UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Desenvolvimento e validação de método analítico para análise de bisfenol A e
nonilfenol em águas superficiais da cidade de Americana, SP.

Aluna: Daniele Alves de Souza Beraldo
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eny Maria Vieira

Abril, 2012

Daniele Alves de Souza Beraldo

Desenvolvimento e validação de método analítico para análise de bisfenol A e nonilfenol em águas superficiais da cidade de Americana, SP.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Química Analítica e Inorgânica.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eny Maria Vieira

São Carlos

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo.

À Profa. Dra. Eny Maria Vieira pela orientação, carinho e pela oportunidade de realizar este trabalho.

À banca examinadora.

Aos meus pais Waldemar e Alice pelo amor e apoio incondicional e pela confiança que depositaram em mim.

Ao meu marido Angelo e ao meu filho Marcelo que mesmo distantes sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e dando força para que eu não desanimasse.

Aos meus familiares Daniel, Iaponira, Thiana, Edson, Flávia, Kiko, Juninho e Sinésio

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Profa. Clarice Maria Rispoli Botta por disponibilizar o laboratório para que fossem realizados os testes ecotoxicológicos.

As minhas amigas de laboratório (Adriana, Luciana e Daniela) que sempre me deram força e me ajudaram nas situações em que precisei, agradeço a elas também pelos momentos de risadas e companheirismo.

Aos demais amigos do LaQuAAE (Raphael, Eliane, Gláucia, Tatiane, Carol, Heloísa e Mariângela) pela amizade.

A minha grande amiga Luciana Fontes de Oliveira pela força e amizade durante os anos de graduação e mestrado.

Aos meus amigos de São Carlos (Gustavo, Ana Luiza, Giovana, Monise e Mayara) e aos meus amigos de Americana (Daniele, Fernando, Viviane e Cristiano).

A todos os funcionários da pós-graduação do IQSC-USP e principalmente a Gislei que inúmeras vezes me ajudou nas mais variadas dúvidas que tive durante esse período.

A CAPES pela bolsa concedida e a FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

Neste estudo determinou-se o nonilfenol - um composto xenobiótico utilizados na fabricação de antioxidantes, aditivos para óleos lubrificantes e produção de surfactantes etoxilados – e o bisfenol A - um composto químico utilizado na produção de diversos produtos, como, plásticos policarbonatos, resinas epóxi e retardantes de chama. Ambos exibem atividade estrogênica em concentrações abaixo de 1 ng L^{-1} - em cinco pontos de coleta na cidade de Americana, SP. Devido à ampla utilização, esses compostos estão presentes em esgoto industrial em quantidades substanciais. A primeira etapa deste estudo foi a validação dos método analítico seguindo o Método 8270D da United States Environmental Protection Agency (USEPA) que descreve o procedimento de validação para os compostos semivoláteis analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS). Os limites de detecção e de quantificação do método para a determinação do nonilfenol foram, respectivamente, 1 e $5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. O coeficiente de determinação (R^2) e a recuperação média para o nonilfenol foram, respectivamente, 0,99 e 99,04%. Os limites de detecção e de quantificação do método para o bisfenol A foram, respectivamente, 1 e $5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. O coeficiente de determinação (R^2) e a recuperação média para o bisfenol A foram, respectivamente, 0,99 e 91,55%. Na segunda etapa desta pesquisa analisaram-se amostras de água coletadas na cidade de Americana para a determinação do nonilfenol e do bisfenol A. Como método de extração dos compostos, usou-se a extração em fase sólida (SPE) e como técnica analítica a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS). Os resultados indicaram a presença desses compostos em alguns pontos de amostragem sendo que a concentração do nonilfenol variou de 5,028 a $10,524\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ e para o bisfenol A a concentração variou de 5,645 a $295,255\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. Foram feitos também testes ecotoxicológicos utilizando como organismo teste o microcrustáceo *Daphnia similis*, porém o nonilfenol e o bisfenol A, na concentração testada que variou de 0,05 a $500\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ não apresentaram toxicidade aguda.

Palavras-chave: nonilfenol, bisfenol A, GC/MS.

ABSTRACT

In this study it was determined nonylphenol – a xenobiotic compound used in the manufacture of antioxidants, additives for lubricating oils and production of ethoxylated surfactant – and bisphenol A – a chemical compound used in production of various products, such as polycarbonate plastic, epoxy resins and flame retardants. Both exhibit estrogenic activity at concentrations lower than 1 ng L^{-1} – in five sampling points in the city of Americana, SP. Due to the widespread use of these compounds, they are present in substantial quantities in industrial sewage. The first step of this study was to validate the analytical method following the Method 8270D of the United States Environmental Protection Agency (USEPA) that describes the validation procedure for semi-volatile compounds analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). The limits of detection and quantification for determining the nonylphenol were, respectively, 1 and $5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. The coefficient of determination (R^2) and recovery for nonylphenol were respectively 0.99 and 99.04%. The limits of detection and quantification for the bisphenol A were, respectively, 1 and $5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. The coefficient of determination (R^2) and recovery for bisphenol A were respectively 0.99 and 91.55%. In the second step of this study were analyzed in water samples of Americana city for the determination of nonylphenol and bisphenol A. As a method of extraction of the compounds it was used solid-phase extraction (SPE) and as analytical technique GC/MS. The results indicated the presence of such compounds in some sampling points and the concentration of nonylphenol ranged from 5.028 to $10.524 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ and bisphenol A concentration ranged from 5.645 to $295.255 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Ecotoxicological tests were also performed using as test organism microcrustaceans *Daphnia similis*, but nonylphenol and bisphenol A, tested at concentration ranging from 0,05 to $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ showed no acute toxicity.

Keywords: nonylphenol, bisphenol A, GC/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Glândulas que compõem o sistema endócrino humano (Adaptado de FARABEE, 2001).	19
Figura 2 - Mecanismo de ligação entre o hormônio e o receptor hormonal gerando (a) resposta natural, (b) efeito agonista, (c) efeito antagonista (Adaptado de LINTELMANN, 2003).	20
Figura 3 - Estrutura molecular do bisfenol A.	21
Figura 4 - Estrutura molecular do nonilfenol.....	23
Figura 5 - Etapas envolvidas na extração em fase sólida - SPE (Adaptado de SOUZA, 2011).	25
Figura 6 - Ponto de coleta da água da nascente do Rio Santa Maria do Leme (Foto Daniele, 2011).	32
Figura 7 - Etapas envolvidas na extração do nonilfenol e do bisfenol A.	33
Figura 8 - Programação da temperatura do forno.	34
Figura 9 - Ponto 1 - Rio Piracicaba (Foto Daniele 2012).	37
Figura 10 - Foto de satélite do ponto 1 - Rio Piracicaba (Fonte: Google Earth).	38
Figura 11 - Ponto 2 - Ribeirão Quilombo (Foto Daniele, 2012).	38
Figura 12 - Foto de satélite do Ponto 2 - Ribeirão Quilombo (Fonte: Google Earth).	39
Figura 13 - Foto de satélite dos pontos, 3, 4 e 5 (Fonte: Google Earth).	39
Figura 14 - Cromatograma do nonilfenol mostrando seu tempo de retenção.	41
Figura 15 - Cromatograma do bisfenol mostrando seu tempo de retenção.	42
Figura 16 - Espectro de massas do nonilfenol.	42
Figura 17 - Espectro de massas do bisfenol A.	43
Figura 18 - Cromatograma obtido para o branco do método.....	44
Figura 19 - Cromatograma obtido no método 1.....	44
Figura 20 - Cromatograma obtido no método 2.....	45
Figura 21 - Cromatograma obtido no método 3.....	45
Figura 22 - Cromatograma obtido no método 4.....	46
Figura 23 - Gráficos do pKa do (a) nonilfenol e (b) bisfenol A.....	47
Figura 24 - Cromatograma obtido com o método já estabelecido.	49
Figura 25 - Cromatograma obtido com o experimento 1.	49
Figura 26 - Cromatograma obtido com o experimento 2.	50
Figura 27 - Cromatograma obtido com o experimento 3.	50

Figura 28 - Cromatograma obtido com o experimento 4.	51
Figura 29 - Cromatograma obtido com o experimento 5.	51
Figura 30 - Cromatograma obtido com o experimento 6.	52
Figura 31 - Cromatograma obtido com o experimento 7.	52
Figura 32 - Cromatograma obtido com o experimento 8.	53
Figura 33 - Curva de calibração da extração, do padrão e do efeito da matriz para o nonilfenol.	57
Figura 34 - Curva de calibração da extração, do padrão e do efeito da matriz para o bisfenol A.	58
Figura 35 - Gráfico de resíduos para o nonilfenol.	59
Figura 36 - Gráfico de resíduos para o bisfenol A.	60
Figura 37 - Cromatograma do limite de quantificação do nonilfenol e do bisfenol A.	60
Figura 38 - Cromatograma do limite de detecção do nonilfenol e do bisfenol A.	61
Figura 39 - pH antes e depois da exposição dos organismos ao nonilfenol.	70
Figura 40 – Oxigênio dissolvido antes e depois da exposição dos organismos ao nonilfenol.	70
Figura 41 - pH antes e depois da exposição dos organismos ao bisfenol A.	71
Figura 42 – Oxigênio dissolvido antes e depois da exposição dos organismos ao bisfenol A.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Alguns compostos classificados como desreguladores endócrinos (Adaptado de BILA e DEZOTTI, 2007).....	17
Tabela 2 - Propriedades físicas e químicas do bisfenol A.....	22
Tabela 3 - Propriedades físicas e químicas do nonilfenol.	24
Tabela 4 - Parâmetros para validação de método analítico segundo a United States Environmental Protection Agency (USEPA).....	27
Tabela 5 - Testes de extração para definição do método de extração do nonilfenol e do bisfenol A.....	32
Tabela 6 - Intervalo de monitoramento, tempos de retenção (Tr) e os íons monitorados de cada composto no modo SIM.	34
Tabela 7 - Parâmetros modificados no teste de Youden para a determinação da robustez.....	35
Tabela 8 - Coordenadas geográficas dos pontos 1 e 2.....	39
Tabela 9 - Concentrações utilizadas no teste de toxicidade aguda.....	40
Tabela 10 - Recuperação obtida em cada método testado.....	46
Tabela 11 - Planejamento utilizado para a realização do teste de Youden.....	48
Tabela 12 - Respostas obtidas no teste de robustez.	53
Tabela 13 - Efeito individual do parâmetro volume de acetato de etila no condicionamento do adsorvente.....	54
Tabela 14 - Efeito individual do parâmetro lavagem do adsorvente.....	54
Tabela 15 - Efeito individual do parâmetro porcentagem de NH_4 no acetato de etila para eluição.....	55
Tabela 16 - Efeito individual do parâmetro temperatura da fonte de íons.....	55
Tabela 17 - Efeito individual do parâmetro temperatura da interface.....	55
Tabela 18 - Efeito individual do parâmetro temperatura do injetor.....	56
Tabela 19 - Efeito individual do parâmetro fluxo de gás.....	56
Tabela 20 - Equações da reta obtidas para o nonilfenol e para o bisfenol A.	58
Tabela 21 - Recuperação do método de extração por SPE do nonilfenol.....	62
Tabela 22 - Recuperação do método de extração por SPE do bisfenol A.	62
Tabela 23 - Resultados obtidos para a determinação da precisão do método para o nonilfenol.....	63

Tabela 24 - Resultados obtidos para a determinação da precisão do método para o bisfenol A.....	63
Tabela 25 - Resultados obtidos para a determinação da repetibilidade do método para o nonilfenol.....	64
Tabela 26 - Resultados obtidos para a determinação da repetibilidade do método para o bisfenol A.	65
Tabela 27 - Coeficiente de variação entre as medidas realizadas em dias diferentes.	65
Tabela 28 - Resultados das análises da amostra de água coletada no dia 02/01/2012 nos cinco pontos estudados.....	66
Tabela 29 - Resultado das análises da amostra de água coletada no dia 03/01/2012 para os cinco pontos estudados.....	66
Tabela 30 - Resultados das análises da amostra de água coletada no dia 04/01/2012 para os cinco pontos estudados.....	67
Tabela 31 - Resultados das análises da amostra de água coletada no dia 05/01/2012 para os cinco pontos estudados.....	67
Tabela 32 - Resultado das análises da amostra de água coletada no dia 06/01/2012 para os cinco pontos estudados.....	67
Tabela 33 - Resultado do teste de toxicidade aguda com <i>D. similis</i>	69

