AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Caracterização química de hormônios sexuais em águas de poço da região da USP via cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas CG/EM

Graciele Pereira da Cruz Gonschorowski

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador:
Prof. Dr. José Oscar Willian Vega Bustillos

São Paulo
2013

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Caracterização química de hormônios sexuais em águas de poço da região da USP via cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas CG/EM

Graciele Pereira da Cruz Gonschorowski

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador:
Prof. Dr. José Oscar Willian Vega Bustillos

Versão Corrigida
Versão Original se encontra disponível no IPEN

São Paulo
2013

aos meus pais e meu marido pelo apoio e por sempre acreditarem em mim...

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

em primeiro lugar aos meus pais, que por mais que houvessem dificuldades, sempre batalharam para me educarem e tornarem a pessoa que sou hoje...

ao meu marido Juliano o qual sempre me apoiou e me incentivou a correr atrás dos meus sonhos e objetivos...

ao Dr. Oscar Vega Bustillos orientador e grande amigo que ganhei nesses dois anos e meio de convivência, uma pessoa maravilhosa e com um imenso coração, além de tudo um grande professor, pois fez uma matemática aprender um pouquinho de espectrometria de massas...

à Helena Miho, companheira de laboratório, e além de tudo uma grande amiga, que nas horas que mais precisei de ajuda sempre esteve disposta a esclarecer minhas dúvida...

à Dra. Elâine Arantes Jardim Martins por sempre ajudar e dar contribuições para o desenvolvimento do trabalho e disponibilizar o laboratório para serem realizadas as análises...

à Dra. Maria Aparecida Faustino e a Dra. Marycel E. B. Cotrim, também pela disponibilidade dos laboratórios e equipamentos e a Dra. Lucy Rebelo pela ajuda nas coletas.

ao IPEN/CNEN pelo auxílio financeiro...

aos amigos de laboratório Liana, Débora, Paula Paganini, Helen, Thelma, Clarissa, Klauss, Edson e aos "bolsas" Dudu, Vitor, Felipe e Amanda pelos dias prazerosos e pelas belas gargalhadas que compartilhamos juntos, nos almoços, nos cafés da tarde ou mesmo no laboratório...

às amigas Juliana e Larissa que sempre me ajudaram a realizar a parte experimental do trabalho...

aos amigos de outros laboratórios Henrique, Léo, Helô, Sandra, Beth, Maria que apesar de não serem do mesmo laboratório também estiveram presentes nos momentos

de descontrações, nas conversas pelos corredores, nos almoços ou nos cafés da tarde;

aos funcionários do CQMA Valderlei, João, Takeshi, Brandão pelas guloseimas do café da tarde....

à todos que conviveram comigo, seja nos momentos felizes, nos momentos de angústias e tristezas, muito obrigado por fazerem parte dessa etapa de minha vida...

A coragem é a primeira das qualidades humanas porque garante todas as outras

Aristóteles

RESUMO

Caracterização química de hormônios sexuais em águas de poço da região da USP via cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas CG/EM

GRACIELE PEREIRA DA CRUZ GONSCHOROWSKI

As substâncias farmacologicamente ativas tem despertado interesse da comunidade científica nos últimos anos. Estas substâncias são usadas em medicina diagnóstica, tratamento e prevenção de doenças. Algumas destas substâncias são excretadas na forma não metabolizada e outras na forma ativa, sendo que muitas delas não são completamente removidas nas estações de tratamento de esgotos. Um desses grupos ativos de substâncias, são os estrogênios esteróides e seus conjugados, os quais tem sido identificados como grandes contribuintes para a desregulação endócrina. O presente trabalho consistiu de desenvolver um método analítico empregando extração em fase sólida (SPE), usando cartuchos Strata-X, e cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) para a determinação dos hormônios sexuais contidos nas águas subterrâneas da região da cidade universitária de São Paulo, mais especificamente do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). Dentre os hormônios conhecidos, foi dado destaque nesse trabalho para os estrogênios naturais estradiol, estrona e progesterona, e os estrogênios sintéticos etinilestradiol e norgestrel. A validação do método foi baseada no documento do INMETRO e da ANVISA. Os índices de recuperações estiveram entre 70-120% para todos os compostos, estando dentro da faixa recomendada pela literatura para matrizes ambientais. Os limites de detecção encontrados variaram de 0,062 a 0,498 $\mu g.L^{-1}$, e os limites de quantificação foram de 0,942 a 1,343 $\mu g.L^{-1}$. Todos os compostos apresentaram coeficientes de determinação superiores a 0,99.

Abstract

Chemical characterization of sex hormones in water from wells in the region of the USP by gas chromatography coupled to mass spectrometry GC/MS

graciele pereira da cruz gonschorowski

The pharmacologically active substances has awaked the interest of the scientific community in recent years. These substances are used in diagnosis medicine, treatment and pevention of illness. Some the substances are excreted unmetabolized and others in the active form, many of which are not complety removed in the wastewater treatment plants. One these groups is the steroid estrogens and their conjugates, which has been identified as a major contributors to endocrine-disrupting This work presents the development of an analytical procedure through solid phase extraction (SPE) using Strata-X cartridges and gas chromatography acopled mass spectrometry (GC/MS) for the determination of sexual steroid hormones in groundwater from São Paulo University campus, specifically at Institute of Energy and Nuclear Research (IPEN). Among the known hormones, emphasis was given in this work for the naturals estrogens estradiol, estrone and progesterone, and the synthetics estrogens ethynylestradiol and norgestrel. The validation of the analytical method was based on the document INMETRO and ANVISA. The indices of recovery werw between 70-120q% for all compounds, being within the range recommended in the literature for environmental matrices. The detection limits ranged from 0.062 to 0.498 $\mu g.L^{-1}$, and the limits of quantification were 0.942 to 1.343 $\mu g.L^{-1}$. All compounds showed coefficients of determination greather than 0.99.

