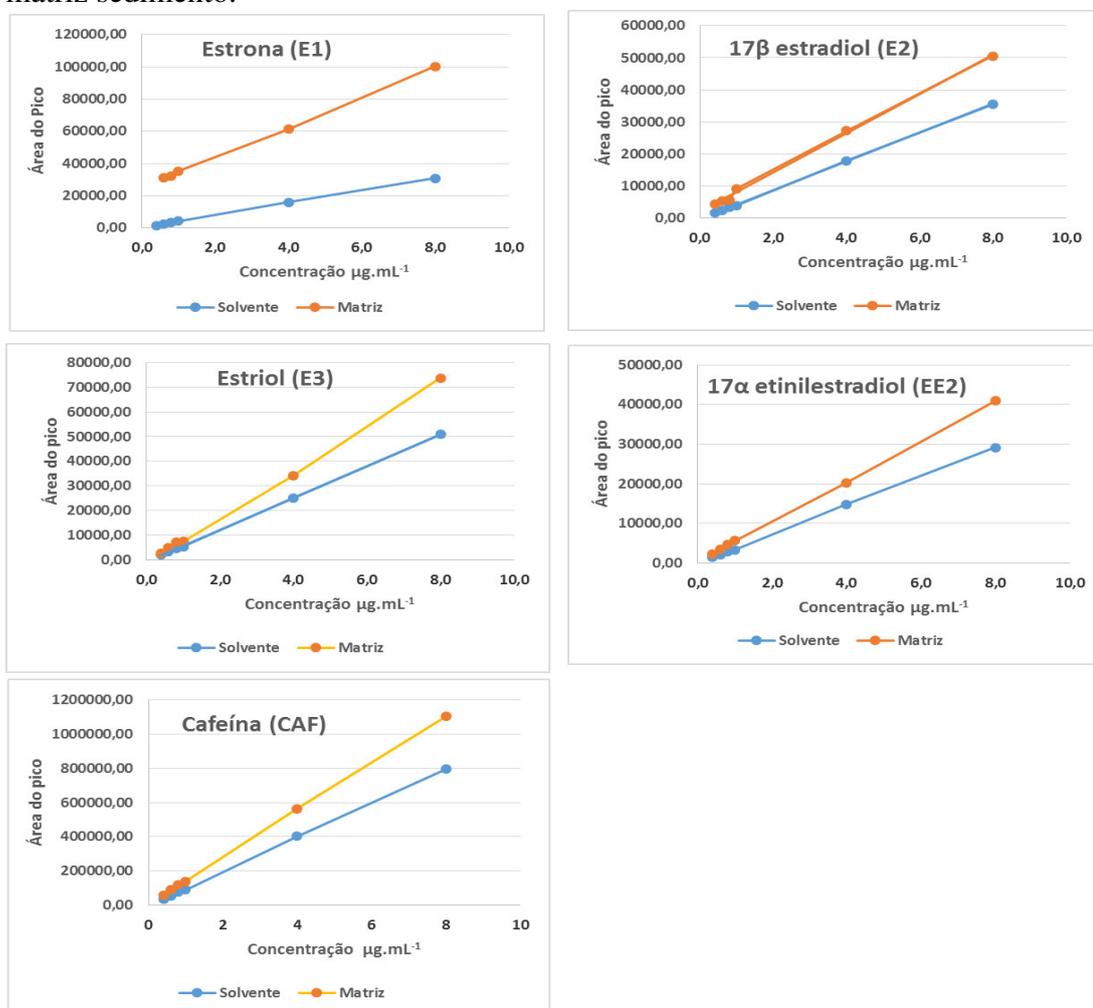
Os valores do coeficiente de correlação (R) das curvas analíticas, com intervalo linear de 0,4 – 8,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, construídas no solvente acetonitrila e no extrato da matriz (Figura 21) revelou-se adequado para os todos os analitos estudados (Tabela12), sendo obtida uma correlação linear satisfatória.

Tabela 11: Resultados obtidos para as curvas analíticas dos analitos construídas sem e com superposição de matriz.

Composto	Solvente		Matriz	
	Equação ($y = ax + b$)	R	Equação ($y = ax + b$)	R
Estrona (E1)	$y = 3848,2x + 75,876$	0,9998	$y = 3104,2x + 26989$	0,9996
17 β estradiol (E2)	$y = 4471x - 186$	0,9999	$y = 6112,5x + 2022,6$	0,9990
Estriol (E3)	$y = 6422,4x - 538,92$	0,9999	$y = 9246,4x - 1051,9$	0,9993
17 α etinilestradiol (EE2)	$y = 3655,9x + 1,3046$	0,9999	$y = 5032,1x + 522,24$	0,9999
Cafeína (CAF)	$y = 100210x - 3799,1$	0,9999	$y = 137390x + 7697$	0,9999

Fonte: Autora, 2015.

Figura 21: Comparação visual das curvas analíticas no solvente acetonitrila e na matriz sedimento.



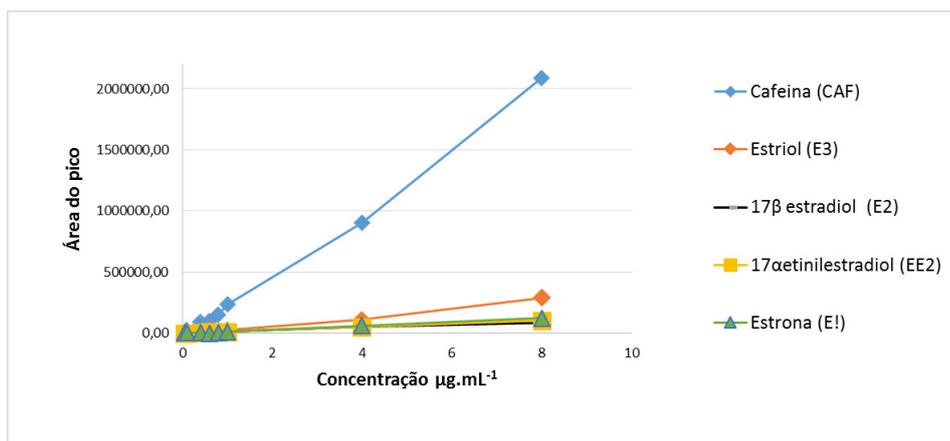
Fonte: Autora, 2015.

5.3.3 Sensibilidade

- *Água superficial*

A sensibilidade foi expressa pela inclinação da curva analítica. A Figura 22 mostra as curvas analíticas dos compostos estudados.

Figura 22: Curvas analíticas obtidas para matriz água.