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1. Desreguladores endócrinos (DE).....	16
2.2. O sistema endócrino	18
2.3. Bisfenol A (BPA)	20
2.4. Alquilfenóis Etoxilados – Nonilfenol (NP).....	23
2.5. Extração em fase sólida (SPE)	24
2.6. Validação do método analítico	26
2.7. Testes ecotoxicológicos	28
3. OBJETIVOS.....	29
3.1. Objetivos Gerais.....	29
3.2. Objetivos Específicos.....	29
4. EXPERIMENTAL	29
4.1. Área de estudo.....	29
4.2. Metodologia.....	31
4.2.1. Padrão	31
4.2.2. Comparação de métodos de extração	31
4.2.3. Preparação das amostras, extração e análise	32
4.2.4. Validação do método para a determinação do bisfenol A e do nonilfenol.....	35
4.3. Amostragem.....	36
4.3.1. Coleta e armazenamento das amostras	36
4.4. Testes ecotoxicológicos	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1. Condições cromatográficas para a análise do nonilfenol e do bisfenol A nos rios da cidade de Americana (SP).....	41
5.2. Otimização do método de extração por SPE	43
5.3. Validação do método para a análise do nonilfenol e do bisfenol A em estudo.....	47
5.3.1. Robustez.....	47
5.3.2. Curva analítica	56
5.3.3. Limite de quantificação (LQ).....	60
5.3.4. Limite de detecção (LD).....	61

5.3.5. Recuperação	61
5.3.6. Precisão.....	62
5.3.7. Repetibilidade	64
5.4. Análise das amostras de água coletadas na cidade de Americana, SP.	66
5.5. Teste ecotoxicológico.....	69
6. TRABALHOS FUTUROS.....	72
7. CONCLUSÃO	72
8. REFERÊNCIAS	73

1. INTRODUÇÃO

Como resultado do desenvolvimento industrial e econômico que vivemos atualmente surgem muitos problemas ambientais. O ambiente aquático é o mais afetado, embora a água cubra 72% da superfície terrestre a maior parte dela está na forma de geleiras e calotas polares, apenas 0,01% do suprimento total de água está disponível para o consumo humano e industrial (BAIRD, 2002; BROWN et al., 2005). Tanto as águas superficiais quanto as subterrâneas estão sendo poluídas devido à disposição não correta de resíduos sólidos e líquidos sobre o solo, rios e lagos e o uso indiscriminado de água pela população está ocasionando a diminuição da quantidade e principalmente da qualidade das águas para consumo humano (TUNDISI, 2003). Outro exemplo de contaminação dos cursos d'água é o uso de compostos orgânicos sintéticos principalmente aqueles que causam alterações crônicas no desenvolvimento e na reprodução de organismos aquáticos (GHISELLI; JARDIM, 2007).

A primeira vez que se discutiu sobre a possibilidade de compostos químicos interferirem no sistema endócrino de animais data de 1962, quando Rachel Carson lançou o livro "Silent Spring", desde então estes compostos vêm sendo amplamente estudados com intuito de se conhecer mais a sua ação sobre os organismos aquáticos, bem como estabelecer padrões de qualidade ambientais (BIRKETT; LESTER, 2003).

Esta pesquisa tem como ênfase o estudo das substâncias orgânicas, bisfenol A (BPA) e nonilfenol (NP) substâncias essas que causam desregulação endócrina em organismos aquáticos. Essas substâncias são compostos hormonalmente ativos que, mesmo em baixas concentrações (ng L^{-1}) podem interferir no funcionamento do sistema endócrino dos organismos aquáticos causando problemas no sistema reprodutivo e causando outros efeitos adversos. Estudos mostram que o BPA e o NP podem causar câncer (GOLOUBKOVA, 2000; AZEVEDO, 2001). Substâncias sintéticas que são produzidas industrialmente ou são resultantes de atividades antropogênicas que interferem negativamente no funcionamento normal do sistema endócrino são chamadas de xenoestrogênios, que é o caso das substâncias estudadas nesta pesquisa (RAIMUNDO, 2007).

A poluição do ambiente aquático ocorre devido à urbanização, industrialização e expansão agrícola. As fontes poluidoras podem ser classificadas

em pontuais e difusas, sendo que as fontes pontuais são as descargas de esgoto sanitário ou efluentes industriais, já a carga difusa é aquela proveniente do escoamento de áreas urbanas e rurais (FERNANDES NETO; FERREIRA, 2007; TUCCI; HESPANHOL; CORDEIRO NETO, 2001).

O tratamento feito nas estações de tratamento de água, de esgoto sanitário e industrial não consegue remover por completo os contaminantes orgânicos, portanto, novas formas de tratamento devem ser estudadas, para que essas substâncias sejam eliminadas das águas de abastecimento público ou que se tenha o cuidado de não adentrarem nos corpos hídricos.

Devido a isso essa pesquisa foi desenvolvida analisando as águas da cidade de Americana, por se tratar de uma cidade que fica na região metropolitana de Campinas que é uma região muito industrializada e como na maioria das cidades, não tem seu esgoto tratado em sua totalidade.

2. REVISÃO DA LITERATURA

As atividades antrópicas e o desenvolvimento industrial têm acarretado ao meio ambiente muitos prejuízos, uma vez que são lançados no ambiente a todo o momento diversos compostos químicos que prejudicam seres humanos, animais e, principalmente os organismos aquáticos (BAIRD, 2002).

A partir da década de 70 a sociedade começou a despertar para as ameaças a que estava sujeita e percebeu que deveria mudar seu comportamento quanto ao uso dos recursos hídricos. Na década de 80 organizações como o SEMA (Secretaria Especial do Meio Ambiente) foram criadas para diminuir o comprometimento da qualidade dos recursos hídricos e encontrar meios de melhorar o seu uso (SETTI et al., 2001).

A contaminação das águas superficiais é um grande problema uma vez que a água é um recurso natural desigualmente distribuído o que leva a escassez deste recurso em muitos lugares do planeta, portanto sua disponibilidade e uso adequado são essenciais para o futuro da humanidade (TUNDISI, 2003).

Atualmente, a comunidade científica tem se preocupado cada vez mais com compostos químicos orgânicos conhecidos como desreguladores endócrinos (DE) que, por serem hormonalmente ativos causam reações adversas nos seres humanos e nos animais, uma vez que afetam o sistema endócrino ocasionando

problemas no desenvolvimento reprodutivo, funcional e/ou comportamental, entre outros (SADIK e WITT, 1999; GOLOUBKOVA; SPRITZER, 2000).

2.1. Desreguladores endócrinos (DE)

Os DE são conhecidos como uma classe de compostos químicos de origem antrópica imitando ou inibindo a ação natural do sistema endócrino em animais e seres humanos como a síntese, secreção e reprodução (CHANG, 2009). Essas substâncias são encontradas no meio ambiente em concentração da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} , mesmo sendo encontradas em baixas concentrações podem interferir no sistema endócrino dos organismos aquáticos.

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency – USEPA) um desregulador endócrino é uma substância ou mistura química que pode interferir no funcionamento natural do sistema endócrino de espécies animais interferindo na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento (GHISELLI; JARDIM, 2007; RAIMUNDO, 2007; CHANG et al., 2009). Já o Programa Internacional de Segurança Química (International Programme on Chemical Safety – IPCS), um desregulador endócrino é definido como uma substância ou mistura exógena que altera a função do sistema endócrino e consequentemente causa efeitos adversos em um organismo saudável, em seus descendentes ou ainda em subpopulações (DAMSTRA et al., 2002).

Embora o interesse científico por esta importante questão ambiental tenha sido despertado há poucas décadas, o conhecimento sobre a capacidade de substâncias naturais ou sintéticas de mimetizarem hormônios, data do início do século XX (BILA; DEZZOTTI, 2007; MATTHISEN, 2003).

Diante dos problemas causados por diversos compostos orgânicos, a União Européia e os Estados Unidos estabeleceram uma lista de substâncias que devem ser estudadas para avaliar seu potencial na desregulação endócrina. Esses compostos estão apresentados na Tabela 1 (GROSHART; OKKERMAN; PIJNENBURG, 2001). Tanto os seres humanos como os animais estão expostos a DE, quando estes possuem baixa solubilidade e alto coeficiente de partição octanol/água (Kow) eles ficam adsorvidos em tecidos gordurosos tornando seus

efeitos irreversíveis e ameaçando o desenvolvimento humano uma vez que podem a ser bioacumulados na cadeia alimentar (ZAFRA-GÓMEZ, 2008).

Tabela 1- Alguns compostos classificados como desreguladores endócrinos (Adaptado de BILA e DEZOTTI, 2007).

Classe	Compostos
Ftalatos	dimetil ftalato (DMP), dietil ftalato (DEP), di-iso-butil ftalato (DIBP), di-n-butil ftalato (DBP), butilbenzil ftalato (BBP), dicitcloexilo ftalato (DCHP), di-(2-etil-exil) ftalato (DEHP), di-n-octil ftalato (DOP), di-isooctil ftalato (DIOP)
Alquilfenóis	nonilfenol, nonilfenol etoxilado, octilfenol, octilfenol etoxilado
Organoclorados	dibenzo-p-dioxina, TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina), TCFD (2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano)
Bisfenol	bisfenol A
Parabenos	benzilparabeno, isobutilparabeno, butilparabeno, n-propilparabeno, etilparabeno, metilparabeno
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	naftalina, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, pireno, fluoranteno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[a]pireno, benzo[k]fluoranteno,
Metais potencialmente tóxicos	cádmio, mercúrio, chumbo, zinco
Pesticidas	Inseticidas: DDT, DDE, deltameterin, carbofurano Herbicidas: atrazina linuron Fungicidas: vinclozolina, carbendazime, penconazol, procloraz, procimidona
Compostos orgânicos de estanho	tributilestanho (TBT), trifenilestanho (TPT)
Bifenilas policloradas	2,4,4'-triclorobifenil, 2,2',5,5'-tetraclorobifenil, 2,2',4,5,5'-pentaclorobifenil, 2,3',4,4',5-pentaclorobifenil
Retardantes de chama bromado	polibromobifenila (PPB), 2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter (BDE 47), 2,2',4,4',5-pentabromobifenil éter (BDE 99), 2,2',4,4',5',6-hexabromodifenil éter (BDE 154)

Fitoestrogênios	Isoflavona: daidzeína, genisteína Lignanas: metaresinol, enterodiol
Estrogênios naturais	estrone (E1), 17 β -estradiol (E2)

As substâncias classificadas como desreguladores endócrinos, podem ser agrupadas em duas classes, as substâncias sintéticas que são os herbicidas e fungicidas utilizados na agricultura; dioxinas, bifenilas policloradas, alquilfenóis, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), ftalatos, bisfenol A, metais potencialmente tóxicos, fármacos, como o dietilestilbestrol e 17 α -etinilestradiol e as substâncias naturais que são os fitoestrogênios, tais como, genisteína e metaresinol e estrogênios naturais 17 β -estradiol, estrone e estriol (MONTAGNER, 2010).

2.2. O sistema endócrino

Os organismos multicelulares necessitam de um mecanismo que integre e controle a funcionalidade das diferentes células, e este papel é exercido pelos sistema nervoso e endócrino. O funcionamento desses dois sistemas são bem diferentes uma vez que o sistema nervoso se comunica através de impulsos elétricos e o sistema endócrino trabalha transportando informações através dos hormônios. Sendo assim, o sistema endócrino é responsável por processos vitais ao organismo, como velocidade das reações químicas, permeabilidade das membranas celulares, níveis de composição do sangue e pressão sanguínea, características sexuais, manutenção da homeostase, entre outros (BIRKETT; LESTER, 2003; GUYTON, 1997; LINTELMANN et al., 2003).