Sumário

Introdução **2**

Objetivos **5**

1 Embasamento Teórico **7**

1.1 Interferentes Endócrinos (IEs) - Visão histórica 7

1.2 Sistema Endócrino 10

1.3 Definição de Interferentes Endócrinos 11

1.4 Mecanismos de ação dos interferentes endócrinos 12

1.5 Metabolismo dos hormônios sexuais femininos (HSFs) 14

1.6 Propriedades físicas e químicas dos hormônios 16

1.7 Fontes de excreção e mecanismos de degradação de estrogênios 18

1.8 Efeitos da contaminação ambiental por estrógenos 22

1.9 Legislação 25

2 Revisão Bibliográfica **26**

3 Técnicas cromatográficas de determinação de hormônios esteróides **37**

3.1 Extração em fase sólida 38

3.2 Cromatografia Gasosa 42

3.3 Espectrometria de massas 44

4 Ferramentas Estatísticas para Análise dos Dados **50**

4.1 Variância e desvio padrão 50
4.2 Coeficiente de variação 51
4.3 Escore z 51
4.4 Distribuição normal 52
4.5 Distribuição t de Student 52
4.5.1 Graus de liberdade 53
4.6 Teste de Hipóteses 53
4.6.1 Procedimentos para se efetuar um teste de hipóteses 54
4.7 Teste de hipóteses para populações normais com variâncias desconhecidas e iguais 54
4.7.1 Procedimento para o teste de hipóteses para a média μ de uma população normal com σ^2 desconhecida 55
4.8 Teste de hipóteses para populações normais com variâncias desconhecidas e diferentes 56
4.9 Teste de hipóteses para a diferença entre duas variâncias 56
4.10 Correlação e Regressão Linear 57

5 Validação de ensaio químico 62
5.1 Seletividade 63
5.2 Linearidade e Faixa Linear de Trabalho 65
5.3 Limite de Detecção e Quantificação 67
5.4 Precisão 69
5.5 Exatidão 72
5.6 Recuperação 73
5.7 Robustez 75

6 Materiais e Métodos 78
6.1 Materiais e métodos 78
6.1.1 Reagentes e soluções 78
6.1.2 Materiais para filtração e para a extração em fase sólida (EFS) . 79

6.1.3 Equipamentos 79
6.2 Caracterização da área de estudo 79
6.3 Coleta e armazenamento das amostras 81
6.4 Preparo das soluções analíticas 81
6.5 Metodologia analítica 81
6.5.1 Filtração 82
6.5.2 Extração em fase sólida (EFS) 82
6.5.3 Condições da Cromatografia a Gás/Espectrometria de Massas (CG/EM) 84
6.6 Ensaios para validação da metodologia 85
6.6.1 Determinação da seletividade 85
6.6.2 Determinação da linearidade 86
6.6.3 Determinação do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) 87
6.6.4 Determinação da precisão 87
6.6.5 Determinação da exatidão 87
6.6.6 Determinação da recuperação 88
6.6.7 Determinação da robustez 88

7 Resultados e Discussões 90
7.1 Escolha do material sorvente para extração em fase sólida (EFS) 90
7.2 Validação do método 91
7.2.1 Seletividade 91
7.2.2 Linearidade 94
7.2.3 Limite de detecção/Limite de quantificação 106
7.2.4 Precisão 107
7.2.5 Exatidão 109
7.2.6 Recuperação 110
7.2.7 Robustez 111

7.2.8 Resultados da avaliação das amostras de água subterrânea . . . 115

8 Conclusões **116**

9 Considerações finais **118**

9.1 Trabalhos futuros 118

Referências Bibliográficas **119**

Lista de Figuras

1.1 Sistema Endócrino 11

1.2 Efeitos dos interferentes endócrinos sob os receptores 14

1.3 Estrutura do anel ciclopentanofenantreno dos esteróides. 15

1.4 Possíveis rotas dos hormônios sexuais femininos (HSFs) no meio ambiente 20

3.1 Principais etapas empregadas em SPE visando o isolamento de um composto ou classe de compostos 39

3.2 Esquema de cromatógrafo a gás: 1:fonte do gás de arraste; 2: controlador da vazão e regulador de pressão; 3: sistema de injeção da amostra; 4: coluna cromatográfica; 5: sistema de detecção; 6: sistema de registro e tratamento dos dados 43

3.3 Esquema de um espectrômetro de massas 45

3.4 Esquema de uma fonte por impacto de elétrons (IE) 47

3.5 Esquema de um analisador quadrupólo. (a) Uma seção hiperbólica transversal; (b) seção transversal de uma haste cilíndrica; (c) o princípio de operação de um filtro de massa quadrupólo 48

5.1 Limite de detecção 67

5.2 Trombeta de Horwitz 71

6.1 Localização do ponto de coleta 80

6.2 Sistema de Filtração a vácuo 82

6.3 Sistema de Extração em Fase Sólida 83

7.1 Cromatograma obtido na análise de solução de trabalho (1,2 $\mu g.mL^{-1}$) no modo SCAN 91
7.2 Representação gráfica da linearidade para os cinco compostos estudados na matriz de água subterrânea 96
7.3 Representação gráfica da linearidade para os cinco compostos estudados em solvente 97
7.4 Gráfico de resíduo absoluto para o composto estrona em matriz e sem matriz 98
7.5 Gráficos de resíduos absolutos para os compostos estradiol, etinilestradiol e norgestrel em matriz e sem matriz 99
7.6 Gráfico de resíduo absoluto para o composto progesterona em matriz e sem matriz 100
7.7 Gráficos de resíduos normalizados para os compostos estrona, estradiol, etinilestradiol em matriz e sem matriz 101
7.8 Gráficos de resíduos normalizados para os compostos norgestrel e progesterona em matriz e sem matriz 102
7.9 Gráficos de intervalo de confiança para o composto progesterona somente em solvente 105
7.10 Gráficos para estrona, estradiol representando o teste de Youden 111
7.11 Gráficos para etinilestradiol, norgestrel e progesterona representando o teste de Youden 112
7.12 Gráficos de probabilidade normal e rankit para os compostos estrona e estradiol 113
7.13 Gráficos de probabilidade normal e rankit para os compostos etinilestradiol, norgestrel e progesterona 114

Lista de Tabelas

1.1 Tabela de propriedades físico-químicas dos HSFs 17
1.2 Excreção diária (μg/dia) dos hormônios por seres humanos 19

4.1 Análise de Variância ANOVA 61

5.1 Planejamento Fatorial Saturado para avaliação do erro da distribuição dos efeitos 76

6.1 Características e condições de análise do sistema CG/EM 84
6.2 Relação massa/carga (m/z) dos 5 íons monitorados no modo SIM . . . 85
6.3 Fatores selecionados para a avaliação da robustez 88