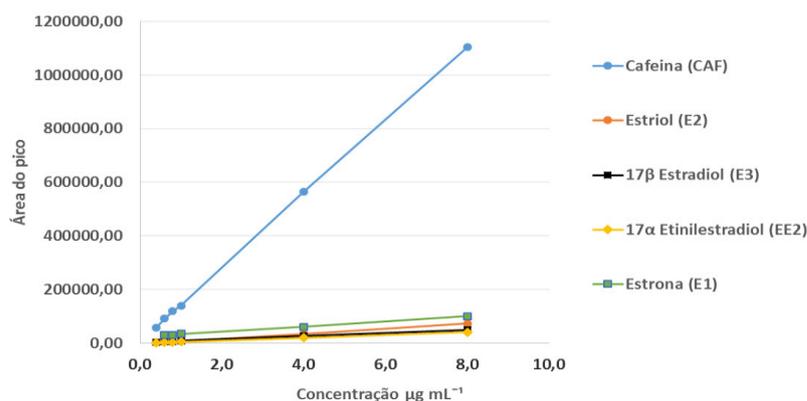
Fonte: Autora, 2015.

Pela Figura 22 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 > E3 > E1 > EE2 > E2, conforme valores dos coeficientes angulares das curvas analíticas dadas na Tabela 6.

- *Sedimento*

A sensibilidade foi expressa pela inclinação da curva analítica. A Figura 23 mostra as curvas analíticas dos compostos estudados.

Figura 23: Curvas analíticas obtidas para a matriz sedimento.



Fonte: Autora, 2015.

Pela Figura 23 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 > E1 > E2 > E3 > EE2, conforme valores dos coeficientes angulares das curvas analíticas dadas na Tabela 6.

5.3.4 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 nas Tabelas 12 e 13.

- *Água*

Tabela 12: LD e LQ para a matriz água.

Composto	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Estrona (E1)	0,39	1,29
17 β estradiol (E2)	0,89	2,97
Estriol (E3)	0,99	3,31
17 α etinilestradiol (EE2)	0,26	0,86
Cafeína (CAF)	0,12	0,41

Fonte: Autora, 2015.

Os valores de LQ e LD obtidos neste trabalho são considerados satisfatórios quando comparados com outros estudos da literatura.

Pessoa (2012) determinou a presença de hormônios nos efluentes e afluentes de estações de tratamento de esgotos em Fortaleza-CE utilizando extração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, encontrando valores de LQ entre 0,117 – 4,72 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os hormônios E1, E2, EE2; no presente trabalho os LQ para os mesmos compostos variaram de 0,86 – 2,97 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Verbinnen, Nunes e Vieira (2010) em seu estudo, com amostras ambientais, encontrou um LD igual a 0,0625 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o estriol (E3) e 1,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o 17 β -estradiol (E2), estrona (E1) e 17 α -etinilestradiol (EE2).

No estudo de Araújo (2014) foram encontrados os LD de 1,543 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a cafeína, 0,283 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o 17 β -estradiol (E2) e 0,383 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 17 α -etinilestradiol (EE2), enquanto no de Raimundo (2007) encontrou um valor de LD igual a 22 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a cafeína. Alda e colaboradores (2001) encontraram um LD igual a 0,015 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os hormônios 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2).

- *Sedimento*

Tabela 13: LD e LQ para a matriz sedimento.

Composto	LD ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)
Estrona (E1)	0,0644	0,2147
17 β estradiol (E2)	0,0111	0,0370
Estriol (E3)	0,0085	0,0284
17 α etinilestradiol (EE2)	0,0012	0,0039

Fonte: Autora, 2015

Quando comparados a literatura os valores de LQ e LD obtidos neste trabalho são considerados satisfatórios (Tabela 13).

Stewart e colaboradores (2014) determinaram a presença dos hormônios estrona (E1), 17 β -estradiol (E2), 17 α -etinilestradiol (EE2) e estriol (E3) em sedimentos estuários da Nova Zelândia utilizando com detecção por cromatografia

gasosa acoplada à espectrometria de massas, encontrando valores de LQ entre 5 -20 ng g⁻¹ para os hormônios E1 E2, EE2; no presente trabalho os LQ para os mesmos compostos variaram de 0,0039 – 0,2147 µg L⁻¹.

No estudo de Martín e colaboradores (2010), em amostras de lodo de esgoto e sedimentos foram encontrados valores de 1,85 – 0,33 para os compostos estrona (E1), 17β-estradiol (E2), 17α-etinilestradiol (EE2) e estriol (E3). Já no trabalho descrito por Bezerra (2014), na determinação de estrógenos na bacia hidrográfica Tietê-Jacaré, foram encontrados valores de LD variando de 1,0 µg g⁻¹ para a estrona e 21,2 – 28,5 ng g⁻¹ para os compostos 17β-estradiol (E2), 17α-etinilestradiol (EE2) e estriol (E3).

5.3.5.Exatidão

- *Água*

A exatidão do método analítico foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, os quais foram realizados utilizando amostras ambientais dopadas em três níveis de concentração (120 µg L⁻¹, 12,8 µg L⁻¹ e 1,6 µg L⁻¹), sendo um nível alto, um intermediário e um baixo. Posteriormente a dopagem, foi executado o método de extração seguida da análise por HPLC-DAD. Na Tabela 14 são apresentados os resultados dos percentuais de recuperação dos analitos em três níveis de concentração.

Tabela 14: Resultados de recuperação média (n = 5) e coeficiente de variação (CV%) para a matriz água.

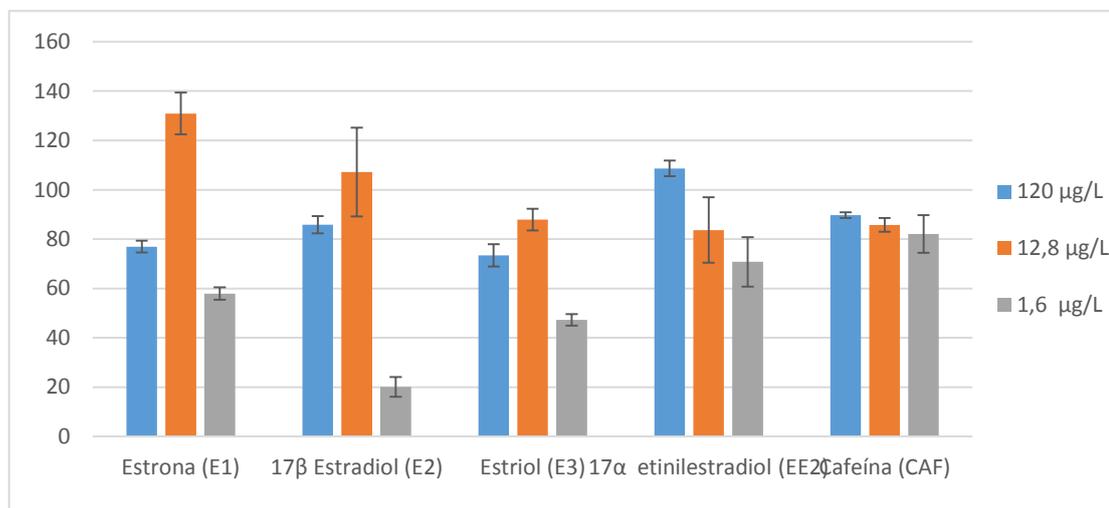
Composto	120 µg L ⁻¹	12,8 µg L ⁻¹	1,6 µg L ⁻¹
Estrona (E1)	79,96 ± 2,43	130,90 ± 8,48	57,92 ± 2,55
17β Estradiol (E2)	85,85 ± 3,52	107,23 ± 18,00	20,15 ± 4,00
Estriol (E3)	73,40 ± 4,56	87,87 ± 4,40	47,30 ± 2,30
17α etinilestradiol (EE2)	108,65 ± 3,15	83,68 ± 13,30	70,81 ± 10,02
Cafeína (CAF)	89,70 ± 1,14	85,77 ± 2,81	82,09 ± 7,59

Fonte: Autora, 2015.