Os hormônios são sintetizados e excretados para a corrente sanguínea através das glândulas e são elas que compõem o sistema endócrino. A Figura 1 apresenta a distribuição das diversas glândulas pertencentes ao sistema endócrino humano (FARABEE, 2001).

Figura 1 - Glândulas que compõem o sistema endócrino humano (Adaptado de FARABEE, 2001).

Os desreguladores endócrinos afetam as funções vitais nos seres vivos, imitando, bloqueando ou provocando o colapso dos hormônios. A desregulação endócrina provoca uma nova resposta hormonal devido à interferências na secreção, transporte, síntese, ligação e eliminação dos hormônios naturais do organismo. Dois processos podem ser desencadeados quando um desregulador endócrino interage com os receptores hormonais, são eles o efeito agonista e o efeito antagonista. Quando a substância interage com o receptor hormonal produzindo uma resposta diferente da natural ele atua como um mimetizador, ou seja, a substância imita a ação de um determinado hormônio, este é o efeito agonista. Já outras substâncias podem agir como bloqueador hormonal inibindo a resposta natural esperada, sendo este o efeito antagonista, (REYS, 2001; LEANDRO, 2006). A Figura 2 apresenta o mecanismo de ligação entre o hormônio e o receptor hormonal gerando uma resposta natural e apresentando os efeitos agonistas e antagonistas.

Figura 2 - Mecanismo de ligação entre o hormônio e o receptor hormonal gerando (a) resposta natural, (b) efeito agonista, (c) efeito antagonista (Adaptado de LINTELMANN, 2003).

A quantidade de substâncias com ação comprovada ou suspeita de causarem desregulação endócrina é grande, um estudo realizado entre os anos de 2000 e 2006 chegou à conclusão de que 320 das 575 substâncias investigadas apresentaram evidências de que podem causar efeitos desreguladores do sistema endócrino. Devido a isso optou-se por estudar os compostos bisfenol A, que pertence a classe dos compostos orgânicos oxigenados e o nonilfenol, que pertence a classe dos alquilfenóis etoxilados, pois esses compostos interferem no sistema endócrino e também são tóxicos aos organismos aquáticos e aos seres humanos.

2.3. Bisfenol A (BPA)

O BPA é um composto com estrutura química de difenilalcano hidroxilado que contém dois anéis aromáticos unidos por uma ligação de carbono. A Figura 3 apresenta a estrutura molecular do bisfenol A.

Figura 3 - Estrutura molecular do bisfenol A.

O BPA é um sólido e se apresenta na forma de flocos, cristais ou pérolas em temperatura ambiente (STAPLES et. al., 1998), atua como desregulador endócrino em concentrações abaixo de 1 ng L^{-1} e pode produzir tanto resposta agonista como antagonista (KRISCHNAN et al., 1993).

O BPA é produzido pela condensação do fenol com acetona em pH ácido, alta temperatura e na presença de catalisadores ácidos; depois o BPA é purificado através de destilação, para após ser filtrado e seco. Para minimizar o uso de reagentes, diferentes tecnologias de catálise e purificação estão sendo usadas atualmente. Alguns resíduos são gerados no processo de produção (água de lavagem e efluentes), os quais podem ser liberados indevidamente dos sistemas fechados durante o processamento na forma de pó (STAPLES et al., 1998).

A produção global de BPA foi estimada em 1.100 mil toneladas por ano em 1993 e 1,6 milhões de toneladas por ano em 1996 (GROSHART; OKKERMAN; PIJNENBURG, 2001). Já em 2006 a demanda global de BPA foi de 3,9 milhões de toneladas e em 2010 houve um crescimento para cerca de 5 milhões de toneladas (BALLESTEROS-GÓMEZ; RUBIO; PÉREZ-BENDITO, 2009).

O BPA é um composto orgânico considerado como contaminante ambiental (KAWAHATA, 2004). É usado, principalmente, como monômero na produção de plásticos policarbonatos, este tipo de plástico é usado em aplicações domésticas, em garrafas plásticas para água, mamadeiras, em produtos eletro-eletrônicos, em discos compactos, como o CD e o DVD e para encapar componentes elétricos em automóveis (CHEN et al., 2010; VOGEL, 2009). Além disso, também é usado com estabilizante ou antioxidante na manufatura de outros tipos de plástico diferentes dos policarbonatos e é o componente principal da resina epóxi, material utilizado em embalagem de alimentos a partir do qual penetra nos alimentos, embalagens para fármacos, adesivos e selantes dentários (SUN et al., 2001; LIU, 2008).

O BPA apresenta moderada partição entre água e ar devido ao fato de possuir alta solubilidade em água (300 mg L^{-1}), baixa pressão de vapor ($5,32 \times 10^{-6} \text{ Pa}$

à 25 °C) e baixa constante de Henry ($10^{-5} - 10^{-6} \text{ Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$). Com base nos valores de log Kow (3,40) pode-se esperar que haja adsorção pelos materiais particulados, além de serem lipofílicos e terem potencial de bioconcentração (LINTELMANN et al, 2003). A Tabela 2 apresenta as principais propriedades físicas e químicas deste composto e são essas propriedades que controlam a distribuição e o destino final dos DE no meio ambiente (STAPLES et. al., 1998; SOUZA, 2011).

Tabela 2 - Propriedades físicas e químicas do bisfenol A.

Propriedades	Valor
CAS N°	80-05-7
Massa Molecular	228,29 g mol ⁻¹
Fórmula	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Densidade	1,195 g mL ⁻¹
Ponto de Ebulição	398 °C
Ponto de Fusão	155 °C
pKa	9,59 – 11,30
Solubilidade em água	300 mg L ⁻¹
Pressão de vapor	5,32x10 ⁻⁶ Pa
Log Kow	3,40

Foi encontrado BPA em baixas concentrações em diferentes matrizes, tais como fluídos biológicos, águas superficiais, esgoto sanitário e amostras de ar atmosférico (ZAFRA-GÓMEZ, 2008). O BPA ainda pode ser encontrado na saliva, por migrar dos selantes dentários, ou em alimentos industrializados, pela migração de embalagens plásticas, em concentrações de até 139 µg g⁻¹. A USEPA estabeleceu como dose de referência para a exposição oral crônica de BPA 50µg kg⁻¹ por dia. O Brasil, assim como os outros países integrantes do Mercosul, fixou o limite de migração específico (LME) em 3 mg de BPA por quilo de alimento, já a União Européia adotou o LME de 0,6 mg g⁻¹ (BALLESTEROS-GÓMEZ et al., 2009).

2.4. Alquilfenóis Etoxilados – Nonilfenol (NP)

Os alquilfenóis etoxilados (APE) pertencem à classe dos surfactantes não iônicos. São utilizados em resinas fenólicas, aditivos plásticos, detergentes, emulsificantes, dispersantes, agentes solubilizadores, formulações de pesticidas, óleos lubrificantes, e até mesmo como espermicida em produtos contraceptivos, sendo que 85% são utilizados na indústria e 15 % em formulações de uso doméstico (LINTELMANN, 2003; OLIVEIRA et al., 2007).

Os APE possuem uma característica particular relacionada com a geração de sub-produtos durante processos de tratamento de efluentes baseados na biodegradação. Os processos biológicos empregados para o tratamento de soluções contendo alquilfenóis etoxilatos em estações de tratamento de esgoto geram produtos mais tóxicos e persistentes no ambiente. Em temperatura ambiente é um líquido denso de coloração amarelo claro (CETESB).

Os APE são basicamente grupos alquila de diferentes tipos e tamanhos, ligados a um anel aromático que contém uma ligação OH, a estrogenicidade dos alquilfenóis aumenta com o decréscimo no tamanho da cadeia alquílica, dessa forma o composto que apresenta maior estrogenicidade é o nonilfenol (NP) que tem a estrutura molecular constituída por um fenol e uma cadeia contendo nove carbonos como apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Estrutura molecular do nonilfenol.

A síntese do NP aconteceu em 1940, ele é formado a partir da alquilação de fenóis com uma mistura de isômeros de nonano, em presença de um catalisador ácido. O produto final dessa síntese é uma mistura com mais de 22 isômeros. Em condições ambientais se apresenta como um líquido viscoso, e imiscível em água (USEPA, 2005; OLIVEIRA et al., 2007).

O NP tem um caráter hidrofóbico que é confirmado pelo valor de partição octanol/água ($\log K_{ow} = 4,48$) sendo que o composto tem mais afinidade pela fase

orgânica. A pressão de vapor indica que se trata de um composto semi-volátil (SOARES et al., 2008). As principais propriedades físicas e químicas do NP são apresentadas na Tabela 3. Temperatura, pH, salinidade, existência de substâncias húmicas ou material particulado influenciam a solubilidade desse composto, facilitando ou dificultando sua degradação (RAIMUNDO, 2007).

Tabela 3 - Propriedades físicas e químicas do nonilfenol.

Propriedades	Valor
CAS N°	84852-15-3
Massa Molecular	220,35 g mol ⁻¹
Fórmula	C ₁₅ H ₂₄ O
Densidade	0,6 g mL ⁻¹
Ponto de Ebulição	304 °C
Ponto de Fusão	-10 °C
pKa	10,7
Solubilidade em água	4,90 mg L ⁻¹
Pressão de vapor	1,33 Pa (20°C)
Log Kow	4,36 – 4,60

Uma vez que os compostos bisfenol A e nonilfenol estão presentes em concentrações muito baixas no meio ambiente é necessário fazer uma extração para isolar e concentrar os analitos de interesse para posterior análise.

2.5. Extração em fase sólida (SPE)

Existem diversos métodos de extração e concentração de poluentes orgânicos em amostras aquosas, como por exemplo, a extração líquido-líquido (ELL), a extração em fase sólida (SPE) e a microextração em fase sólida (SPME), sendo que o emprego de cartuchos para a SPE são os mais comuns de serem utilizados (RICHARDSON, 2010).

A SPE é um método de separação líquido-sólido, do ponto de vista prático comporta-se como a cromatografia líquida empregando-se uma pequena coluna

aberta, usualmente denominada cartucho de extração, a qual contém a fase sólida (LANÇAS, 2004).

As etapas envolvidas na SPE são apresentadas na Figura 5.

Figura 5 - Etapas envolvidas na extração em fase sólida - SPE (Adaptado de SOUZA, 2011).

1- Condicionamento: Tem como finalidade ativar o adsorvente (material de empacotamento do cartucho de SPE) com um solvente orgânico adequado. Nesta etapa é importante não deixar o adsorvente secar, uma vez que caminhos preferenciais podem se formar e prejudicar a recuperação dos analitos de interesse.

2- Adição da amostra: Um volume determinado anteriormente de amostra é percolado pelo cartucho de extração. O fluxo para a passagem da amostra deve ser baixo para que os analitos de interesse fiquem retidos no adsorvente.

3- Remoção dos interferentes: Também chamado de lavagem ou *clean-up* tem a função de remover possíveis interferentes que tenham sido retidos juntamente com os analitos. Para isso é utilizado um solvente que tem a finalidade com os interferentes, mas que não consigam remover os analitos.

4- Eluição dos analitos: Visa extrair os analitos de interesse que estão retidos no material de empacotamento do cartucho. Nesta etapa, a escolha do solvente de eluição é de extrema importância para uma boa recuperação dos compostos.

A extração e concentração dos analitos foram feitas com o objetivo de isolar e concentrar os compostos de interesse bem como separá-los das espécies que poderiam interferir na análise.

Para obter dados confiáveis e corretos é necessário que sejam feitos alguns testes que comprovem que o resultado obtido é o mais correto possível, por isso é feito o que se chama de validação de método analítico, esses testes são feitos através de guias que orientam quais experimentos devem ser feitos, dependendo do composto que vai ser analisado.

2.6. Validação do método analítico

Os princípios básicos para o desenvolvimento de um método analítico são muito simples e podem ser resumidos em três etapas. A primeira etapa é aquela que identifica a importância e a utilidade do método proposto, a segunda é o desenvolvimento de um procedimento que gere dados consistentes com o seu objetivo e o terceiro é estabelecer procedimentos de controle de qualidade adequados garantindo que as duas primeiras etapas sejam cumpridas. O objetivo da validação pela USEPA é garantir que os dados sejam cientificamente válidos, defensáveis e de precisão conhecida (USEPA, 1992).