7.1 Dados para os testes de seletividade dos compostos estudados. Adição de padrão na matriz de água subterrânea (AS) e sem matriz. 92
7.2 Dados para os testes de seletividade dos compostos estudados. Adição de padrão na matriz de água subterrânea (AS) e sem matriz. 93
7.3 Equação da reta e coeficiente de determinação (r^2) obtidos pela adição padrão na matriz de água subterrânea (AS) 95
7.4 Equação da reta e coeficiente de determinação (r^2) obtidos pela adição padrão somente em solvente 95
7.5 Resultados da análise de variância (ANOVA) para os cinco compostos de estudo na matriz de água subterrânea 104
7.6 Limite de detecção e quantificação para os cinco compostos estudados em matriz de água subterrânea (AS) 106

7.7 Limite de detecção e quantificação para os cinco compostos estudados em solvente 107
7.8 Coeficientes de variação para os cinco compostos estudados em três níveis de concentração em ensaio com matriz de água subterrânea (AS) 107
7.9 Valores do limite de repetitividade (r) para os cinco compostos em três níveis de concentração no ensaio com matriz de água subterrânea (AS) 108
7.10 Valores do limite de reprodutibilidade (R) para os cinco compostos em três níveis de concentração no ensaio com matriz de água subterrânea (AS) 109
7.11 Resultado do teste escore z para os cinco compostos estudados na matriz de água subterrânea (AS) e no ensaio sem matriz 110
7.12 Índice de recuperação para os cinco compostos estudados 110

LISTA DE ABREVIATURAS

ANA Agência Nacional de Águas

ANOVA Analysis of variance

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AS Água subterrânea

ASE Extração acelerado por solvente

CG/EM Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas

CETESB Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CONAMA Conselho Nacional do Meio Ambiente

CQMA Centro de Química e Meio Ambiente

CV Coeficiente de Variação

DCM Diclorometano

E1 Estradiol

E2 Estriol

EE2 Etinilestradiol

EI Electron Impact (Impacto de elétrons)

ECD Electron Capture Detector (Detector por captura de elétrons)

EFS Extração em fase sólida

ESI Electrospray Ionization (Ionização por electrospray)

ETA Estação de Tratamento de Água

ETE Estação de Tratamento de Esgoto

FID Flame Ionization Detection

GC Gas Chromatography (Cromatografia a gás

HPLC High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Performance)

HSF Hormônios sexuais femininos

FSH Hormônio folículo estimulante

IEs	Interferentes Endócrinos
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Koc	Coeficiente de sorção
Kow	Coeficiente de partição octanol-água
LC	Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida)
LC/MS	Liquid Chromatography/Mass Spectrometry
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
ME	Margino f Error
ME	Multiplicador de electrons
MeOH	Metanol
OASIS HLB	Hydrophilic Lipophilic Balandec Copolymer
PLE	Pressurized Liquid Extraction (Extração a liquid pressurizado)
PMQA	Programa de Monitoramento Químico Ambiental
PMRA	Programa de Monitoramento Radiológico Ambiental
SIM	Selected Ion Monitoring
SME	Simultaneous Margin Error
SPE	Solid Phase Extraction
TCD	Detector por condução térmica
USEPA	United States Environmental Protection Agency
VTG	Vitelogenina

Introdução

A água é de fundamental importância para a vida. Seus múltiplos usos são indispensáveis a um largo campo das atividades humanas onde se destacam, o abastecimento público e industrial, a irrigação agrícola, a produção de energia elétrica, as atividades de lazer e recreação e a preservação da vida aquática. Todavia, os modelos de desenvolvimento adotados pelo homem para a agricultura, a pecuária, a indústria e os centros urbanos não tem levado em conta, há muito tempo, o meio ambiente (Ghiselli, 2006)

Com isso vem crescendo também o comprometimento das águas dos rios, lagos, águas subterrâneas e reservatórios, bem como a degradação dos mananciais, fazendo com que haja um aumento nos custos de tratamento e dificultando o acesso a água potável. Por isso, são necessários estudos da qualidade da água, essencial à saúde pública e as necessidades sociais vitais.

A qualidade das águas subterrâneas pode ser definida por suas características físicas, químicas e biológicas, sendo que o uso dessas águas são dependentes dessas características. A contaminação das águas subterrâneas embora sejam menos vulneráveis do que as águas superficiais, também podem ser afetadas por contaminantes provenientes da superfície, dentre as quais podemos citar as fontes poluidoras: aterros sanitários precários que podem proporcionar infiltração de chorumes; lançamento de esgotos de cidades sem o devido tratamento em corpos de superfície - fossas sépticas, drenos, vazamento de tubulações; atividades industriais; atividades agrícolas e contaminações diretas por poços mal executados.

Estrogênios, androgênios e progestagênios, tanto naturais quanto sintéticos podem ser lançados diariamente em corpos dágua já que vários organismos os excretam em

diferentes quantidades dependendo da idade, do estado de saúde, da dieta ou do estado de gestação (Johnson et al. 2000), e sua principal maneira de excreção é através da urina e em menores quantidades nas fezes.

Alguns trabalhos mostram que esses compostos têm sido detectados em amostras provenientes de sistemas aquáticos como de esgotos domésticos, devido à remoção/des truição ineficiente dos mesmos após serem tratados nas ETEs (Estação de Tratamento de Esgotos). Como são resistentes à maioria dos processos empregados podem também ser encontrados nas águas superficiais e até mesmo na água potável e águas subterrâneas.

Esses hormônios se enquadram na categoria dos compostos químicos ditos como Interferentes Endócrinos (IE), os quais nos últimos anos vem tomando a atenção da comunidade científica. Segundo a USEPA (US Environmental Programme Agency) (USEPA, 1997), um interferente endócrino é um agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação ou eliminação de hormônios naturais (Otomo, 2010; Ghiselli, 2006).

A análise em níveis de traços de compostos orgânicos é um dos maiores problemas encontrados na química analítica, devido as suas baixas concentrações e à complexidade das matrizes ambientais em que estes agentes se encontram. Esses fatores fazem com que novas técnicas de pré-tratamento e de análises desses compostos sejam desenvolvidas. Uma das técnicas mais empregadas no pré-tratamento das amostras é a extração em fase sólida (solid phase extraction SPE), e a cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas (CG/EM)a técnica analítica mais comumente utilizada para esses fins.