A partir dos dados apresentados na tabela 14, observou-se que as melhores percentagens de recuperações dos analitos foram obtidas o nível mais alto de

concentração. Para o nível mais baixo de concentração conforme o gráfico da figura 24, podemos observar os menores percentuais de recuperação, com precisão de até $\pm 20\%$, que segundo RIBANI 2004, podem ser aceitos.

Figura 24: Resultados de recuperação média (n = 5) e coeficiente de variação (CV%) /níveis de concentração ($120 \mu\text{g L}^{-1}$, $12,8 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1,6 \mu\text{g L}^{-1}$) para a matriz água.



Fonte: Autora, 2015.

De um modo geral, é observado que o percentual de recuperação entre os níveis de fortificação variou de 20,15 a 130,90 %. De acordo com Brito *et al* (2003), para concentrações do analitos na amostra, menores ou iguais a $10^{-8}\%$ (ppb), a faixa aceitável de recuperação está entre 40-120%. Para a ANVISA (2003), a exatidão deve estar entre 80-120% da concentração teórica.

Para RIBANI (2004) 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 $\pm 15\%$.

No estudo de Vidal (2015) foi encontrado uma recuperação de 25,77 % para a Estrona (E1), 13,60 % para de 17 β-estradiol (E2) e 50,77 % para o 17 α-etinilestradiol (EE2), já no estudo de Pessoa (2012), utilizando cartucho Oasis encontrou níveis recuperação de 66,00 - 79,00 % para os mesmos compostos.

Para os hormônios Estrona (E1) e 17 β Estriol (E2), MACHADO (2010) obteve uma faixa de 67- 106 % nos ensaios de recuperação, em amostras de água por HPLC/DAD

GHISELLI (2006) estudou a quantificação com extração em fase sólida (SPE) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/MS) encontrou recuperações na faixa de 91- 110 % para a cafeína (CAF).

Nesse estudo todos os compostos apresentaram recuperações acima de 70,91% com exceção da Estrona, do 17 β Estradiol e do Estriol para o nível baixo de concentração.

- *Sedimento*

Os resultados do procedimento para extração dos estrógenos e do estimulante cafeína em amostra de sedimento no nível de 1 μ g mL⁻¹ (Tabela 15), revelam a eficiência da extração para os três níveis de fortificação com valores de recuperação entre 75 – 107% e coeficientes de variação entre 0,5 –18,51% para o tempo de ambientação de 30 min, entre 102 – 138% e coeficientes de variação entre 3,03 –10,42% para o tempo de ambientação de 2 horas e entre 87 – 133% e coeficientes de variação entre 0,91 –18,54% para o tempo de ambientação de 24 horas.

Tabela 15: Resultados de recuperação média (n = 3) e coeficiente de variação (CV%) para a matriz sedimento.

Composto	30 min de		2h de		24 h de	
	contato	CV %	contato	CV %	contato	CV %
Estrona (E1)	110 %	0,50	120 %	3,03	87 %	6,86
17 β estradiol (E2)	107 %	18,51	138 %	3,51	106 %	18,54
Estriol (E3)	102 %	5,40	107 %	2,52	91 %	3,48
17 α etinilestradiol (EE2)	101 %	8,81	133 %	10,42	133 %	0,91
Cafeína (CAF)	75 %	4,18	103 %	9,49	103 %	7,95

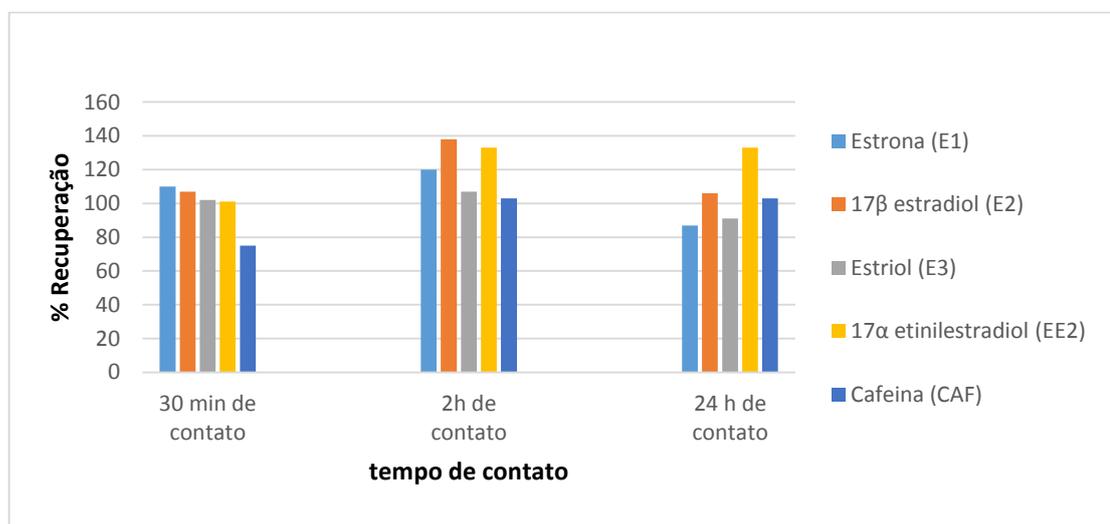
Fonte: Autora, 2016.

BEZERRA (2014) estudou a ocorrência dos estrógenos naturais e sintéticos no sedimento do Rio Bauru e Ribeirão das Cruzes, utilização a técnica de extração por QuEChERS seguido de análise simultânea por HPLC-FLD-UV, encontrou recuperações na faixa de 70-139 % para os compostos estrona (E1), 17 β -estradiol (E2), 17 α -etinilestradiol (EE2) e estriol (E3).

No estudo de Canaver (2012), foram analisadas matrizes de solo e lodo biológico, com determinação analítica feita por HPLC/UV/Fluorescência, o método apresentou recuperações na faixa de 46-94%.

Para RIBANI (2004) 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 $\pm 15\%$. Os valores encontrados nesse estudo estão inseridos no limite aceitável para metodologias de extração em matrizes complexas (80 – 120%) para a ANVISA (2003), com exceção do 17β estradiol (E2) e do 17α etinilestradiol (EE2), conforme figura 25.

Figura 25: Resultados de recuperação média (n = 3), para a matriz sedimento.



Fonte: Autora, 2016.