A validação deve ser feita para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

Para a validação do método desenvolvido será utilizado o Método 8270D da United States Environmental Protection Agency (USEPA) que descreve o procedimento de validação para compostos semivoláteis analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS).

Os parâmetros para a validação definidos pela norma e que estão apresentados na Tabela 4 são robustez, recuperação, precisão, repetibilidade, limite de detecção e quantificação e curva analítica.

Tabela 4 - Parâmetros para validação de método analítico segundo a United States Environmental Protection Agency (USEPA).

Parâmetro	Definição
Robustez	Capacidade de o método permanecer inalterado frente a pequenas alterações nos parâmetros. (Teste de Youden)
Recuperação	Eficiência da extração do método analítico que foi desenvolvido. Deve estar entre 80% e 120%.
Precisão	Grau de repetibilidade dos resultados de medições repetidas mantendo-se as mesmas condições. O coeficiente de variação (C.V.) deve ser menor que 20%.
Repetibilidade	Representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição em um curto intervalo de tempo. Deve apresentar C.V. menor que 15%.
Limite de detecção	Concentração mínima de uma substância que pode ser medida com confiança de 99% que a concentração do analito é maior que zero. É a concentração 5 vezes menor que o limite de quantificação que pode ser detectada.
Limite de quantificação	Menor concentração de um analito que se pode quantificar. É a concentração mais baixa na curva analítica.
Curva analítica	Gráfico de concentrações de padrões conhecidos contra a resposta do instrumento para os analitos de interesse. Para uma curva ser aceita será avaliado o coeficiente de determinação (R^2) e os resíduos.

Além do desenvolvimento e validação do método analítico serão feitos testes ecotoxicológicos a fim de determinar em que faixa de concentração o nonilfenol e o bisfenol A causam toxicidade.

2.7. Testes ecotoxicológicos

A ecotoxicologia é um ramo da ecologia que estuda os efeitos tóxicos nos organismos, sendo que esta ampla definição inclui o estudo dos efeitos tóxicos em nível celular individual, populacional e de comunidade (ADAMS, 1995), é a ciência responsável pela geração do conhecimento que subsidiará a formulação segura de dispositivos legais, normas, programas e diretrizes gerenciais para enfrentar questões de risco ecotoxicológico potencial e real, geradas pela introdução de agentes químicos no ambiente. Para tanto, existem métodos padronizados por uma série de organizações e agências de normatização, incluindo a APHA (American Public Health Association), ASTM (American Society for Testing and Materials), USEPA (United States Environmental Protection Agency), AFNOR (Association Française de Normalisation), DIN (Deutsches Institut für Normung), ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), ISO (International Organization for Standardization) e OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), em que vários procedimentos e espécies são utilizados em testes de toxicidade (BURATINI-MENDES, 2002).

Diante da contaminação dos recursos hídricos por diversos compostos orgânicos, a ecotoxicologia aquática é utilizada para avaliar a toxicidade desses contaminantes ambientais a organismos aquáticos.

Os testes de toxicidade são desenvolvidos por várias instituições de pesquisa e órgãos de monitoramento ambiental. Como organismos-testes são utilizados algas, bactérias, invertebrados aquáticos zooplânctônicos e bentônicos e os peixes, entre outros. Nesses estudos são considerados desde os parâmetros dos testes de toxicidade padronizados, até parâmetros bioquímicos, fisiológicos, histológicos, comportamentais, entre outros (RAND e PETROCELLI, 1995; NEWMAN e CLEMENTS, 2008).

Os testes de toxicidade constituem-se basicamente na exposição de organismos-testes a substâncias potencialmente tóxicas, analisando as respostas destes organismos ao contaminante testado, normalmente são realizados testes

agudos de curta duração e crônicos de duração mais longa. (CAIRNS; NIEDERLEHNER e BIDWELL, 1998).

Para a avaliação de risco de uma determinada substância química no ambiente aquático é necessário a realização de múltiplos ensaios ecotoxicológicos que englobem vários níveis tróficos (NOVELLI, 2010)

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Desenvolver e validar o método analítico para a determinação do bisfenol A e do nonilfenol em água, utilizando extração em fase sólida (SPE) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS). Após o método ser desenvolvido e validado foi empregado em amostras de água coletadas próximo a indústrias na cidade de Americana, SP e que provavelmente utilizam o bisfenol A e o nonilfenol como matéria-prima nos processos industriais.

3.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar o método a ser empregado para a determinação de bisfenol A e nonilfenol.
- Determinar o bisfenol A e o nonilfenol em amostras de água coletadas na cidade de Americana, SP.
- Determinar a faixa de sensibilidade do organismo-teste *Daphnia similis* após exposição aos compostos bisfenol A e nonilfenol

4. EXPERIMENTAL

4.1. Área de estudo

Foi escolhido como área de estudo rios que cortam a cidade de Americana, que faz parte de região metropolitana de Campinas, portanto se trata de uma área muito industrializada e na qual o esgoto não é tratado na sua totalidade, causando por isso, vários impactos ambientais. Os rios que foram escolhidos para a

amostragem são o Rio Piracicaba que é classificado como rio de classe 2 de acordo com Resolução CONAMA 357 de 17 de março de 2005 e, portanto suas águas podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato primário; à irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins e campos de esporte e lazer; à aquicultura e à atividade de pesca, e o Ribeirão Quilombo que é classificado como classe 3 de acordo com Resolução CONAMA 357 de 17 de março de 2005 e, portanto suas águas podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; à irrigação de cultura arbóreas, cerealíferas e forrageiras; à pesca amadora; à recreação de contato secundário e a dessedentação de animais (IGAM, 2010).

A partir de 1990, o Estado de São Paulo foi dividido em 22 Unidades Hidrográficas de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI) para que a CETESB desenvolva o monitoramento das águas de abastecimento. O presente estudo foi desenvolvido na UGRHI 5 (Piracicaba/ Capivari/ Jundiaí), que é composta por quase 5 milhões de habitantes, sendo a segunda mais populosa, possui uma área de drenagem de 14.178 Km² e na qual o Rio Piracicaba e o Ribeirão Quilombo está incluída. Nessa região 87% do esgoto é coletado, mas apenas 49% é tratado (BRASIL, 2010).

O Rio Piracicaba nasce da junção dos Rios Atibaia e Jaguari, no município de Americana. Após atravessar a cidade de Piracicaba, recebe as águas de seu principal afluente, o Rio Corumbataí. O Rio Piracicaba percorre 250 Km de sua formação até a sua foz no Rio Tietê entre os municípios de Santa Maria da Serra e Barra Bonita. A região do Rio Piracicaba é muito industrializada, sendo destaque as culturas de cana-de-açúcar e citrus (TORRES, 2009). Na bacia do Rio Piracicaba, o lançamento de esgoto, sobretudo o doméstico, é o principal problema de contaminação das águas da região, decorrente do intenso aumento da densidade demográfica ocasionado pela expansão da atividade industrial (CBH-PCJ,2008).

O Ribeirão Quilombo nasce no município de Campinas passando por Hortolândia, Paulínia, Sumaré, Nova Odessa e termina no Rio Piracicaba em Americana. Atualmente está com águas altamente poluídas devido a despejo de esgotos domésticos e industriais (O Liberal, 2010).

4.2. Metodologia

Devido às baixas concentrações dos compostos de interesse encontrados em ambientes aquáticos naturais, foram adotados procedimentos para reduzir interferentes originados durante as etapas de amostragem, preservação e pré-tratamento, portanto, todas as vidrarias utilizadas foram lavadas com Extran[®] e com água corrente, em seguida foram enxaguadas com uma grande quantidade de água livre de orgânicos (Millipore[®]) e finalmente submetidos a lavagem com metanol e acetona. As vidrarias não-volumétricas foram secas em estufa, as demais foram colocadas em bandejas e deixadas para secar naturalmente.

4.2.1. Padrão

Foram preparadas soluções estoque de cada padrão em acetonitrila (PA Tedia[®] C.A.S No.: 75-05-8) grau HPLC. A concentração da solução estoque de BPA (99% Sigma-Aldrich[®] C.A.S No.: 80-05-7) foi de 370 mg L⁻¹ e a concentração do NP (Dr. Enrenstorfer[®] C.A.S No.:22-50/53-34) foi de 340 mg L⁻¹. As soluções estoque foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e estocadas em refrigerador a 4°C. À partir dessas soluções foram preparadas as soluções de trabalho, sendo que estas foram diluídas também em acetonitrila para posterior análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS).

4.2.2. Comparação de métodos de extração

Como não há uma metodologia padronizada para a análise simultânea do NP e do BPA, foi feita uma revisão bibliográfica dos métodos mais utilizados para a extração de contaminantes orgânicos, sendo que o emprego de cartuchos de SPE com adsorvente C18 o método mais utilizado (ZAFRA et al., 2003; JIN et al., 2004)

Foram testados quatro métodos para os testes de extração, como pode ser visto na Tabela 5. Os testes foram feitos modificando o solvente de condicionamento do adsorvente C18 e o solvente de eluição dos analitos de interesse. A extração foi feita percolando-se 200 mL da água de nascente fortificada com os padrões.

Tabela 5 - Testes de extração para definição do método de extração do nonilfenol e do bisfenol A.

Teste	Condicionamento	Eluição
1	6 mL diclorometano + 6 mL água ultra pura	4 x 2 mL diclorometano
2	6 mL diclorometano + 6 mL água ultra pura	4 x 2 mL diclorometano com 1% amônia
3	6 mL acetato de etila + 6 mL água ultrapura	4 x 2 mL acetato de etila
4	6 mL acetato de etila + 6 mL água ultrapura	4 x 2 mL acetato de etila com 1% amônia

4.2.3. Preparação das amostras, extração e análise

Para a preparação das amostras foi coletado água de nascente no Rio Santa Maria do Leme na cidade de São Carlos, o ponto de coleta dessa água pode ser visto na Figura 6. Após a água de nascente foi filtrada a vácuo com filtro de acetato de celulose (0,45 μ m), para que as partículas sólidas em suspensão fossem eliminadas.

Figura 6 - Ponto de coleta da água da nascente do Rio Santa Maria do Leme (Foto Daniele, 2011).

O adsorvente para a extração em fase sólida (SPE – C18 SampliQ de 500mg e 6mL. Agilent Technologies®, Part No.: 5982-1165) foi condicionado com 6 mL de acetato de etila (P.A., Panreac®, C.A.S. No.: 141-78-6) grau HPLC, 6 mL de água ultra pura (Millipore®). Em seguida, percolou-se através do cartucho 200 mL da amostra filtrada. Na etapa do clean-up foi utilizado 1 mL de água ultra pura (Millipore®) e deixou-se secar por 30 minutos no vácuo, fez-se a eluição dos analitos de interesse utilizando 4 x 2 mL de acetato de etila com 1 % de amônia. Esse extrato foi seco em fluxo de nitrogênio gasoso (N₂) 99,9% e reconstituído em 1 mL de acetonitrila (P.A., Panreac®, C.A.S. No.: 75-05-8) grau HPLC. A Figura 7 descreve as etapas envolvidas na extração do bisfenol A e do nonilfenol.

Figura 7 - Etapas envolvidas na extração do nonilfenol e do bisfenol A.

Para a obtenção das melhores condições de análise dos compostos estudados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, GC/MS – QP2010 Shimadzu - Japão, inicialmente foram feitas injeções dos padrões individuais para a obtenção do tempo de retenção do bisfenol A e do nonilfenol e para avaliação da sensibilidade do detector.

Para a separação dos analitos foi utilizada a coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25µm da fase dimetilpolisiloxano). Após avaliação das melhores condições, as temperaturas do injetor, da interface GC/MS e da fonte de íons foram estabelecidas em 270 °C, 290 °C e 250 °C, respectivamente. A programação da

temperatura (Figura 8) do forno teve início em 80 °C e foi finalizada em 240 °C, com uma isoterma de 210°C. O tempo total de corrida foi de 13,13 minutos.