No presente trabalho os hormônios a serem estudados serão os estrogênios naturais (estradiol, estrona, progesterona) e os estrogênios sintéticos (etinilestradiol, norgestrel) onde a matriz de estudo será água de poços artesianos do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN utilizando como técnica analítica a CG/EM. Como a legislação brasileira através do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005) somente determina os padrões de qualidade das águas, não havendo uma legislação re-

ferente as concentrações e emissões permitidas desses hormônios em água subterrânea, tomaremos como base as concentrações encontradas em Otomo (Otomo, 2010) onde alguns dos compostos puderam ser detectados e outros estiveram abaixo dos limites de quantificação (LQ), sendo os valores encontrados para amostras de água tratada 0,864 $\mu g.L^{-1}$ (estrona), 0,876 $\mu g.L^{-1}$ (estradiol), 0,865 $\mu g.L^{-1}$ (etinilestradiol), 0,845 $\mu g.L^{-1}$ (norgestrel) e 0,696 $\mu g.L^{-1}$ (progesterona) e para amostras de água bruta os LQ foram de 0,561 $\mu g.L^{-1}$ (estrona), 0,552 $\mu g.L^{-1}$ (estradiol), 0,567 $\mu g.L^{-1}$ (etinilestradiol), 0,556 $\mu g.L^{-1}$ (norgestrel) e 0,525 $\mu g.L^{-1}$ (progesterona).

Objetivos

Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho é desenvolver e validar a metodologia para avaliar a qualidade das águas dos poços do IPEN com respeito a contaminação de hormônios sexuais, bem como avaliar a metodologia de extração desses compotos. Especificamente os itens a serem estudados serão:

Objetivos Específicos

- Avaliar a eficiência do cartucho Strata X como uma segunda opção de cartucho, visto que no laboratório o cartucho mais utilizado para a extração destes compostos é o C18.

- Otimizar a metodologia já desenvolvida por Otomo (Otomo, 2010) para a caracterização química de hormônios em água utilizando o CG/EM, especificamente para os hormônios estradiol, estrona, progesterona, etinilestradiol e levonorgestrel;

- Validar b o método analítico utilizado para análise dos interferentes endócrinos na água;

- Estudar detalhadamente a validação dando um enfoque mais estatístico aos cálculos com ferramentas computacionais.

Capítulo 1

Embasamento Teórico

1.1 Interferentes Endócrinos (IEs) - Visão histórica

Embora os estudos referentes aos interferentes endócrinos sejam recentes, seus efeitos na vida silvestre datam do início do século XX (1920), onde foi publicada que a condição sexual de ratas imaturas poderia ser induzida injetando-se uma pequena quantidade do que era conhecido até então por hormônio folicular ovariano de porcos (Mathiessen,2003).

Em 1930 foi publicado que certos compostos podiam mimetizar hormônios endógenos de animais (Walker e Janney, 1930). Em 1939 foi descoberto que compostos alquilfenólicos poderiam se ligar ao receptor hormonal e, consequentemente, causar efeitos endócrinos adversos (Jobling et al., 1998).

Na década de 1940, foi observada uma epidemia de infertilidade em ovelhas da Austrália Ocidental, e pesquisadores descobriram que uma substância química presente no trevo, era responsável pelos problemas reprodutivos, pois mimetizavam os efeitos biológicos de estrogênios (Bennets et al., 1997).

Burlington e Linderman, em 1950, observaram que galos tratados com DDT tinham testículos menores e não tinham cristas e barbelas como os galos normais (Colborn et al., 1998). Na mesma década percebeu-se que as lontras estavam desaparecendo dos

rios e lagos da Inglaterra, porém só na década de 1980 é que pesquisadores apontaram o Dieldrin e o DDT como possíveis causadorores desses impactos (Mason et al., 1986).

Nos anos 1960 foi observada a morte e a infertilidade dos visons que se alimentavam de peixes dos Grandes Lagos no Michigan. Os criadores estavam cruzando visons domesticados, mas as fêmeas não estavam produzindo filhotes. Em 1967, a situação chegou a tal ponto que muitas fêmeas ficaram estéreis e os poucos filhotes que nasciam morriam. Em busca de uma causa para esses efeitos, pesquisadores da universidade do Michigam identificaram a presença de PCB nas águas dos grandes Lagos.

Nessa década ainda, Rachel Carson em seu livro "Silent Spring" fez uma advertência sobre os perigos representados por substâncias químicas que alteram as mensagens hormonais. Em 1965 Tumm-Zollinger e Fair, publicaram o primeiro artigo sobre hormônio humano em água, mostrando que os esteróides não eram eliminados durante o processo de tratamento de água.

Em 1970, foi observado que embriões e filhotes machos de gaivotas que viviam no Lago Ontário, Canadá, tinham ovidutos e ovários. Pesquisas mostraram que essa efeminização era decorrente de inseticidas como o diclorofenol, kepone e metoxicloro. Nesse mesmo ano trabalhadores de uma fábrica de produtos químicos começaram a apresentar contagens de espermatozóides extremamente baixas após terem sido expostos a kepone, um produto químico usado como inseticida e matéria-prima para outros materiais (Guzelian, 1997).

Em 1971 foi publicado um artigo em que se relatava que 7 entre 8 mulheres que tratavam de carcinoma vaginal eram filhas de mulheres que haviam tomado DES (dietilestilbestrol) durante os três primeiros meses de gestação (Herbst et al., 1997). McLachlan et al (McLachlan et al., 1975) publicaram um artigo detalhando os estragos reprodutivos provocados em camundongos machos quando expostos a DES antes do nascimento e em estudos seguintes mostraram que camundongos fêmeas apresentavam adenocarcinoma vaginal, quando expostos ao DES no período pré ou neonatal (Newbold e McLachlan, 1997).

Em meados de 1980, observou-se uma queda reprodutiva em jacarés que viviam no

lago Apokpa, na Flórida, onde a quantidade de ovos das fêmeas que eclodiam era baixa e as pesquisas mostraram uma morfologia anormal do ovário, sendo o nível de estradiol no sangue maior do que o normal; enquanto muitos jacarés tinham pênis menor do que o normal, os juvenis mostravam uma concentração baixa de testosterona (Guillette et al., 1994). Tartarugas fêmeas que também viviam neste lago mostraram problemas reprodutivos, tais como, níveis elevados de estrogênios, ovários anômalos e reversão sexual (Bergeron et al., 1994).

Nesse período também baleias belugas, do estuário de São Lourenço, Canadá, começaram a aparecer mortas. Beland et al. (1997) e Martineau et al. (1997) fizeram muitas autópsias em baleias e observaram que elas tinham tumores malignos de mama, intumescências abdominais, úlceras na boca, estômago, esôfago e intestino, bem como desordens endocrinológicas.