5.3.6 Avaliação do Efeito Matriz

- *Água*

Para o estudo de um método analítico, os possíveis efeitos de matriz na análise por cromatografia devem ser levados em consideração, visando comprovar a ausência ou presença desse fenômeno sobre uma larga faixa de concentração do analito na matriz. Sabendo disso, foram concebidas curvas analíticas na matriz ambiental e no solvente. Foi verificada influência significativa do efeito de matriz para todos os analitos de interesse (Tabela 16), onde o efeito se pronunciou de forma

negativa, de modo que se os analitos forem quantificados através das curvas analíticas obtidas no solvente, à concentração dos analitos na matriz seria subestimada, dado o efeito negativo da matriz.

Quando comparadas às curvas analíticas uma preparada na matriz e outra preparada em solvente, verificou-se forte efeito matriz para os compostos estudados; na cafeína o efeito de matriz foi pouco significativo, em amostras sólidas a remoção de possíveis interferentes contidos na matriz da amostra corrobora para uma redução do provável efeito matriz causado por componentes provenientes da amostra.

Particularmente para a cromatografia líquida, diversos analitos sofrem com o efeito de matriz. Esse caso é muito evidenciado em matrizes complexas, onde a intensidade do efeito de matriz é influenciada pela natureza complexa da amostra e pelos tipos de coextrativos (tamanho das moléculas, polaridade, etc.) presente na amostra. Sendo assim, os componentes da matriz têm influência direta na quantificação dos compostos, de maneira que o efeito da matriz é mais significativo em amostras complexa (GUEDES 2014).

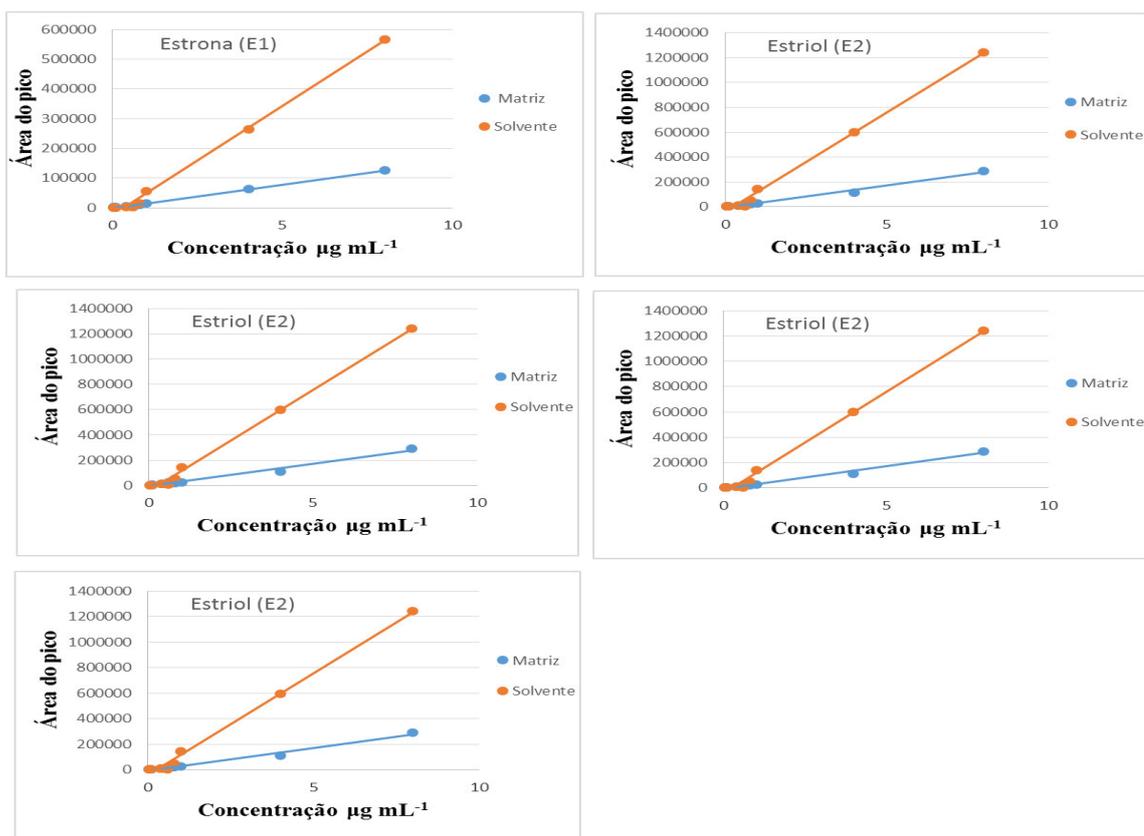
Observando-se visualmente as inclinações das curvas analíticas (Figura 26), podemos associar com os resultados do efeito de matriz, sugerindo a utilização das curvas analíticas preparadas na matriz para a quantificação dos analitos.

Tabela 16: Efeito matriz (%) dos compostos estudados na matriz água.

Composto	Efeito Matriz %
Estrona (E1)	-78,22
17 β Estradiol (E2)	-82,26
Estriol (E3)	-77,93
17 α Etinilestradiol (EE2)	-81,84
Cafeína (CAF)	-29,36

Fonte: Autora, 2015.

Figura 26: Comparação visual do efeito de matriz na matriz água.



Fonte: Autora, 2015.

- *Sedimento*

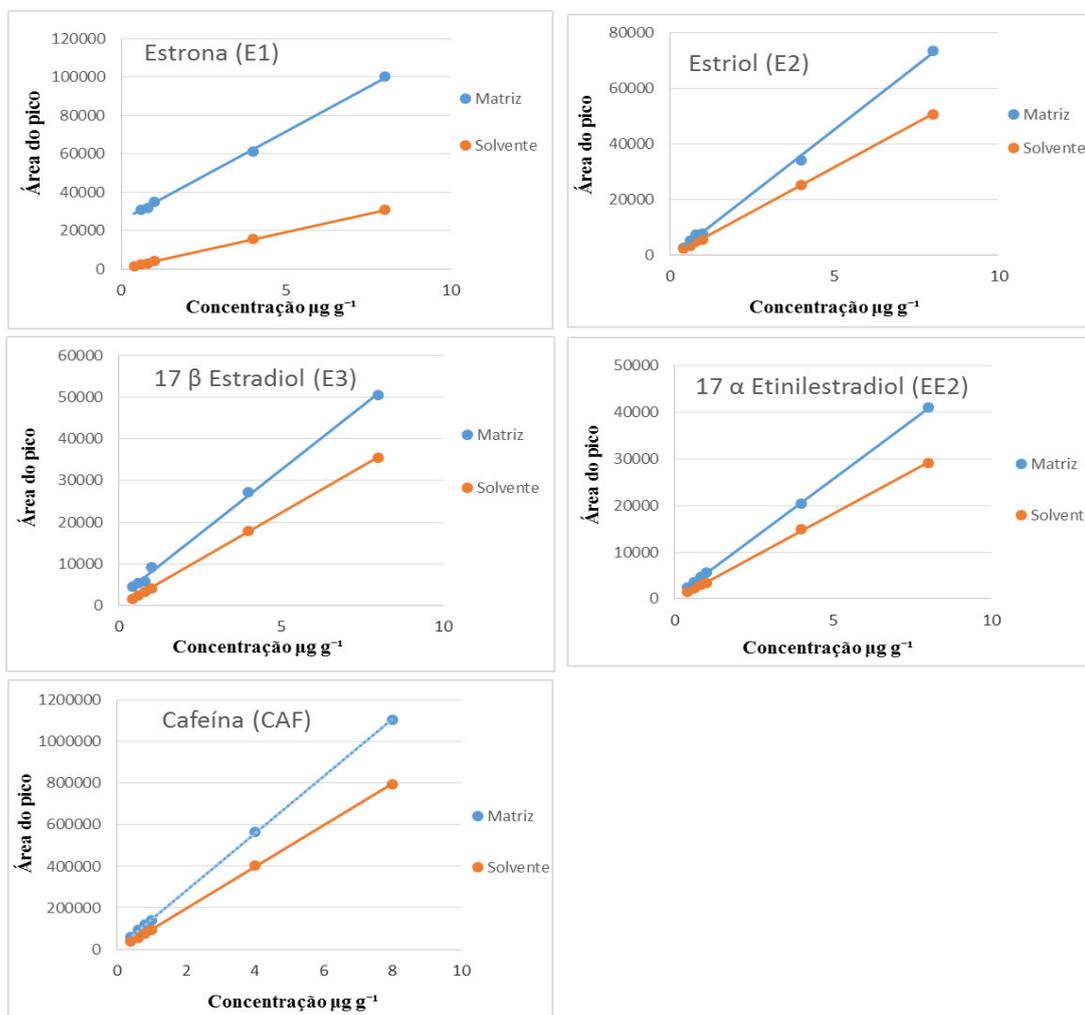
O estudo de efeito matriz produzido pelo método QuEChERS em sedimento foi realizado a partir de sete pontos da curva de calibração adicionados ao extrato da matriz. As curvas analíticas e análise estatística estão representadas na Figura 27 e Tabela 17, as quais demonstram um aumento na resposta do sinal analítico para todos os estrógenos.