Figura 8 - Programação da temperatura do forno.

O volume de 1 µL do extrato foi injetado no modo splitless, com fluxo de 1,6 mL min⁻¹ na coluna, e fluxo total de 28 mL min⁻¹, utilizando hélio como gás de arraste. A energia de ionização dos fragmentos foi de 70 eV. O modo de aquisição SCAN foi utilizado nas análises qualitativas, sendo o intervalo de varredura entre 70 e 350 m/z. Já para as análises quantitativas foi utilizado o modo SIM (select ion monitoring).

O tempo de retenção (T_R) e o espectro de massas de cada composto foram conhecidos a partir da injeção dos padrões analíticos individualmente. A seleção dos íons monitorados foi feita com base na literatura e nos espectros de massas obtidos. Os íons monitorados, assim como o intervalo de monitoramento dos fragmentos e os tempos de retenção encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Intervalo de monitoramento, tempos de retenção (T_R) e os íons monitorados de cada composto no modo SIM.

Composto	Intervalo de monitoramento (min)	T_R (min)	Íons monitorados (m/z)
Nonilfenol	5,00 – 10,00	7,96	107*, 149, 220
Bisfenol A	10,10 – 13,12	11,55	213*, 228, 119

* Íons de maior intensidade

4.2.4. Validação do método para a determinação do bisfenol A e do nonilfenol

Nesta etapa todas as amostras foram preparadas com água de nascente filtrada e adição do analito de interesse, completando o volume para 200mL. Foi utilizado água de nascente considerando que esta esteja isenta dos analitos em estudo. Após a amostra (água com adição de padrão) foi extraída por SPE e analisada por GC/MS.

As etapas foram procedidas da seguinte maneira:

- Robustez: Para se determinar a robustez do método desenvolvido foi utilizado o teste de Youden no qual sete parâmetros estabelecidos foram alterados e a resposta analítica continuar inalterada. Os parâmetros que foram modificados estão mostrados na Tabela 7 e a partir dessas alterações foi feito um planejamento experimental.

Tabela 7 - Parâmetros modificados no teste de Youden para a determinação da robustez.

Parâmetros		Nível alto	Nível baixo
SPE	Volume acetato de etila no condicionamento do adsorvente	6,0mL	5,9mL
	Lavagem do adsorvente	sim	Não
	Porcentagem de NH ₄ no acetato de etila para a eluição	1,0%	0,9%
	Temperatura da fonte de íons	250°C	249°C
GC/MS	Temperatura da interface	291°C	290°C
	Temperatura do injetor	270°C	269°C
	Fluxo de gás	1,7mL min ⁻¹	1,6mL min ⁻¹

- Curva analítica: A curva analítica foi determinada utilizando-se cinco soluções de concentração diferente, sendo que cada nível de concentração foi analisada em triplicata. Para que a curva fosse aceita de acordo como Método 8270D da USEPA o coeficiente de correlação linear deve ser superior a 0,99 e os resíduos devem ser menores que 20%.

- Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ): Para determinar o LD e o LQ foi utilizada a curva analítica, na qual o limite de quantificação foi considerado como sendo o primeiro ponto da curva analítica e o limite de detecção foi considerado o valor cinco vezes menor que o LD.

- Recuperação: Nesta etapa preparou-se soluções com diferentes concentrações abrangendo a concentração baixa, média e alta, e para cada concentração fez-se três amostras, que posteriormente foram extraídas e analisadas. Foram feitas também estas mesmas soluções, e para cada uma fez-se três amostras, que não foram extraídas por SPE, ou seja, foram injetadas diretamente no GC/MS. E também foram feitas, nas mesmas concentrações, e para cada uma três amostras que foram fortificadas após a extração por SPE, para determinar a interferência da matriz nas análises por GC/MS. Foram comparados os resultados obtidos, que devem ser precisos e exatos nos três procedimentos.

- Precisão e repetibilidade: Foram feitas duas soluções com diferentes concentrações abrangendo a concentração baixa e alta de acordo com a linearidade do método. Para cada concentração foram preparadas sete amostras, as quais foram extraídas e analisadas. Esta etapa foi repetida duas vezes em dias diferentes para determinar a precisão e a repetibilidade, sendo que o coeficiente de variação, segundo a USEPA deve ser de 20% para a precisão e de 15% para a repetibilidade em todas as concentrações.

4.3. Amostragem

4.3.1. Coleta e armazenamento das amostras

Os pontos de coleta foram escolhidos de acordo com a proximidade de empresas que, provavelmente, utilizam as substâncias estudadas. O ponto 1 está situado no Rio Piracicaba próximo a uma das maiores produtoras de papel e celulose da América Latina, o ponto 2 está situado no Ribeirão Quilombo próximo a uma empresa especializada na fabricação de produtos de limpeza, como detergente, amaciante de roupas, desengraxantes, pastas cremosas, entre outros. Os pontos 3, 4 e 5 estão localizados na estação de tratamento microbiológico de uma empresa

produtora de estabilizantes e lubrificantes para PVC, estearatos metálicos e outros aditivos para a indústria de plásticos, situada na cidade de Americana.

Os pontos de coleta 1 e 2 são demonstrados por fotos, eles podem ser vistos nas Figuras 9 e 11, já os pontos 3, 4 e 5 não podem ser demonstrados por fotos, uma vez que as amostras foram coletadas nas dependências de uma empresa. As Figuras 10, 12 mostram as fotos de satélite dos pontos 1 e 2, respectivamente, e a Figura 13 mostra a foto de satélite dos pontos, 3, 4 e 5. A Tabela 8 apresenta as coordenadas geográficas dos ponto de coleta 1 e 2.

Figura 9 - Ponto 1 - Rio Piracicaba (Foto Daniele 2012).

Figura 10 - Foto de satélite do ponto 1 - Rio Piracicaba (Fonte: Google Earth).

Figura 11 - Ponto 2 - Ribeirão Quilombo (Foto Daniele, 2012).

Figura 12 - Foto de satélite do Ponto 2 - Ribeirão Quilombo (Fonte: Google Earth).

Figura 13 - Foto de satélite dos pontos, 3, 4 e 5 (Fonte: Google Earth).

Tabela 8 - Coordenadas geográficas dos pontos 1 e 2.

Ponto de coleta	Latitude	Longitude
Ponto 1	-22°71'38.78"	-47°33'28.00"
Ponto 2	-22°75'66.73"	-47°31'57.33"

Foram feitas 5 coletas nos dias 2, 3, 4, 5 e 6 de janeiro de 2012 em volumes de 1L e armazenadas em frasco de vidro âmbar com tampa de teflon. Foram adicionados em cada frasco no momento da coleta algumas gotas de metanol (PA J.T.Baker® C.A.S No.: 9093-03) grau HPLC a fim de cessar a atividade microbiana. As amostras foram conservadas a 4°C até a análise que se procedeu na semana seguinte à coleta. As amostras foram filtradas em membrana 0,45µm para retirar as partículas em suspensão. Após procedeu-se a extração por SPE e análise do BPA e do NP por GC/MS.

4.4. Testes ecotoxicológicos

Os testes de toxicidade aguda, utilizando o organismo-teste *Daphnia similis*, foram feitos no Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA), localizado no município de Itirapina-SP. Esse teste segue a metodologia descrita na Norma ABNT, NBR 12713/2004.

O método consistiu em exposição dos organismos-testes (neonatos entre 6 e 24 horas) a 5 concentrações diferentes do BPA e do NP por um período de 48 horas, as concentrações testadas podem ser vistas na Tabela 9. Após foram inseridos 5 organismos/réplica em tubos Falcon de 15 mL contendo 10 mL da solução contendo o composto estudado. Os tubos foram tampados e foram feitos 4 réplicas, mantidos em condições controladas de temperatura (24 ± 2 °C) e fotoperíodo (16 : 8h claro : escuro). Após o período de exposição, os organismos mortos ou imóveis foram contados. Medidas como pH, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e dureza foram medidos antes do início do experimento e após as 48h foram medidos pH e oxigênio dissolvido.

Tabela 9 - Concentrações utilizadas no teste de toxicidade aguda.

	BPA	NP
Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,05	0,05
	0,50	0,50
	5,00	5,00
	50,00	50,00
	500,00	500,00

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Condições cromatográficas para a análise do nonilfenol e do bisfenol A nos rios da cidade de Americana (SP).

O cromatograma obtido com a análise dos padrões individuais do nonilfenol e do bisfenol A, mostrando o tempo de retenção desses analitos está apresentado nas Figuras 14 e 15.

Figura 14 - Cromatograma do nonilfenol mostrando seu tempo de retenção.

Figura 15 - Cromatograma do bisfenol mostrando seu tempo de retenção.

Após a determinação dos tempos de retenção foi analisado quais íons deveriam ser monitorados para cada composto, para isso obteve-se o espectro de massas para o nonilfenol e para o bisfenol A, como pode ser observado nas Figuras 16 e 17.

Observa-se pelos cromatogramas que os picos dos dois compostos estudados estão bem resolvidos.

Figura 16 - Espectro de massas do nonilfenol.

Como pode ser observado para o nonilfenol foram monitorados os íons 107, 149 e 220, sendo que o íon 107 é o de maior intensidade.

Figura 17 - Espectro de massas do bisfenol A.

Como pode ser observado para o bisfenol A foram monitorados os íons 119, 213 e 228, sendo que o íon 213 é o de maior intensidade.

5.2. Otimização do método de extração por SPE

A extração e a concentração do BPA e do NP das amostras de água foram feitas empregando-se a técnica de extração em fase sólida (SPE) de acordo com o método final descrito no item 4.3.2.

Para a definição do método, dois parâmetros da extração dos compostos foram avaliados, sendo eles, o solvente para condicionamento do adsorvente, e o solvente de eluição. As Figuras 18 a 22 apresentam os cromatogramas obtidos nos quatro experimentos testados e no branco para avaliar a recuperação após a extração por SPE.

Figura 18 - Cromatograma obtido para o branco do método.

Figura 19 - Cromatograma obtido no método 1.

Figura 20 - Cromatograma obtido no método 2.

Figura 21 - Cromatograma obtido no método 3.

Figura 22 - Cromatograma obtido no método 4.

A Tabela 10 apresenta a recuperação obtida em cada método. Como pode ser visto o melhor método a ser utilizado para a extração dos compostos analisados é o método quatro, no qual o adsorvente C18 é condicionado com o solvente acetato de etila e água e o solvente utilizado para a eluição dos analitos é o acetato de etila com 1% de amônia, uma vez que a recuperação obtida está entre a faixa aceita pela USEPA que é de 80 a 120%.

Tabela 10 - Recuperação obtida em cada método testado.

Método	Recuperação (%)	
	NP	BPA
1	202,4	55,7
2	104,3	44,2
3	151,1	90,2
4	113,7	98,1

Para explicar a utilização da amônia no solvente de eluição é preciso entender os gráficos apresentados na Figura 23. Como o log Kow dos compostos de interesse são altos (5,80 para o NP e 4,03 para o BPA) e o log Kow dos solventes que podem ser utilizados são baixos (1,31 para o diclorometano e 0,29 para o acetato de etila) a

extração pode ser comprometida. Pode-se perceber pelos gráficos que o NP e o BPA são desprotonados quando estão em meio básico, isso faz com que eles se tornem mais apolares diminuindo o log Kow dos compostos de interesse.

Figura 23 - Gráficos do pKa do (a) nonilfenol e (b) bisfenol A.

5.3. Validação do método para a análise do nonilfenol e do bisfenol A em estudo.

Os parâmetros utilizados para a validação do método foram robustez, curva analítica, limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD), recuperação, precisão e repetibilidade.

5.3.1. Robustez

Nessa etapa alguns parâmetros do método SPE-GC/MS desenvolvido para a análise do NP e do BPA foram alterados para verificar se o método é robusto frente a pequenas alterações. Para isso foi utilizado o teste de Youden que tem como objetivo introduzir alterações de uma só vez, de tal maneira que o efeito das variações individuais podem ser determinados. As repostas observadas nesse teste foram o tempo de retenção e a área do pico cromatográfico.