Funcionários da Thames Water, uma concessionária de serviços de água e esgotos da Inglaterra, observaram que cinco por cento das carpas que viviam em contato próximo das águas contaminadas pela descarga do efluente de estações de tratamento de esgoto (ETE) no rio Lea, eram hermafroditas. Estudos foram realizados e observou-se que os machos continham no seu plasma, quantidades mensuráveis de Vitelogenina (VTG), que é uma proteína precursora da gema do ovo, normalmente produzida por fêmeas adultas. Esse fato foi indicativo da presença de estrogênio na água (Tyler e Routledge, 1998).

Devido a todos esses fatos descritos, em dezembro de 1996 foi organizado um seminário europeu em Weybridge dedicado aos estudos do impacto dos IEs sobre a saúde do homem e dos animais (COM, 1999), levando as seguintes conclusões:

- existiam provas suficientes de que as taxas de câncer no testículo estavam aumentando, e pareciam ser genuínas a aparente queda de espermatozóides em indivíduos do sexo masculino;

- observaram casos na Europa em que os efeitos endócrinos adversos, ou de toxicidade na reprodução em aves e mamíferos coincidiam com níveis elevados de

substâncias que revelaram propriedades de inferência endócrina em alguns sistemas submetidos a ensaio;

- o nível considerável de incerteza e de falta de dados deveria diminuir com a investigação da exposição e dos efeitos nos animais e no homem, mas até lá adotar-se-ia o "Princípio de Precaução", onde deveriam ser previstas medidas para reduzir a exposição aos IEs.

Contudo somente em 1997, na reunião da câmara ambiental do G8, foi encorajada uma coordenação internacional visando adotar ações específicas relacionadas aos IEs, com base em estudos científicos e constatações dos efeitos destas substâncias em organismos vivos (COM, 1999). Em resposta a estas recomendações, o IPCS (International Programme on Chemical Safety) assumiu a responsabilidade pelo desenvolvimento da avaliação global do corrente estado da arte relativo à interferência endócrina.

1.2 Sistema Endócrino

O sistema endócrino, juntamente com o sistema nervoso regulam todas as funções fisiológicas do organismo humano. Enquanto o cérebro se comunica por meio de impulsos nervosos, o sistema endócrino se comunica transportando informações pela circulação de um tecido para outro através dos hormônios. Estes hormônios são produzidos e secretados pelas glândulas endócrinas diretamente na corrente sanguínea, influenciando as atividades funcionais de outras células, sendo esta influência de natureza excitadora ou inibidora. Eles são os dois maiores modos de comunicação que coordenam e controlam as funções do corpo.

O sistema endócrino também participa das funções mais importantes de um organismo, como a diferenciação sexual antes do nascimento, a maturidade sexual durante a puberdade, a reprodução na idade adulta, o crescimento, o metabolismo, a digestão, a função cardiovascular e a excreção. Os hormônios estão também implicados na etiologia de certos cânceres de tecido hormônio-dependentes, como o de seio, de útero e

de próstata (Johnson et al., 2000).

Nosso corpo é constituído por nove glândulas endócrinas (FIG. 1.1). A glândula pineal, inibe a precocidade sexual; o hipotálamo controla a produção de hormônios de outras glândulas endócrinas; a pituitária: controla a ação de outras glândulas; a tireóide ajuda a controlar a produção de energia; a paratireóide distribui o cálcio entre o sangue e os ossos; o timo produz hormônios que estão relacionados com a defesa contra infecções, formação de anticorpos, formação do sistema linfático e auxílio no controle do crescimento e maturação sexual; as glândulas adrenais regulam o nível do sal e da água e secretam estimulantes; células do pâncreas controlam o açúcar do sangue e as glândulas sexuais governam a reprodução e as características sexuais secundárias (Mello e Fruchtengarten, 2005; Von Brandis, 2001).

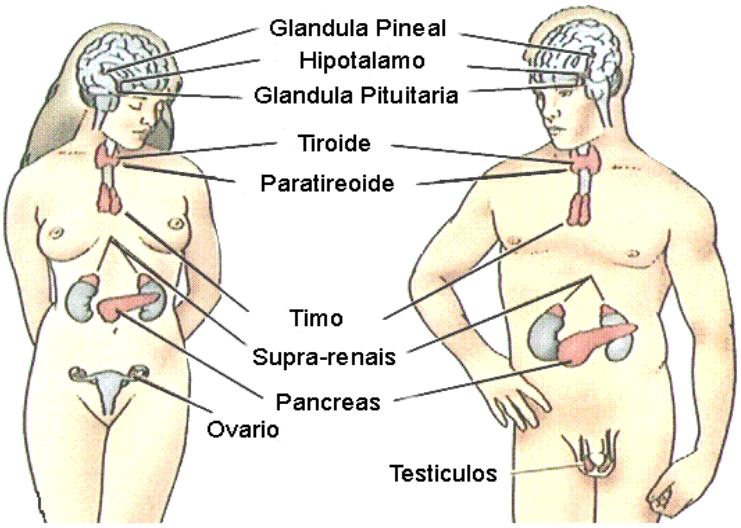

Figura 1.1: Sistema Endócrino

1.3 Definição de Interferentes Endócrinos

Segundo a USEPA (US Environmental Protection Agency), um interferente endó crino é um agente exógeno que interfere com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais no corpo que são responsáveis pela manu-

tenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos (USEPA, 1997).

Para o Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, 2002), um interferente endócrino, ou desregulador endócrino, é uma substância ou mistura exógena que altera a função do sistema endócrino e consequentemente causa efeitos adversos em um organismo intacto, ou em seus descendentes, ou (sub) populações.

Assim, um interferente endócrino é o termo associado a toda substância ou mistura de substâncias exógenas capazes de assumir função idêntica de um hormônio natural nos seres vivos ou inibir o funcionamento normal do mesmo, alterando as funções do sistema endócrino e causando efeitos adversos nos organismos ou em seus descendentes (Waring e Harris, 2005; Nogueira, 2003).

Estas substâncias, que alteram o sistema endócrino podem ser divididas em duas classes:

- os hormônios naturais que incluem o estrogênio, a progesterona e a testosterona, que estão presentes no nosso organismo e de animais, e os fitoestrogênios, presentes em plantas.