Tabela 17: Efeito matriz (%) dos compostos estudados na matriz sedimento.

Composto	Efeito Matriz %
Estrona (E1)	142
17β estradiol (E2)	37
Estriol (E3)	44
17α etinilestradiol (EE2)	38
Caféina (CAF)	37

Fonte: Autora, 2016.

Figura 27: Comparação visual do efeito de matriz para a matriz sedimento



Fonte: Autora, 2016

Quanto à sensibilidade, o método QuEChERS provoca efeito matriz significativo para E1, E2, E3, EE2 e CAF com superestimação de 142 %, 36 %, 44 %, 38 % e 37 % do sinal analítico, respectivamente. Esse efeito matriz pode ser atribuído à complexidade dessa matriz ambiental que é constituída por compostos orgânicos, inorgânicos, substâncias húmicas e não húmicas entre outros.

Dessa forma, a quantificação desses analitos deve ser realizada pela curva preparada no extrato da matriz, uma vez que a resposta dos padrões foi estatisticamente diferente entre as curvas, demonstrando a presença de efeito matriz significativo.

5.4 Análise dos interferentes endócrinos e da cafeína na amostra ambiental

- *Água*

O estudo constituiu de três coletas em três pontos, ASA 1, ASA 2 e ASA 3 considerados específicos para o estudo. Os cromatogramas obtidos apresentaram poucos picos cromatográficos, referentes aos compostos de interesse, ao contrário do que se esperava, visto constatação comprovada de lançamento de efluentes não tratados no açude.

Diante disto, foi concluído que apenas o composto cafeína conseguiu ser detectado, no ponto ASA 1, nas três companhias amostrais foram encontrados os valores de $0,54 \mu\text{g L}^{-1}$; $0,93 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,79 \mu\text{g L}^{-1}$.

A cafeína é considerada uns dos principais indicadores no aporte de espécies antrópicas em sistemas aquáticos naturais (SIEGENER; CHEN, 2002). A presença deste composto está relacionada diretamente com o despejo de esgoto doméstico não tratado nessas matrizes, o que indica o elevado nível de degradação em que se encontram o corpo hídrico. A concentração de cafeína encontrada no primeiro ponto (ASA1) confirma o que era esperado devido ao lançamento frequente e sem tratamento de efluentes domésticos da comunidade próxima, no segundo ponto (ASA2) não foi detectado, evidenciado uma provável degradação desse composto ao longo do corpo hídrico.

LISBOA FILHO (2012) em seu estudo utilizando a técnica SPE-CG-MS, a estrona foi detectada apenas na estação seca em duas amostras a uma concentração de $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$. Nas amostras coletadas nos corpos d'água da Baía de Todos os Santos (BTS), não foi detectada a presença de estrona, pois esta encontrava-se em níveis abaixo do limite de quantificação do método proposto.

O estudo de RAIMUNDO (2007), apresentou baixa contaminação por cafeína, com resultados abaixo do limite de detecção para cafeína, igual a $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto que o 17α - etinilestradiol (EE2) não foi determinado em sua terceira campanha e esteve presente em apenas 5 das 34 amostras analisadas. Já a estrona não foi detectado nas amostras em concentrações superiores aos seus limites de detecção que foram estabelecidos em 16 ng L^{-1} .

No presente estudo não foram detectados níveis significativos dos IE, provavelmente devido aos seus altos valores de coeficiente de partição (K_{ow}), descritos na tabela 2.

- *Sedimento*

Na matriz sedimento avaliada no Açude Santo Anastácio foram encontradas concentrações de dois estrógenos inseridos neste trabalho. Detectou-se a presença desses compostos durante a campanha de amostral de agosto de 2015, o composto 17 β estradiol em dois dos três pontos selecionados, e o estrógeno estriol foi detectado nos três pontos de coleta, os demais compostos apresentaram concentrações abaixo do limite de quantificação (Tabela 18).

Tabela 18: Concentração dos DEs e do estimulante cafeína no sedimento.

Composto	ASA1 mg Kg ⁻¹	ASA2 mg Kg ⁻¹	ASA3 mg Kg ⁻¹
Estrona (E1)	<LQ	<LQ	<LQ
17β estradiol (E2)	<LQ	0,76	1,74
Estriol (E3)	3,53	4,94	3,81
17α etinilestradiol (EE2)	<LQ	<LQ	<LQ
Cafeína (CAF)	<LQ	<LQ	<LQ

Fonte: Autora, 2016.

6. CONCLUSÃO

O desenvolvimento da metodologia analítica para a identificação e quantificação dos hormônios estrógenos naturais Estrona, 17 β -estradiol, Estriol, do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol e do estimulante cafeína, em águas superficiais utilizando a técnica de extração em fase sólida (SPE) e no sedimento usando a técnica de extração sólido-líquido QuEChERS, seguida de análise por 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⁻¹.

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

A análise das amostras ambientais realizadas em diferentes detectou a presença de pelo menos um estrógeno em 100% das amostras de sedimentos coletadas no Açude Santo Anastácio. Na fase água, apenas o ponto ASA 1 das amostras coletadas apresentou a presença da estimulante cafeína.