Para o teste da robustez, foi estabelecido que as letras *A, B, C, D, E, F* e *G* são os níveis altos de sete parâmetros diferentes e que podem influenciar no resultado, já as letras *a, b, c, d, e, f* e *g* são os níveis baixos, ou seja, de menor valor nominal. Pode-se perceber que trata-se de um planejamento fatorial 2^7 , tendo, portanto, 128 combinações diferentes, entretanto foi possível escolher um subconjunto de 8 dessas combinações, por isso foram feitos apenas 8 experimentos. O conjunto dessas combinações especificando os valores dos sete fatores a serem utilizados nos 8 experimentos está apresentado na Tabela 11. Os resultados das análises são designados pelas letras *s, t, u, v, w, x, y* e *z*.

Tabela 11 - Planejamento utilizado para a realização do teste de Youden.

	1	2	3	12	13	23	123	Resultados
1	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<i>s</i>
2	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>c</i>	<i>D</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>t</i>
3	<i>A</i>	<i>b</i>	<i>C</i>	<i>d</i>	<i>E</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	<i>u</i>
4	<i>A</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<i>v</i>
5	<i>a</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>F</i>	<i>g</i>	<i>w</i>
6	<i>a</i>	<i>B</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>E</i>	<i>f</i>	<i>G</i>	<i>x</i>
7	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>G</i>	<i>y</i>
8	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>g</i>	<i>z</i>

As Figuras 24 a 32 mostram os cromatogramas obtidos com o método já estabelecido e os experimentos de 1 a 8, respectivamente.

Figura 24 - Cromatograma obtido com o método já estabelecido.

Figura 25 - Cromatograma obtido com o experimento 1.

Figura 26 - Cromatograma obtido com o experimento 2.

Figura 27 - Cromatograma obtido com o experimento 3.

Figura 28 - Cromatograma obtido com o experimento 4.

Figura 29 - Cromatograma obtido com o experimento 5.

Figura 30 - Cromatograma obtido com o experimento 6.

Figura 31 - Cromatograma obtido com o experimento 7.

Figura 32 - Cromatograma obtido com o experimento 8.

As respostas obtidas no teste de Youden para determinar a robustez do método desenvolvido são mostradas na Tabela 12. Foram avaliados o tempo de retenção e a área do pico cromatográfico e pôde-se verificar que analisando apenas esses resultados o método é robusto, uma vez que, as respostas estão com valores muito próximos.

Tabela 12 - Respostas obtidas no teste de robustez.

Ensaio	Tempo de retenção		Área do pico	
	NP	BPA	NP	BPA
Método	7,973	11,580	220,300	37,916
1	7,882	11,456	231,816	35,020
2	7,974	11,580	225,256	33,572
3	7,975	11,579	242,652	35,540
4	7,883	11,459	214,232	38,962
5	7,976	11,583	223,696	33,430
6	7,885	11,458	219,344	39,614
7	7,883	11,459	230,340	31,490
8	7,944	11,541	237,936	33,886

Para determinar os efeitos de cada parâmetro individualmente, foi comparado a média das respostas obtidas quando o maior nível foi utilizado com a média das respostas obtidas quando o menor nível foi utilizado.

Para o parâmetro, volume de acetato de etila no condicionamento do adsorvente, denominado por *A* ou *a* o efeito individual não foi muito alterado quando utilizado o maior nível (6,0 mL) ou o menor nível (5,9 mL) como pode ser visto na Tabela 13.

Tabela 13 - Efeito individual do parâmetro volume de acetato de etila no condicionamento do adsorvente.

Nível	Tempo de retenção		Área do pico	
	NP	BPA	NP	BPA
<i>A</i>	7,928	11,518	228,489	35,773
<i>a</i>	7,922	11,510	227,829	34,605
Diferença	0,006	0,008	0,660	1,168

Para o parâmetro, lavagem do adsorvente, denominado por *B* ou *b* o efeito individual não foi muito alterado quando utilizado o maior nível (com lavagem) ou o menor nível (sem lavagem) como pode ser visto na Tabela 14.

Tabela 14 - Efeito individual do parâmetro lavagem do adsorvente.

Nível	Tempo de retenção		Área do pico	
	NP	BPA	NP	BPA
<i>B</i>	7,929	11,519	229,028	35,409
<i>b</i>	7,921	11,509	231,290	34,969
Diferença	0,008	0,010	2,262	0,440

Para o parâmetro, porcentagem de NH_4 no acetato de etila para eluição, denominado por *C* ou *c* o efeito individual não foi muito alterado quando utilizado o maior nível (1%) ou o menor nível (0,9%) como pode ser visto na Tabela 15.

Tabela 15 - Efeito individual do parâmetro porcentagem de NH_4 no acetato de etila para eluição.

Nível	Tempo de retenção		Área do pico	
	NP	BPA	NP	BPA
<i>C</i>	7,929	11,519	232,126	33,870
<i>c</i>	7,921	11,509	234,192	36,508
Diferença	0,008	0,010	2,066	2,638

Para o parâmetro, temperatura da fonte de íons, denominado por *D* ou *d* o efeito individual não foi muito alterado quando utilizado o maior nível (250°C) ou o menor nível (249°C) como pode ser visto na Tabela 16.

Tabela 16 - Efeito individual do parâmetro temperatura da fonte de íons.

Nível	Tempo de retenção		Área do pico	
	NP	BPA	NP	BPA
<i>D</i>	7,921	11,509	231,337	30,742
<i>d</i>	7,930	11,520	224,981	36,886
Diferença	0,009	0,011	6,356	6,144

Para o parâmetro, temperatura da interface, denominado por *E* ou *e* o efeito individual não foi muito alterado quando utilizado o maior nível (291°C) ou o menor nível (290°C) como pode ser visto na Tabela 17.

Tabela 17 - Efeito individual do parâmetro temperatura da interface.

Nível	Tempo de retenção		Área do pico	
	NP	BPA	NP	BPA
<i>E</i>	7,921	11,508	236,937	36,015
<i>e</i>	7,929	11,520	233,381	34,363
Diferença	0,008	0,012	3,556	1,652

Para o parâmetro, temperatura do injetor, denominado por *F* ou *f* o efeito individual não foi muito alterado quando utilizado o maior nível (270°C) ou o menor nível (269°C) como pode ser visto na Tabela 18.

Tabela 18 - Efeito individual do parâmetro temperatura do injetor.

Nível	Tempo de retenção		Área do pico	
	NP	BPA	NP	BPA
<i>F</i>	7,921	11,510	226,980	35,324
<i>f</i>	7,929	11,519	229,398	35,054
Diferença	0,008	0,009	2,418	0,270

Para o parâmetro, fluxo de gás denominado, por *G* ou *g* o efeito individual não foi muito alterado quando utilizado o maior nível (1,7 mL min⁻¹) ou o menor nível (1,6 mL min⁻¹) como pode ser visto na Tabela 19.

Tabela 19 - Efeito individual do parâmetro fluxo de gás.

Nível	Tempo de retenção		Área do pico	
	NP	BPA	NP	BPA
<i>G</i>	7,883	11,458	223,933	36,271
<i>g</i>	7,967	11,570	232,385	34,107
Diferença	0,084	0,112	8,452	2,164

Os efeitos individuais calculados mostram que o método pode ser considerado robusto, já que não houve diferença significativa quando utilizou-se o maior ou o menor nível em cada parâmetro estudado, isso significa que pequenas alterações em qualquer um dos parâmetros não afeta na resposta, e além disso, como dito anteriormente os valores obtidos nos 8 experimento estão muito próximos ao resultado obtido com o método estabelecido.

5.3.2. Curva analítica

Para a construção da curva analítica foram feitas cinco soluções com concentrações diferentes que foram extraídas conforme método descrito em 4.2.3, também foi feita a análise apenas dos padrões nas mesmas concentrações e também foi feita a análise com a fortificação do extrato depois da extração, para determinar o efeito da matriz no método desenvolvido.

Os gráficos das três análises para o composto NP são apresentados na Figura 33, e evidencia que a matriz não interfere na quantificação do NP.

Figura 33 - Curva de calibração da extração, do padrão e do efeito da matriz para o nonilfenol.

Os gráficos das três análises para o composto BPA são apresentados na Figura 34, e evidencia que a matriz interfere na quantificação do BPA.

Figura 34 - Curva de calibração da extração, do padrão e do efeito da matriz para o bisfenol A.

Com as curva analíticas construídas foi possível observar que existe um efeito de matriz na extração apenas do bisfenol A. As equações da reta obtidas para o NP e para o BPA podem ser vistas na Tabela 20. Percebe-se que a diferença entre os coeficientes angulares da curva analítica em solvente (só padrão) e a curva analítica no extrato da matriz (efeito matriz) é maior que 10% apenas para o bisfenol A confirmando que existe efeito da matriz na quantificação deste composto. Já para o nonilfenol não ocorre efeito da matriz uma vez que os coeficientes angulares da curva analítica em solvente (só padrão) e da curva analítica no extrato da matriz (efeito matriz) é menor que 10%.

Tabela 20 - Equações da reta obtidas para o nonilfenol e para o bisfenol A.

	NP	BPA
Extração	$y = 843,59x + 8613,70$	$y = 141,55x + 1133,70$
Padrão	$y = 824,56x + 734,15$	$y = 102,13x + 3632,50$
Efeito Matriz	$y = 855,65x + 8430,50$	$y = 150,99x + 1746,00$

O exame dos resíduos foi utilizado para avaliar a qualidade do ajuste do modelo, além do r^2 avaliou-se também o gráfico dos resíduos. O gráfico dos resíduos mostra se existe uma tendência nos resultados para um determinado valor

e de acordos com as Figuras 35 e 36 que mostram os gráficos dos resíduos para o NP e para o BPA, respectivamente foi possível observar que a variância dos erros é constante ao longo de toda a faixa estudada.

Figura 35 - Gráfico de resíduos para o nonilfenol.

Figura 36 - Gráfico de resíduos para o bisfenol A.

5.3.3. Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação, segundo a USEPA é o menor ponto da curva analítica. A Figura 37 mostra o cromatograma da menor concentração para o NP e para o BPA que é $5 \mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 37 - Cromatograma do limite de quantificação do nonilfenol e do bisfenol A.

5.3.4. Limite de detecção (LD)

O limite de detecção, segundo a USEPA deve ser cinco vezes menor que limite de quantificação, portanto se o LQ do nonilfenol e do bisfenol A foi determinado como sendo $5 \mu\text{g L}^{-1}$, o LD é $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Apesar de o pico cromatográfico referente ao NP e ao BPA ter ficado bem pequeno devido a baixa concentração, percebe-se que eles foram detectados como pode ser visto na Figura 38 que mostra o cromatograma do NP e do BPA na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 38 - Cromatograma do limite de detecção do nonilfenol e do bisfenol A.

5.3.5. Recuperação

Para saber a eficiência da extração do NP e do BPA por SPE (extração em fase sólida) fez-se cinco soluções com concentração diferente, com três repetições para cada amostra. As soluções foram submetidas a extração por SPE e analisadas por GC/MS. Além disso foram preparadas estas mesmas soluções, com três repetições cada, fortificada após a extração por SPE, ou seja primeiramente foi feita a extração com a água de nascente e depois ela foi fortificada com os padrões nas concentrações escolhidas e após foi analisada também por GC/MS.

A partir dos resultados obtidos nas análises das amostras fortificadas antes da extração e depois da extração foi determinada a porcentagem de recuperação do método, que pode ser visto nas Tabelas 21 e 22. Os cálculos foram feitos em relação à área do pico referente ao analito contido na amostra fortificada antes da extração por SPE e depois da extração por SPE uma vez que foi verificada a interferência na matriz na quantificação do NP e do BPA.

Tabela 21 - Recuperação do método de extração por SPE do nonilfenol.

$\mu\text{g L}^{-1}$	Recuperação (%)
0,5	99,50
5,0	98,49
50,0	102,00
250,0	97,60
500,0	97,60

Tabela 22 - Recuperação do método de extração por SPE do bisfenol A.