- os compostos sintéticos ou de origem antrópica que incluem hormônios sintéticos os quais são idênticos aos naturais, utilizados como contraceptivos orais e/ou aditivos de alimentação animal, bem como os xenoestrênios, produzidos para a utilização nas indústrias e na agricultura.

1.4 Mecanismos de ação dos interferentes endócrinos

Existem inúmeros mecanismos pelos quais os IEs podem, teoricamente modular o sistema endócrino e potencialmente causar efeitos adversos. O paradigma geralmente aceito para as respostas pelo receptor-mediador inclui a ligação do hormônio ao seu receptor na superfície da célula, citoplasma ou núcleo, seguido por uma série complexa

de eventos que levam a mudança na expressão genética, isto é, na característica de um hormônio específico.

O receptor de estrógenos é uma proteína especial, existente dentro das células em muitas partes do corpo, inclusive no útero, na mama, no cérebro e no fígado. As moléculas de hormônios são minúsculas se comparadas aos receptores, elas se encaixam como uma chave e fechadura, e uma vez conectadas se movem em direção ao núcleo da célula. Essa união entre hormônio e receptor tem em mira os genes que desencadeiam a produção de proteínas específicas (Colborn et al., 1998).

Um interferente endócrino pode então agir em um receptor hormonal, provocando diferentes respostas, tais como (FIG. 1.2):

- Célula em processo normal: um hormônio natural se liga a seu receptor e ativa os genes no núcleo da célula para proteger respostas biológicas apropriadas.

- Célula sob efeito de um mimetizador: o interferente endócrino é parecido com estrógenos e pode se ligar ao receptor hormonal, imitando (mimetizando) a ação de um hormônio natural e produzindo uma resposta. Este processo é chamado de efeito agonista.

- Célula sob efeito de um bloqueador: os interferentes endócrinos podem também se ligar ao receptor bloqueando a ação hormonal, não desencadeando uma resposta, mas impedindo que os hormônios naturais se encaixem ao receptor. Este processo é chamado de efeito antagonista.

Entre os hormônios femininos, os estrogênios naturais 17β-estradiol, estrona e estriol, o estrogênio sintético 17α-etinilestradiol e a progesterona, são os que mais despertam interesse devido tanto pelo efeito quanto pela quantidade continuamente descartada no meio ambiente. Estes hormônios possuem a melhor conformação reconhecida pelos receptores e, portanto resultam em respostas máximas (Machado, 2010), sendo o efeito destes no sitema endócrino agonista.

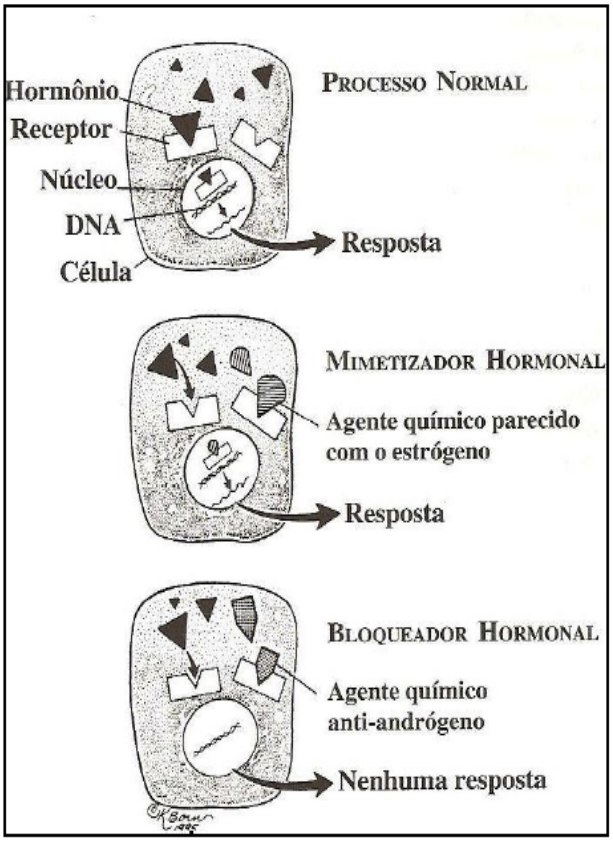

Figura 1.2: Efeitos dos interferentes endócrinos sob os receptores (Colborn et al., 1998)

1.5 Metabolismo dos hormônios sexuais femininos (HSFs)

Os hormônios sexuais femininos se enquadram no grupo dos esteróides os quais fazem parte também uma variedade de compostos orgânicos naturais e sintéticos, incluindo ácidos biliares e corticosteróides. Eles são um grupo de compostos biologicamente ativos, sintetizados a partir do colesterol e classificados em três classes: C21, derivados do pregnano, ditos progestógenos; C19, derivados do androstano, ditos andrógenos; e C18, derivados da estrona, ditos estrógenos.

Os estrogênios como todos os esteróides, compartilham o mesmo núcleo de anel

de hidrocarbonos como o colesterol. A FIG. 1.3 ilustra a estrutura básica do anel, consistindo de três anéis hexagonais (A,B,C) e um anel pentagonal (D). Estrógenos esteróides são caracterizados pelo seu anel A fenólico, o qual forma o ácido 3-hidroxila e é essencial para a atividade biológica estando na classe dos esteróides C18, os quais possuem 18 átomos de carbono em sua estrutura.

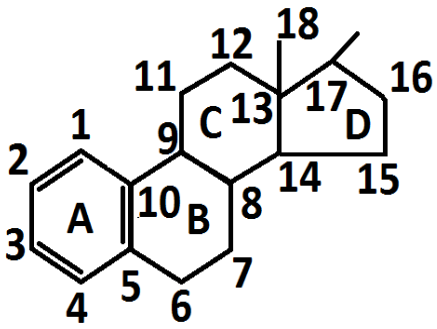

Figura 1.3: Estrutura do anel ciclopentanofenantreno dos esteróides.

O núcleo ciclopentanofenantreno lipofílico mostrado na FIG. 1.3 é modificado pela adição do grupo hidrofílico para formar diferentes esteróides. No caso dos três estrogênios livres naturais, grupos hidroxilas e carbonilas são adicionados, enquanto grupos etinil são encontrados na estrutura dos estrogênios sintéticos livres, como o 17β-etinilestradiol, um componente da pílula contraceptiva.