Dos estrógenos quantificados, o natural E3 que corresponde ao produto de degradação do E2, esteve presente em aproximadamente 100% das amostras de sedimento o que pode estar intrinsecamente relacionado ao fato desse manancial receber descarga contínua de efluente sem tratamento ao longo do seu curso.

7. REFERÊNCIAS

1. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Guia para o controle da qualidade para análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos para os laboratórios integrados do PARA.** Brasília, 2006.
2. 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.
3. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA): relatório de atividades de 2010.** Brasília, 2011.
4. 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.
5. 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.
6. ANASTASSIADES, M. LEHOTAY, S.J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for determination of pesticides residue in produce. **J. AOAC Int.**, v.86, p. 412-431, 2003.
7. AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*. **Peer-Verified Methods Program: Manual on Policies and Procedures**, Arlington, VA. 1998.
8. ARAÚJO, G. M.; NETO, I. E. L.; BECKER, H. Modelagem matemática do fósforo em um canal de drenagem urbana localizado em Fortaleza -CE. **XIII SIMPÓSIO IBEROAMERICANO DE REDES DE ÁGUA, ESGOTO, ESGOTO E DRENAGEM**, Línguas Ibéricas como Instrumento de Conhecimento, Ciência e Tecnologia 03 a 06 de Novembro de 2014, Fortaleza – Brasil ,2014.

9. 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.
10. ARAÚJO, S. A. M. **Desenvolvimento e validação de um método analítico (SPE-HPLC) para determinação de compostos emergentes em águas superficiais**. Tese (Doutorado em Engenharia Civil-Saneamento Ambiental) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.
11. AZCOITIA, I.; YAGUE, J. G.; GARCIA-SEGURA, L. M. Estradiol synthesis within the human brain. *Neuroscience*, 2011. Doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.02.012.
12. AZZOUZ, A.; BALLESTEROS, E. Combined microwave-assisted extraction and continuous solid-phase extraction prior to gas chromatography–mass spectrometry determination of pharmaceuticals, personal care products and hormones in soils, sediments and sludge. *Science of the Total Environment*, v. 419, p. 208-215, 2012.
13. BAIRD, C.; CANN, M. **Química Ambiental**, 2^a ed., Bookman: Porto Alegre, 2002, cap. 6 e 7.
14. BEZERRA, D. S. S., **Estrógenos na bacia hidrográfica Tietê-Jacaré: ocorrência e avaliação do impacto ambiental**. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, 2014.
15. BIELICKA-DASZKIEWICZ, K.; VOELKEL, A. **Theoretical and experimental methods of determination of the breakthrough volume of SPE sorbents**. *Talanta*, v. 80, p.614-621, 2009.
16. BILA, D. M.; DEZOTTI, M. **Fármacos no meio ambiente**. *Química Nova*, v.26, n.4, p.523-530, 2003.
17. BILA, D.M. E DEZOTTI, M. **Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências**. *Química Nova*, v.30, n.3, p.651-666, 2007.

18. BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes.**; Lewis Publishers, 2003. 295 p.
19. BRASIL. Lei Nº 9.433, de 08 de janeiro de 1997. Dispõe sobre a Política Nacional de Recursos Hídricos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9433.htm >. Acesso em: 2 jun. 2015.
20. BRAUN, P.; MOEDER, M.; SCHRADER, ST.; POPP, P.; KUSCHK, P.; ENGEWALD, W. **Trace analysis of technical nonylphenol, bisphenol A and 17 α -ethinylestradiol in wastewater using solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A*, v.988, p. 41-51, 2003.
21. BRONDI, S. H. G. et al. Evaluation of the QuEChERS method and gas chromatography–mass spectrometry for the analysis pesticide residues in water and sediment. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 86, p.18-22, 2011.
22. CANAVER, E. G. **Otimização e validação de método cromatográfico para determinação de 17 β – estradiol, esrona e estriol em solo tratado com esterco animal e lodo de ETE.** Dissertação (Mestrado em Química) Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 2012.
23. CARBALLA, M.; OMIL, F.; TERNES, T.; LEMA, J.M. Fate of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge. **Water Research**, v. 41, p. 2139-2150, 2007.
24. CHAVES, F. D. N. et al. Population features of *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828) (Siluriformes, Callichthyidae) at Santo Anastacio Reservoir, Brazil. **Revista MVZ Cordoba (online)**, Córdoba, v. 18, n. 3, p. 3767-3772, set/dic. 2013.
25. CHEN, M.; OHMAN, K.; METCALFE, C.; IKONOMOU, M. G.; AMATYA, P. L.; WILSON, J.. 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.

26. COMBALBERT, S.; HERNANDEZ-RAQUET, G. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 86, p. 1671-1692, 2010.
27. CRAIN D.A.; JANSSEN S.J.; EDWARDS T.M.; HEINDEL J.; HO S.; HUNT P.. **Female reproductive disorders: the role of endocrine-disrupting compounds and developmental timing**. *Fertility Sterility*, v. 90, p. 911-940, 2008.
28. D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; GENTILI, A.; MANCINI, R.; MASTROPASQUA, R. NAZZARI, M. SAMPERI, R.. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. **The Science of the Total Environment**, v. 302, p. 199-209, 2003.
29. De MES, T.; ZEEMAN, G.; LETTINGA, G. **Occurrence and fate of estrone, 17 β -estradiol and 17 α -etiniestradiol in STPs for domestic wastewater**. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v.4, p. 275-311, 2005.
30. DEAN, J.R. **Extraction Methods for Environmental Analysis**. 1st Ed. Chichester: John Wiley & Sons, 1998, 225p.
31. DEGANI A.L.G.; CASS Q.B.; e VIEIRA P.C. Cromatografia um breve ensaio. **Quimica Nova na Escola**, v. 7, p. 34-36, Maio 1998.
32. DIRTU, A. C. et al. Analytical methods for selected emerging contaminants in human matrices-a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 9, p. 2555-2581, 2012.
33. DROŹDŹYŃSKI, D.; KOWALSKA, J. Rapid analysis of organic farming insecticides in soil and produce using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 394, p. 2241-2247, 2009.
34. EERTMANS F., DHOOGHE W., STUYVAERT S., COMHAIRE F. **Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment**. *Toxicology in Vitro*, v. 17, p. 515-524, 2003.

35. FALONE, S. **Desenvolvimento de Metodos para determinacao do hormonio 17 alfa metiltestoterona em amostras de agua e sedimento de piscicultura: ensaios toxicologicos com cladoceros.** Tese (Doutorado em Ciencias da Engenharia Ambiental) Departamento de Engenharia Ambiental - Universidade de Sao Paulo, São Carlos, 2007.
36. FARIAS, D.B.A. Monitoramento do açude Santo Anastácio, Campus do Pici. Monografia de graduação em Química Bacharelado. Fortaleza, 2008.
37. FARIAS, E. G. G.; MAIA, L. P.; BEZERRA, M. A. **Relatório do mapeamento batimétrico de nove (09) corpos hídricos da cidade de Fortaleza.** (Cartas, mapas ou similares/Mapa). Parceria SEMAM/PM Fortaleza e LABOMAR/UFC, 2007.
38. GABET, V.; MIÈGE, C.; BADOS, P.; COQUERY, M.. Analysis of estrogens in environmental matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1113-1131, 2007.
39. 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.
40. 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).** Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
41. GHISELLI, G.; JARDIM, W.F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**. v.30, n.3, p.695-706, 2007.
42. 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.