$\mu\text{g L}^{-1}$	Recuperação (%)
5,0	89,24
150,0	91,00
250,0	91,64
350,0	92,00
450,0	93,85

5.3.6. Precisão

Para determinar a precisão do método para cada composto foram feitas duas soluções abrangendo as concentrações baixa e alta. Para cada concentração foram preparadas sete amostras, as quais foram extraídas e analisadas. Esta etapa foi repetida duas vezes em dias diferentes.

A Tabela 23 mostra a área dos picos cromatográficos obtidos para a determinação da precisão do método para o nonilfenol e como pode ser visto o

coeficiente de variação (C.V.) foi de 5,890% para o 1º nível e 5,078% para o 2º nível que está dentro do limite estabelecido pela USEPA que é de 20%.

Tabela 23 - Resultados obtidos para a determinação da precisão do método para o nonilfenol.

Replicatas	1º nível (10 µg L ⁻¹)	2º nível (150 µg L ⁻¹)
1	12.778	75.894
2	13.228	73.193
3	11.616	69.843
4	12.940	78.074
5	13.851	76.786
6	13.504	73.939
7	12.256	81.866
C.V. (%)	5,890	5,078

A Tabela 24 mostra a área dos picos cromatográficos obtidos para determinação da precisão do método para o bisfenol A e como pode ser visto o coeficiente de variação (C.V.) foi de 6,952% para o 1º nível e 5,974% para o 2º nível que está dentro do limite estabelecido pela USEPA que é de 20%.

Tabela 24 - Resultados obtidos para a determinação da precisão do método para o bisfenol A.

Replicatas	1º nível (100 µg L ⁻¹)	2º nível (300 µg L ⁻¹)
1	15.888	47.934
2	13.461	43.739
3	13.367	41.819
4	14.880	47.198
5	15.690	41.618
6	15.467	44.864
7	15.163	47.589
C.V. (%)	6,952	5,974

5.3.7. Repetibilidade

Para determinar a repetibilidade do método para cada composto foram feitas duas soluções abrangendo as concentrações baixa e alta, as mesmas usadas para o parâmetro de precisão. Para cada concentração foram preparadas sete amostras, as quais foram extraídas e analisadas. Esta etapa foi feita em outro dia, ou seja, em um dia diferente do que foi feito a precisão.

A Tabela 25 mostra a área dos picos cromatográficos obtidos para a determinação da repetibilidade do método para o nonilfenol e como pode ser visto o coeficiente de variação (C.V.) foi de 3,504% para o 1º nível e 3,725% para o 2º nível que está dentro do limite estabelecido pela USEPA que é de 20%.

Tabela 25 - Resultados obtidos para a determinação da repetibilidade do método para o nonilfenol.

Replicatas	1º nível (10 µg L ⁻¹)	2º nível (150 µg L ⁻¹)
1	11.838	79.274
2	12.863	75.721
3	12.023	74.810
4	11.898	77.044
5	12.084	80.775
6	11.484	73.122
7	11.904	73.754
C.V. (%)	3,504	3,725

A Tabela 26 mostra a área dos picos cromatográficos obtidos para determinação da repetibilidade do método para o bisfenol A, e como pode ser visto o coeficiente de variação (C.V.) foi de 6,440% para o 1º nível e 5,650% para o 2º nível que está dentro do limite estabelecido pela USEPA que é de 20%.

Tabela 26 - Resultados obtidos para a determinação da repetibilidade do método para o bisfenol A.

Replicatas	1º nível (100 µg L ⁻¹)	2º nível (300 µg L ⁻¹)
1	12.724	47.180
2	13.805	48.252
3	15.167	47.175
4	13.748	41.438
5	13.673	49.147
6	13.737	45.440
7	13.599	44.535
C.V. (%)	5,665	5,650

Para identificar se o método tem repetibilidade, a USEPA diz que o coeficiente de variação (C.V.) entre as medidas realizadas em dias diferentes deve ser menor que 15%. A Tabela 27 mostra que o método desenvolvido tem repetibilidade uma vez que os valores de C.V. são: para o 1º e o 2º nível de 4,937% e 0,652%, respectivamente, para o nonilfenol e 4,538% e 1,864%, respectivamente, para o bisfenol A.

Tabela 27 - Coeficiente de variação entre as medidas realizadas em dias diferentes.

	Níveis	C.V. (%)
NP	10 µg L ⁻¹	4,937
	150 µg L ⁻¹	0,652
BPA	100 µg L ⁻¹	4,538
	300 µg L ⁻¹	1,864

Após a validação do método fez-se as coletas das amostras de água na cidade da Americana nos pontos especificados no item 4.3.1 para a análise do nonilfenol e do bisfenol A, para isso utilizou-se o método validado.

5.4. Análise das amostras de água coletadas na cidade de Americana, SP.

Para a avaliação da presença do nonilfenol e do bisfenol A nas águas dos rios da cidade de Americana e da água lançada no meio ambiente pela estação de tratamento de esgoto de uma empresa produtora de estabilizantes e lubrificantes para PVC, estearatos metálicos e outros aditivos para a indústria de plásticos, foram feitas cinco coletas de água no mês de janeiro de 2012.

Foram analisados um total de 25 amostras coletadas em cinco pontos distintos do mês de janeiro do ano de 2012. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 28 a 32 e são referentes à média de duas análises que foram feitas no GC/MS.

Tabela 28 - Resultados das análises da amostra de água coletada no dia 02/01/2012 nos cinco pontos estudados.

1ª coleta (02/01/2012)					
Composto	Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$)				
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
Nonilfenol	<LQ	<LQ	5,828	<LQ	<LQ
Bisfenol A	<LQ	<LQ	14,600	8,073	<LQ

Tabela 29 - Resultado das análises da amostra de água coletada no dia 03/01/2012 para os cinco pontos estudados.

2ª coleta (03/01/2012)					
Composto	Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$)				
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
Nonilfenol	<LQ	<LQ	7,875	<LQ	<LQ
Bisfenol A	<LQ	5,645	158,797	7,934	<LQ

Tabela 30 - Resultados das análises da amostra de água coletada no dia 04/01/2012 para os cinco pontos estudados.

3ª coleta (04/01/2012)					
Composto	Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$)				
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
Nonilfenol	<LQ	<LQ	8,018	<LQ	<LQ
Bisfenol A	<LQ	7,062	185,149	<LQ	<LQ

Tabela 31 - Resultados das análises da amostra de água coletada no dia 05/01/2012 para os cinco pontos estudados.

4ª coleta (05/01/2012)					
Composto	Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$)				
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
Nonilfenol	<LQ	<LQ	10,524	5,204	<LQ
Bisfenol A	<LQ	11,095	295,255	8,073	<LQ

Tabela 32 - Resultado das análises da amostra de água coletada no dia 06/01/2012 para os cinco pontos estudados.

5ª coleta (06/01/2012)					
Composto	Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$)				
	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
Nonilfenol	<LQ	<LQ	5,978	<LQ	<LQ
Bisfenol A	<LQ	7,184	281,694	13,615	<LQ

Como pode ser observado nas Tabelas 28 a 32 os compostos nonilfenol e bisfenol A foram quantificados nas amostras de pelo menos dois pontos de cada coleta. No ponto de coleta 1 - Rio Piracicaba não foi possível quantificar nenhum dos compostos em nenhum dos dias de coleta, porém eles foram detectados. No ponto de coleta 2 – Ribeirão Quilombo não foi possível quantificar o nonilfenol em nenhuma das amostras coletadas e o bisfenol A só não foi quantificado nas amostras da primeira coleta. A presença do BPA nesse corpo d'água provavelmente deve ser proveniente das atividades antrópicas devido à industrialização da região e à descarga de esgoto sanitário e industriais sem prévio tratamento.

Os pontos de coleta 3, 4 e 5 ficam na estação de tratamento, sendo que o ponto de coleta 3 se trata da entrada da estação e nesse ponto tanto o NP quanto o BPA foram quantificados em todas as amostras coletadas. A concentração encontrada foi alta por se tratar dos resíduos gerados pela empresa que, entre outros produtos, produz aditivos para a indústria de plásticos. O ponto de coleta 4 é aquele que está dentro do tanque de tratamento, ou seja, no decorrer do processo de tratamento. Quando foi possível a quantificação, a concentração diminuiu substancialmente, uma vez que já havia iniciado o processo de tratamento do esgoto. O ponto de coleta 5 está na saída da estação e não foi possível a quantificação de nenhum dos compostos, porém eles foram detectados, isso mostra que o tratamento de efluentes da estação não está sendo eficiente na remoção dessas substâncias, porém a concentração diminuiu bastante.

O bisfenol A foi o composto que esteve presente na maior parte das amostras coletadas, sendo quantificado em mais de 50% delas. A concentração do nonilfenol variou de $5,028 \mu\text{g L}^{-1}$ a $10,524 \mu\text{g L}^{-1}$ nas amostras de água coletadas nos cinco pontos de amostragem. A concentração de bisfenol A variou de $5,645 \mu\text{g L}^{-1}$ a $295,255 \mu\text{g L}^{-1}$.

Embora, a legislação brasileira não contemple estes compostos, se compararmos com o valor mais restritivo para substâncias orgânicas, que é de $0,018 \mu\text{g L}^{-1}$ para as águas doces de classe 1, estabelecido pela Resolução CONAMA nº 357 (BRASIL, 2008), a concentração encontrada é superior a este limite.

A pesquisa de Moreira (2008) e Souza (2011) relatam a ocorrência do NP em amostras de águas superficiais em concentrações inferiores a encontradas neste estudo. O valor guia mais restritivo para este composto em águas superficiais é de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (CANADÁ, 2002), valor bem abaixo daqueles encontrados neste estudo.

O BPA ainda não é regulamentado em águas superficiais ou de abastecimento nas leis nacionais e internacionais. No trabalho de Leandro (2006) a maior concentração encontrada foi de $18,8 \mu\text{g L}^{-1}$ em amostras de água bruta na cidade de Araraquara, valor inferior ao encontrado neste trabalho. A maior concentração foi encontrada na entrada da estação de tratamento de esgoto de uma empresa que utiliza essa substância nos seus processos industriais.

5.5. Teste ecotoxicológico

O teste agudo utilizando a *D. similis* como organismo-teste foi realizado para determinar se nas concentrações que possivelmente seriam encontrados os compostos nonilfenol e bisfenol A no ambiente causam toxicidade.

O resultado obtido com esse teste está apresentado na Tabela 33, na qual é possível observar que não houve toxicidade aguda dos compostos estudados nas concentrações empregadas neste estudo.

Tabela 33 - Resultado do teste de toxicidade aguda com *D. similis*.

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Organismos imóveis/mortos			
	Nonilfenol		Bisfenol A	
	1	2	1	2
0,05	0	0	0	0
0,50	0	0	0	0
5,00	0	0	0	0
50,00	0	0	0	0
500,00	0	0	0	0

Foi também medido o pH e o oxigênio dissolvido antes e depois das 48h de exposição do organismo aos compostos estudados. As Figuras 39 e 40 mostram os gráficos de pH e oxigênio dissolvido para o nonilfenol e as Figuras 41 e 42 mostram os gráficos para o bisfenol A.

Figura 39 - pH antes e depois da exposição dos organismos ao nonilfenol.

Figura 40 – Oxigênio dissolvido antes e depois da exposição dos organismos ao nonilfenol.

Figura 41 - pH antes e depois da exposição dos organismos ao bisfenol A.

Figura 42 – Oxigênio dissolvido antes e depois da exposição dos organismos ao bisfenol A.

Pode-se observar nas Figuras 36 a 39 que houve uma queda significativa nos valores de pH e oxigênio dissolvido depois da exposição dos organismos aos compostos estudados, a queda no pH se deve a respiração e excreção dos organismos e em relação ao oxigênio dissolvido isso aconteceu porque os testes foram feitos em recipiente fechado (tubos Falcon de 15 mL), uma vez que os compostos nonilfenol e bisfenol A são semi-voláteis.

6. TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros, sugere-se um estudo mais abrangente da presença do nonilfenol e do bisfenol A em outros corpos d'água, também seria interessante fazer mais coletas em períodos de seca e de chuva para verificar se a sazonalidade interfere na concentração desses compostos nos corpos d'água. A diminuição do limite de quantificação também seria importante, para que o método possa ser utilizado em outras amostras de água que podem ter quantidades menores dos compostos estudados.

A avaliação da toxicidade do nonilfenol e do bisfenol A poderiam ser melhores estudadas futuramente através da realização de uma maior quantidade de testes de toxicidade aguda e a realização da toxicidade crônica.

7. CONCLUSÃO

O método desenvolvido e validado se mostrou eficiente para detectar e quantificar os compostos nonilfenol e bisfenol A nas amostras de água coletadas na cidade de Americana, SP.

O método de extração por SPE se mostrou eficaz na recuperação dos compostos estudados, uma vez que as recuperações obtidas variaram entre 97,60 e 102 % para o nonilfenol e entre 89,24 e 93,85 % para o bisfenol A.

Apesar do limite de quantificação do método não ter ficado muito baixo ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) foi suficiente para a quantificação das amostras analisadas, pois as concentrações encontradas dos dois compostos estavam na maioria dos pontos acima desse valor.

Os testes ecotoxicológicos não foram conclusivos em relação a concentração que o nonilfenol e o bisfenol A causam toxicidade aguda à *Daphnia similis*, uma vez que nas concentrações utilizadas não houve mortalidade de nenhum dos organismos testados.

8. REFERÊNCIAS

ADAMS, W. J. Aquatic toxicology testing methods. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON JUNIOR, G. A.; CAIRNAS JUNIOR, J. **Handbook of ecotoxicology**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1995. cap. 13, p. 25-46.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução-RE nº899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm>. Acesso em: 05 mar. 2011.

AZEVEDO, D. A.; LACORTE, S.; VIANA, P.; BARCELÓ, D. Occurrence of nonylphenol and bisphenol-A in surface waters from Portugal. **Journal Brazilian Chemical Society**, v.12, n. 4, p.532-537, 2001.

BAIRD, C. **Química ambiental**. 2ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622p.

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

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

BIRKETT, J. W., LESTER, J. N. **Endocrine disrupter in wastewater and sludge treatment processes**. Boca Raton: CRC, 2003. 295p.

BRASIL. Secretaria do Estado do Meio Ambiente. CETESB. **Relatório**. 2010. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/publicacoes.asp>>. Acesso em: 10 jan. 2012.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução nº. 357 de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 de março de 2005. Seção 2, p.9.

BROWN, T. L.; LEMAY JUNIOR, H. E.; BURSTEN, B. E.; BURDGE, J. R. **Química, a ciência central**. 9ª ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005. 972 p.

BURATINI-MENDES, Sandra Valéria. **Efeitos do meio de cultivo sobre a sobrevivência, reprodução e sensibilidade de *Ceriodaphnia dubia***. 2002. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

CAIRNS, J. J.; NIEDERLEHNER, B. R.; BIDWELL, J. R. Ecological toxicity testing. In: MEYERS, R. A. **Encyclopedia of environmental analysis and remediation**. New York: John Wiley, 1998. p. 1482-1497.

CANADIAN ENVIRONMENTAL QUALITY GUIDELINES (CCME). **Canadian Water Quality Guidelines for the protection of aquatic life**. Canadá, 2002. Disponível em: <ceqg-rcqe.ccme.ca/download/en/198/>. Acesso em: 30 nov. 2011.

COMITÊ DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DOS RIOS PIRACICABA, CAPIVARI E JUNDIAÍ (CBH-PCJ). **Relatório da situação dos recursos hídricos 2011**. Disponível em: <http://www.comitepcj.sp.gov.br/download/RS/PCJ_RS-2011_RelatorioFinal.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2012.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Ficha de informação de produto químico**. Disponível em: <http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=NONILFENOL>. Acesso em: 21 set. 2011.

CHANG, H. S.; CHOO, K. H.; LEE, B.; CHOI, S. J. The methods of identification, analysis and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. **Journal of Harzadous Materials**, v. 172, p. 1-12, 2009.

CHEN, T. C.; SHUE, M. S.; YEH, Y. L.; KAO, T. J. Bisphenol A occurred in Kao-Pin river and its tributaries in Taiean. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 161, p. 135-145, 2010.

DAMSTRA, T., BARLOW, S., BERGMAN, A., KAVLOCK, R., VAN DER KRAAK, G. Global assessment of the state of the science of endocrine disruptors; **International Programme On Chemical Safety**. Geneva: WHO, 2002. 515p.

FARABEE, M. J. The endocrine system. Disponível em: <<http://www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/biobk/BioBookENDOCR.html>>. Acesso em: 15 abr. 2011.

FERNANDES NETO, M. I.; FERREIRA, A. P. Perspectiva da sustentabilidade ambiental diante da contaminação química da água: desafios normativos. **INTERFACEHS – Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente**, v. 2, n. 4, p. 1-15, 2007.

FISHER, J. S.; TURNER, K. J.; BROWN, D.; SHARPE, R. M. Effect of neonatal exposure to estrogenic compounds on development of the excurrent ducts of the rat testis through puberty to adulthood. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. 5, p. 397-403, 1999.

GHISELLI, G., JARDIM, W. F., Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.

GOLOUBKOVA, T.; SPRITZER, P. M. Xenoestrogênios: o exemplo do bisphenol A. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 44, n. 4, p. 323-330, 2000.

GROSHART, C. P.; OKKERMAN, P. C. PIJNENBURG, A. M. C. M. Chemical study on bisphenol A. **Rikz Report**, v. 27, p. 1-97, 2001.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 1264p.

INSTITUTO MINEIRO DE GESTÃO DAS ÁGUAS (IGAM). **Programa para efetivação do enquadramento das águas da Bacia Hidrográfica do Rio Piracicaba**, Belo Horizonte, 2010. Disponível em: <<http://www.igam.mg.gov.br>>. Acesso em: 12 jan. 2012.

JIN, X.; JIANG, G.; LIU, J.; ZHOOU, Q. Determination of 4-tert-octylphenol, 4-nonylphenol and bisphenol A in surface water from the Haihe River in Tianjin by gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring. **Chemosphere**, v. 56, p. 1113-1119, 2004.

KAWAHATA, H.; OHTA, H.; INOUE, M.; SUSUKI, A. Endocrine disrupter nonylphenol and bisphenol A contamination on Okinawa and Ishigaki Islands, Japans – within coral reefs and adjacent river mouths. **Chemosphere**, v. 55, p. 1519-1527, 2004.

KRISHNAN, A.; STATHIS, P.; PERMUTH, S.; TOKES, L.; FELDMAN, D. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. **Endocrinology**, v. 132, p. 2279-2286, 1993.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: Rima, 2004. 93p.

LEANDRO, Fernanda Zampieri. **Bisfenol A: validação de método e ocorrência em água superficial e tratada da cidade de Araraquara**. 2006. 94f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZELI, A. Endocrine disruptors in the environment. **IUPAC Technical Report Pure Applied Chemistry**, v. 75, n. 5, p. 631-681, 2003.

LIU, X.; ZHANG, X.; ZHANG, H.; LIU, M. A chemometric strategy for optimization of solid-phase microextraction: determination of bisphenol A and 4-nonylphenol with HPLC. **Journal of Chromatography Science**, v. 46, p. 596-600, 2008.

MATTHIESSEN, P. Topic 4.1. Historical Perspective on endocrine disruption in wildlife. **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n. 11-12, p. 2197-2206, 2003.

MONTAGNER, Émerson. **Determinação de bisfenol A: uma investigação na cidade de Campo Grande – MS**. 2010. 141f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

MOREIRA, Davi Silva. **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. 123f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2008.

NEWMAN, M. C.; CLEMENTS, W. H. **Ecotoxicology**: a comprehensive treatment. Boca Raton: CRC, 2008. 852p.

NOVELLI, Andréa. **Efeito do Vertimec® 18CE e de seu princípio ativo, a abamectina, em ambiente aquático: uma análise laboratorial e *in situ***. 2010. 168f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

O LIBERAL. Disponível em:

<<http://www.meujornal.com.br/fozdobrasil/integra.asp?Codigo=4030>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

OLIVEIRA, D. P.; SILVA, F. V.; RODRIGUES, J. L.; BATISTA, B. L. Alquilfenóis e alquilfenóis etoxilados: uma visão ambiental. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 20, n. 1-2, p. 1-12, 2007.

RAIMUNDO, Cassiana Carolina Montagner. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. 2007. 108f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

REYS, L. L. Tóxicos ambientais desreguladores do sistema endócrino. **RFML**, v. 8, p. 213-225, 2001.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology**: methods and application. London: Hemisphere Publishing Corporation, 1995. 666p.

RICHARDSON, S. D. Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current issues. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 12, p. 4742-4774, 2010.

SADIK, O. A.; WITT, D. M. Monitoring endocrine disrupting chemicals. **Environmental Science Technology**, v. 33, p. 368A-374A, 1999.

SETTI A. A., LIMA J. E. F. W.; CHAVES A. G. M., PEREIRA I. C. **Introdução ao gerenciamento de recursos hídricos**. Disponível em: <<http://www.ana.gov.br>>; 2001. Acesso em: 9 nov. 2011.

SOARES, A.; GUIEYSSE, B.; JEFFERSON, B.; CARTMELL, E.; LESTER, J. N. Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, afte, toxicity and treatment in wastewaters. **Environment International**, v. 34, p. 1033-1049, 2008.

SODRÉ, F. F., LOCATELLI, M. A. F., MONTAGNER, C. C., JARDIM, W. F. Origem e destino de interferentes endócrinos em águas naturais. **Caderno Temático Unicamp**, v. 6, p. 1-27, 2007.

SOUZA, Renata Rodrigues. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de disruptores endócrinos resultantes de atividades antrópicas na águas da região do Rio Paraíba do Sul, SP**. 2011. 205f.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

STAPLES, C. A.; DORN, P. B.; KLECKA, G. M.; O'BLOCK, S. T.; HARRIS, L. R. A. A review of the environmental fate, effects and exposure of bisphenol A. **Chemosphere**, v. 36, n. 10, p. 2149-2173, 1998.

SUN, Y.; WADA, M.; KURODA, N.; HIRAYAMA, K.; NAKAZAWA, H.; NAKASHIMA, K. Simultaneous determination of phenolic xenoestrogens by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytical Sciences**, v. 17, p. 697-702, 2001.

TORRES, Nádia Hortense. **Monitoração de resíduos dos hormônios 17 α -etinilestradiol e estriol em águas de abastecimento urbano da cidade de Piracicaba, SP**. 2009. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

TUCCI, C. E. M.; HESPAÑOL, I.; CORDEIRO NETTO, O. M. **Gestão da água no Brasil**. Brasília: Unesco, 2001. 191p.

TUNDISI, J. G., **Água no século XXI: Enfrentando a escassez**. São Carlos: Rima, 2003. 622p.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL AGENCY (USEPA). **Quality Control, SW-846**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/chap1.pdf>>. Acesso em: 23 de nov. 2011.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL AGENCY (USEPA). **Ambient Aquatic Life Water Quality Criteria – Nonylphenol**. Disponível em : <<http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/aqlife/pollutants/nonylphenol/index.cfm>>. Acesso em: 23 de nov. 2011.

VOGEL, S. A. The politics of plastic: the making and unmaking of bisphenol A “safety”. **American Journal of Public Health**, v. 99, n. S3, p. 559-566, 2009.

ZAFRA, A.; del OIMO, M.; SUÁREZ, B.; HONTORIA, E.; NAVALÓN, A.; VÍLCHEZ, J. L. Gas chromatography-mass spectrometric method for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in urban wastewater. **Water Research**, v. 37, p. 735-742, 2003.

ZAFRA-GÓMEZ, A.; BALLESTEROS, O.; NAVALÓN, A.; VÍLCHEZ, J. L.
Determination of some endocrine disrupter chemicals in urban wastewater samples using liquid chromatography-mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 88, p. 87-94, 2008.