A síntese dos hormônios esteróides sexuais femininos - estrógenos e progestógenos - é um sistema muito complexo. O sistema límbico do cérebro libera neurotransmissores específicos ou neuropeptídeos que estimulam o hipotálamo para produzir os chamados fatores de liberação. Estes fatores de liberação então estimulam a pituitária para liberar hormônios específicos (gonadotróficos) que são transportados através da corrente sanguínea para tecidos que sintetizam hormônios. No caso dos mamíferos os gonadotróficos que vem da pituitária são hormônios luteizados (HL) e hormônios folículos estimulantes (HFE) (Lintelmann et al., 2003).

Estrógenos e progestógenos são hormônios femininos com diferentes tarefas. Estrógenos (estradiol, estrona, estriol, equilina, equilinina) são responsáveis pelas carac-

terísticas secundárias femininas e regulação da reprodução. Estradiol estimula a proliferação e crescimento nos orgãos do trato reprodutivo, causa o desenvolvimento do endométrio do útero, e influencia libido. Progesterona ajuda a regular as mudanças que ocorrem durante a menstruação e influencia o desenvolvimento de membranas fetais e glândulas mamárias durante a gravidez.

Como sabe-se a reprodução é regulada pelo complexo hormonal, entre vários orgãos do sistema, isto é, o ovário envia sinais de resposta á glândula pituitária e ao cérebro através dos estrógenos, e este sinal pode ser inibidor ou estimulante. O processo de recepção hormonal, implica em qual tipo de tecido identificará e responderá a um determinado hormônio quando várias substâncias estiverem circulando no sangue. Uma célula reconhece o hormônio através de receptores e proteínas que interagem com o hormônio em uma estrutura específica, como a chave (hormônio) que é aceita por uma fechadura (receptor). Esta interação entre hormônios e receptores desencadeia reações bioquímicas, conhecidas como sinalização intracelular, levando a uma resposta biológica característica (Lintelmann et al., 2003).

1.6 Propriedades físicas e químicas dos hormônios

Uma vez lançado nos corpos dágua, o destino e comportamento dos hormônios sexuais femininos no ambiente e nas estações de tratamento de esgotos (ETEs), são influenciados por suas propriedades físico-químicas, as quais reagem a partição na água, solo ou biota. Compostos com baixa solubilidade e alto coeficiente de partição octanol/água (k_{ow}), geralmente estão presentes em tecidos gordurosos da biota, o que promove a bioacumulação na cadeia alimentar. O k_{ow} também pode determinar a sorção efetiva e a afinidade dessas substâncias em matéria orgânica.

Os mecanismos de sorção são, a absorção que trata de interações hidrofóbicas caracterizadas pelo valor de k_{ow} e a adsorção que está relacionada com interações eletrostásticas e a tendência da substância de se dissociar no meio aquático, que é caracterizada pela sua constante de dissociação pk_a (Ghiselli, 2006).

O valor do coeficiente log octanol/ água (logk_{ow}) para os estrogênios livres variam de 2,81 a 4,15, sendo evidente que estes compostos são lipofílicos e ligeiramente solúveis em água e quando dissolvidos, podem ser rapidamente removidos da fase aquosa, como resultado da ligação com sólidos suspensos (Birkett e Lester, 2003). Os esteróides sintéticos tem o coeficiente de partição octanol/água mais alto (log k_{0w}). Todos os esteróides tem pressão de vapor muito baixa e valores de pk_a relativamente altos (acima de 10). Com base nestes dados percebe-se que os estrogênios são não voláteis, isto é, substâncias altamente lipofílicas que podem ser absorvidas em sólidos em matrizes ambientais.

Quando os estrogênios são excretados por mamíferos, a via primária é através da formação de ácido glucorônico ou conjugados de sulfato. Esteróides conjugados são 10-50 vezes mais solúveis que os estrogênios principais.

A TAB. 1.1 mostra algumas propriedades físico-químicas dos compostos de interesse desse trabalho.

Tabela 1.1: Tabela de propriedades físico-químicas dos HSFs

Hormônio	M (g/mol)	pKa	log Kow	Pressão de vapor mm (Hg)	Solubilidade sat a 25°C (mg/L)
17β-Estradiol	272,38	10,5-10,7	3,94	$2,3X10^{-10}$	12,9
Estrona	270,37	10,3-10,8	3,43	$2,3X10^{-10}$	12,4
17α-Etinilestradiol	296,41	10,4	4,15	$4,5X10^{-10}$	4,8
Progesterona	314,46	-	3,62	-	8,8

O conhecimento das características físicas e químicas dos hormônios facilitam o planejamento de métodos para a determinação analítica em matrizes ambientais.

1.7 Fontes de excreção e mecanismos de degradação de estrogênios

Interferentes endócrinos, bem como outros poluentes, tem uma variedade de fontes. Estas fontes podem ter implicações para a exposição humana, efeitos em animais selvagens, e efeitos ou acumulação no meio ambiente. Tais fontes podem ser classificadas em dois grupos: pontuais e não pontuais.

Uma fonte pontual tem um ponto definitivo de entrada de um poluente no meio ambiente, esses pontos são bem caracterizados geralmente através de cursos d'água (descargas de efluentes industriais e esgotos de origem doméstica, derramamentos acidentais, atividades de mineração, enchentes). No caso das fontes não pontuais, elas são mais difíceis de serem controladas, pois o ponto de entrada dos poluentes no ambiente dependem do tipo de fonte, da sua localização, suas propriedades físico-químicas e as condições ambientais.

Com respeito a contaminação do meio ambiente por hormônios sexuias femininos, a principal fonte é o lançamento de esgoto sem tratamento e a ineficiência das estações de tratamento de esgotos (ETEs) (Raman et al., 2004). Isto se deve a que vários organismos eliminam quantidades diferentes de hormônios, dependendo da idade, do estado de saúde, da dieta ou do estado de gestação, sendo que esta eliminação ocorre diariamente pela urina e pelas fezes em menor quantidade (Lintelmann et al., 2003). A TAB. 1.2 apresenta uma estimativa das taxas de excreção diária dos principais estrogênios naturais e do estrogênio sintético 17α-etinilestradiol por humanos.

Em mulheres normais, o 17β-estradiol tem sua taxa de produção variável durante o ciclo menstrual, variando desde níveis baixos de $50\mu g.L^{-1}$, no início da fase folicular, até valores mais elevados, chegando a 350-850$\mu g.L^{-1}$, no pico da pré-ovulação (Kassab, 2001).