43. GONG, J. RAN, Y.; CHEN, D. Y.; YANG, Y.. Occurrence of endocrine-disrupting chemicals in riverine sediments from the Pearl River Delta, China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 63, n. 5/12, p. 556-563, 2011.
44. GONZÁLEZ, S.; LÓPEZ-ROLDÁN, R.; CORTINA, R-L. Presence and biological effects of emerging contaminants in Llobregat River basin: a review. **Environmental Pollution**, v. 161, p. 83-92, 2012.
45. GRUND, S.; HIGLEY, E.; SCHONENBERGER, R.; SUTER, M. J-F.; GIESY, J. P. BRAUNBECK, T.; HECKER, M; HOLLERT, H.. The endocrine disrupting potential of sediments from the Upper Danube River (Germany) as revealed by *in vitro* bioassays and chemical analysis. **Environmental Science Pollution Research**, v. 18, n. 3, p. 446-460, 2011.
46. GUEDES, J. A. C. **Validação de método analítico empregando QuEChERS e CG-EM para determinação multirresíduo de agrotóxico em goiaba.** Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.
47. GUNATILAKE, S. R.; CRAVER, S.; KWON, J-W. Analysis of estrogens in wastewater using solid-phase extraction, QuEChERS cleanup, and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 96, p. 1440-1447, 2014.
48. HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa.** Tradução da 8. ed. Norteamericana. Rio de Janeiro: LTC, 2012.
49. IBGE– Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censos Demográficos.** 1991- 2000. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/series_estatisticas> Acesso em: janeiro, 2015.
50. INGRAND, V.; HERRY, G.; BEAUSSE, J.; ROUBIN, M. **Analysis of steroid in effluents of wastewater treatment plants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A*, v. 1020, P. 99-104, 2003.

51. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos.** DOQ-CGCRE-008. 2006.
52. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de analíticos.** DOQ-CGCRE-008, Revisão 04, 2011.
53. KELLY, C. **Analysis of steroids in environmental water samples using solid-phase extraction and ion-trap gas chromatography – mass spectrometry and gas chromatography – tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v. 872, p.309-314, 2000.
54. KIM, B.C., PARK, K.S., KIM, S.D., GU, M.B. **Evaluation of a high throughput toxicity biosensor and comparison with a *Daphnia magna* bioassay.** Biosensors and Bioelectronics, v.18, p.821-826, 2003.
55. KIM, S.; LEE, S.; KIM, S.; LIU, X.; SEO, J.; JUNG, H.; JI, K.; HONG, S.; PARK, J.; KHIM, J. S.; YONN, S.; LEE, W.; PARK, J.; CHOI, K.. *In vitro* and *in vivo* toxicities of sediment and surface water in an area near a major steel industry of Korea: endocrine disruption, reproduction, or survival effects combined with industrial analysis. **Science of the Total Environment**, v. 470/471, p. 1509-1516, 2014.
56. 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.
57. LaFLEUR, A. D.; SCHUG, K. A. A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems. **Analytica Chimica Acta**, v. 696, p. 6-26, 2011.
58. LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise.** São Carlos: Rima, 2004.

59. LIMA, F.P. DE. **Avaliação do processo de assoreamento do açude Santo Anastácio – Fortaleza/CE e sua influência no ecossistema local.** Monografia de graduação em Engenharia de Pesca. Fortaleza, 2011.
60. LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A. **Endocrine disruptors in the environment – IUPAC Technical Report.** Pure Applied Chemistry. v. 75, n°5, p. 631-681, 2003.
61. LISBOA FILHO, N. S. **Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de interferentes endócrinos: aplicação em amostras da água da Baía de Todos os Santos.** Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2012.
62. LIU, R.; ZHOU, J.L.; WILDING, A. **Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v. 1022, p. 179-189, 2004a.
63. LOPES, L. G.; MARCHI, M. R. R.; SOUZA, J. B. G.; LORENZON, C. S.; CRUZ, C.; AMARAL, L. A.. Estrogênios em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal – São Paulo. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 639-643, 2010.
64. LUCCI, P.; NÚÑEZ, O.; GALCERAN, M. T. Solid-phase extraction using molecularly imprinted polymer for selective extraction of natural and synthetic estrogens from aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 30, p. 4828-4833, 2011.
65. LUO, J. et al. Identification of estrogen receptor agonists in sediments from Wenyu River, disruptors in rat testis by QuEChERS-based extraction and LC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, p. 2777-2788, 2012.
66. MACHADO, K. S; **Determinação de hormônios femininos na bacia do Alto Iguaçu, região metropolitana de Curitiba-PR.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

67. MARFIL-VEGA, R.; SUIDAN, M. T.; MILLS, M. A. Abiotic transformation of estrogens in synthetic municipal wastewater: an alternative for treatment? **Environmental Pollution**, v. 158, p. 3372-3377, 2010.
68. MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: Revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v. 30, p. 99 – 105, 2007.
69. MARTÍN, J. et al. Multi-residue method for the analysis of pharmaceutical compounds in sewage sludge, compost and sediments by sonication-assisted extraction and LC determination. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 1760-1766, 2010.
70. MARTINS, G. L. **Determinação de resíduos de pesticidas em solo de lavoura de arroz irrigado empregando QuEChERS modificado e LC-MS/MS**. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
71. MAŠTOVSKÁ, K.; LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. **Journal of Chromatography A**, v. 1040, p. 259-272, 2004.
72. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**. Brasília, 2011.
73. MOL, H.G.J.; SUNARTO, S.; STEIJGER, O.M. **Determination of endocrine disruptors in water after derivatization with N – methyl – N- (tert – butyldimethyltrifluoroacetamide) using gas chromatography with mass spectrometric detection**. *Journal of Chromatography A*, v. 879, p. 97-112, 2000.
74. 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.

75. NAKAMURA, S.; SIAN, T. H.; DAISHIMA, S. Determination of estrogens in river water by gas chromatography - negative - ion chemical - ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 919, p. 275-282, 2001.
76. NORLI, H. R.; CHRISTIANSEN, A.; DERIBE, E. Application of QuEChERS method for extraction of selected persistent organic pollutants in fish tissue and analysis by gas chromatography mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7234-7241, 2011.
77. OLIVEIRA, A. C. D., **Avaliação da Qualidade da Água do Açude Santo Anastácio**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Pós-Graduação em Química UFC, 2013.
78. OLIVEIRA, C. N.; CAMPOS, V. P., MEDEIROS, Y. D. P. **Avaliação e identificação de parâmetros importantes para a qualidade de corpos d'água no semiárido baiano, estudo de caso: bacia hidrográfica do rio salitre**; Química nova, vol. 33. No. 5, 1059-1066, 2010.
79. PAL, A.; GIN, K. Y. H.; LIN, A. Y. C.; RENHARD, M.. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 6062-6069, 2010.
80. 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.
81. PESSOA, G. P. **Avaliação de desreguladores endócrinos e do micropoluente colesterol em estações de tratamento de esgoto sanitário**. Tese (Doutorado em Engenharia Civil-Saneamento Ambiental) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.
82. 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.

83. POUECH, C. et al. Multi-residue analysis of free and conjugated hormones and endocrine disruptors in rat testis by QuEChERS-based extraction and LC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, p. 2777-2788, 2012.
84. PRESTE, O. D. *et al.* QuEChERS- Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, p. 1620-1634, n. 6, 2009.
85. QUEIROZ, F.B. **Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de fármacos e perturbadores endócrinos em amostras de esgoto utilizando extração em fase sólida e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas**. 2011. 132 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG, 2011.
86. QUINTANA, J.B.; CARPINTEIRO, J.; RODRIGUEZ, I.; LORENZO, R.A.; CARRO, A.M.; CELA, R. **Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection**. *Journal of Chromatography A*, v. 1024, p. 177-185, 2004.
87. RAIMUNDO, C. C. M. **Contaminantes emergentes em água tratada e seus mananciais: sazonalidade, remoção e atividade estrogênica**. 2011, Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.
88. RAIMUNDO, C. C. M. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2007.
89. REIS FILHO, R.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 817-822, 2006.
90. REIS, V. C. **Efeitos da hiper-eutrofização do açude santo anastácio na estrutura da ictiofauna, Fortaleza, CE**. **Monografia** - Universidade Federal do Ceará, Departamento De Biologia, Fortaleza, 2010.

91. Resolução CONAMA N° 357, de 17 de março de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras providências.** DOU N°53, Brasília.
92. RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B. G; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Química Nova, v.27, n°5, p.771-780, 2004.
93. RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química nova.** v.31, n.1, p.164-171, 2008.
94. RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; LÓPEZ DE ALDA, M.J.; 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.
95. SALVADOR, A.; MORETTON, C.; PIRAM, A.; FAURE,R. **On-line solid-phase extraction with on-support derivatization for high-sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry of estrogens in influent/effluent of wastewater treatment plants.** Journal of Chromatography A, v.1145, p.102-109, 2007.
96. SALVIA, M. V.; CREN-OLIVÉ, C.; VULLIET, E. Statistical evaluation of the influence of soil properties on recoveries and matrix effects during the analysis of pharmaceutical compounds and steroids by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A.** v.1315, p.53-60, 2013.
97. SCHÄFER , A. I.; AKANYETI, I.; SEMIÃO, A. J. C. Micropollutant sorption to membrane polymers: a review of mechanisms for estrogens. **Advances in Colloid and Interface Science,** v. 164, p. 100-117, 2011.
98. 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.

99. SIEGENER R., CHEN R. F.; **Caffeine in Boston Harbor seawater;** *Mar.Pollut.Bull.*; 44; 383-387; 2002.

100. SOUZA, N. C. **Avaliação de micropoluentes emergentes em esgotos e águas superficiais.** Tese (Doutorado em Engenharia Civil-Saneamento Ambiental) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

101. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 21.ed. Washington, DC, EUA: American Public Health Association (APHA), the American Water Works Association (AWWA), and the Water Environment Federation (WEF), 2005.

102. STEWART, M. et al. A survey of emerging contaminants in the estuarine receiving environment around Auckland, New Zealand. **Science of the Total Environment**, v. 468/469, p. 202-210, 2014.

103. SUN, K.; GAO, B.; ZHANG, Z.; ZHANG, G.; LIU, X. ZHAO, Y.; XING, B.. Sorption of endocrine disrupting chemicals by condensed organic matter in soils and sediments. **Chemosphere**, v. 80, p. 709-715, 2010.

104. TADEO, J. L.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; ALBERO, B.; VALCÁRCEL, A. I. G.; PÉREZ, R. A.. Analysis of emerging organic contaminants in environmental solid samples. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 480-520, 2012.

105. TAIEB, J.; LACHGAR-KELTOUM, M. L'estradiol: caractéristiques immunoanalytiques. **Immunoanalyse en Biologie Spécialisée**, v. 26, n. 280/286, p. 280-286, 2011.

106. TAPIERO H.; NGUYEN-BA, G.; TEW, K. D. Estrogens and environmental estrogens. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, p. 36-44, 2002.

107. TOMSÍKOVÁ,H.; AUFARTOVÁ, J.; SOLICH,P.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ,J.J; NOVÁKOVA, L. **High-sensitivity analysis of**

female-steroid hormones in environmental samples. Trends in Analytical Chemistry, v. 34, p.35-58, 2012.

108. USEPA. **Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS.** U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC, 2007.

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

110. VERBINNEN, R.T.; NUNES, G.S.; VIEIRA, E. M. Determinação de hormônios estrogênicos em água potável usando CLAE-DAD. **Química Nova.** v. 33, n°9, p. 1837 - 1842, 2010.

111. VIDAL, C. B. **Remoção de desreguladores endócrinos presentes em matrizes ambientais por adsorção usando argila pilarizada.** Tese Doutorado (Doutorado em Engenharia Civil-Saneamento Ambiental) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

112. VIDAL, C.B., PESSOA, G.P., FEITOSA, A.V., RAULINO, G.S.C., OLIVEIRA, A.G., SANTOS, A.B., NASCIMENTO, R.F. **Polymeric and silica sorbents on endocrine disruptors determination.** Desalination and Water Treatment (Print), v.1, p.1-10, 2014.

113. 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.

114. WATKINSON, A. J., MURBYC, E. J., COSTANZO, S. D. **Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling.** Water Research, v. 41, p. 4164 – 4176, 2007.

115. WEIGEL, S.; BERGER, U.; JENSEN, E.; KALLENBORN, R.; THORESEN, H.; HUHNERFUSS, H. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in

sewage and seawater from Tromso/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. **Chemosphere**, v. 56, p. 583-592, 2004.

116. WENZEL, A.; MÜLLER, J.; TERNES, T. **Study on endocrine disrupters in drinking water**. Wiesbaden: Institute for Water Research and Water Technology, 2003. Final Report.

117. WHO -World Health Organization. **Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors**. 2002.

118. YAKABE C.; HONDA A. M.; MAGALHAES J. F. Determinacao do 17 β -estradiol nas formas farmaceuticas gel e adesivo transdermico. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 3, jul./set., 2005.

119. ZENG, Y-H.; LUO, X-J.; CHEN, H-S. Method for the purification of polybrominated diphenyl ethers in sediment for compound-specific isotope analysis. **Talanta**, v. 111, p. 93-97, 2013.

120. ZHANG, F.; WANG, L.; ZHOU, L.; WU, D.; PAN, H.; PAN, C.. Residue dynamics of pyraclostrobin in peanut and field soil by QuEChERS and LC-MS/MS. **Ecotoxicology and Environment Safety**, v. 78, p. 116-122, 2012.