Além dos hormônios naturais, atualmente há a disponibilidade de um grande número de anticoncepcionais orais e injetáveis contendo progestagênios e estrogênios para uso clínico. As concentrações dos hormônios nos anticoncepcionais variam de 30 a 300μg

Tabela 1.2: Excreção diária (μg/dia) dos hormônios por seres humanos (Johnson e Sumpter, 2001)

Excreção (µg/dia)	17β-estradiol	Estrona	Estriol	17α-etinilestradiol
Homens	1,6	3,9	1,5	-
Mulheres em menstruação	3,5	8	4,8	-
Mulheres em menopausa	2,3	4	1	-
Mulheres em gestação	259	600	6000	-
Mulheres	-	-	-	35

por comprimido, sendo que uma parte é absorvida, enquanto uma fração, que pode chegar até 80% é eliminada pela urina (Fernandes, 2007).

O mecanismo e a cinética das de-conjugações de estrogênios são fatores importantes para determinar, avaliar e predizer o potencial estrogênico em águas superficiais. Para facilitar a excreção com urina o corpo feminino excreta principalmente estrógenos em uma forma biológica inativa como sulfato e conjugados glicuronídeos. Tais conjugados podem depender de diferentes fatores para serem facilmente clivados, resultando em uma re-ativação de estrogênios para uma forma ativa. Esta formação ou conjugação de estrogênios depende parcialmente das propriedades ácido-base da matriz ambiental e de possíveis processos bacteriais dentro da matriz, pois dependendo da ação de enzimas produzidas por bactérias comumente encontradas em áreas de despejo de efluentes, estas facilmente os biotransformam em compostos biologicamente ativos e passivos de desencadearem efeitos principalmente na biota (Ghiselli, 2006).

Quando os hormônios naturais e sintéticos não são degradados por mecanismos tais como, biodegradação, sorção com sólidos suspensos e sedimentos superficiais do leito nos corpos d'água, adsorção no solo, volatização ou folólise, eles são transportados no meio ambiente por diferentes rotas. Estas rotas podem ser verificadas pela FIG. 1.4, onde primeiramente os hormônios são produzidos ou consumidos como medicamentos, ocorre a excreção, na forma conjugada (ligado ao ácido glicurônico ou a sulfato), para

a rede coletora de esgotos no caso dos humanos e em forma de resíduo para os animais. Em seguida, em alguns casos, o esgoto é lançado in natura nos corpos d'água, porém, em outros, o esgoto passa por tratamento em ETEs, e o efluente é lançado no corpo d'água (Araujo, 2006). No caso dos animais, estes excretam hormônios no solo, que por sua vez atingem os mananciais superficiais por escoamento, ou subterrâneo por infiltração.

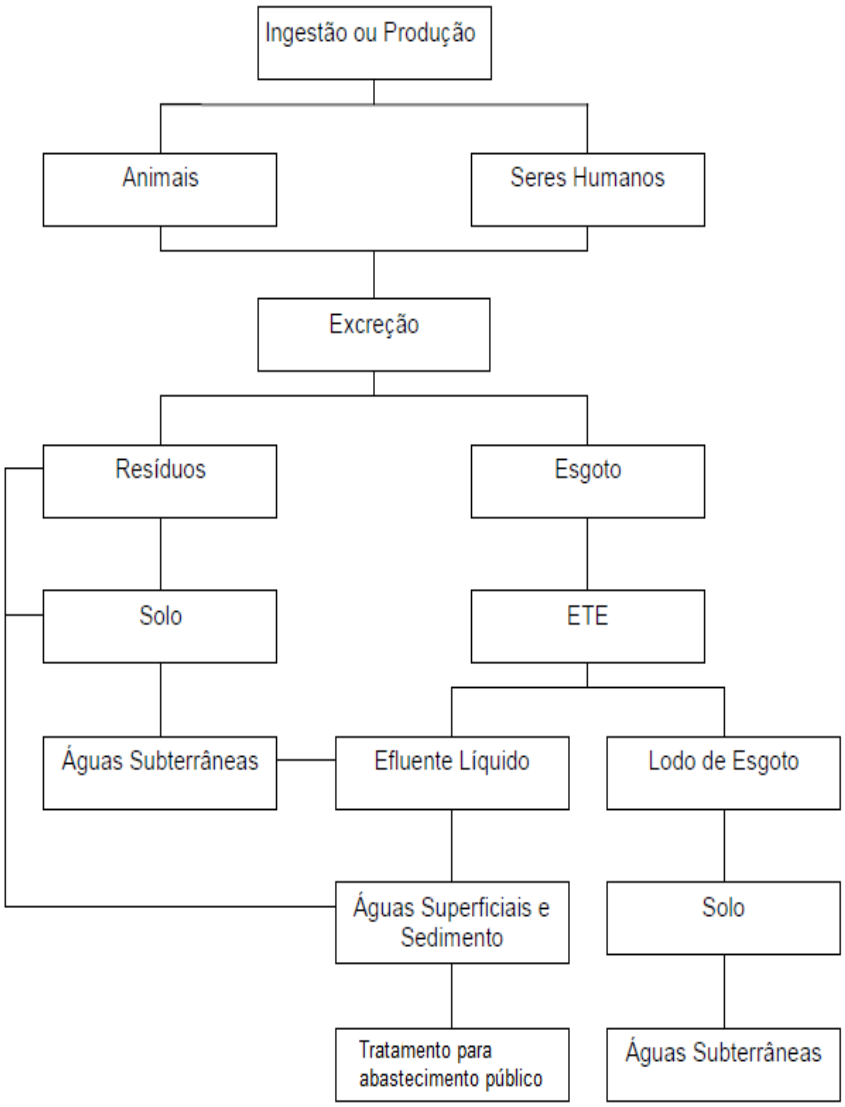

Figura 1.4: Possíveis rotas dos hormônios sexuais femininos (HSFs) no meio ambiente (Lintelmann et al., 2003)

A emissão de estrogênios naturais em fazendas de animais (gado, porcos, galinhas) é potencialmente uma fonte importante de poluição de estrogênios no ambiente. Os principais componentes são estrona (E1), estradiol (E2), 17β-estradiol (17β-E2) e seus conjugados. Em contraste com humanos, a excreção de 17β-estradiol é significante.

As concentrações de estrogênios em fezes e urina de vacas não prenhas é em torno de $30\mu g.kg^{-1}$ e $15\mu g.L^{-1}$. A média de excreção durante o período de gestação é relatada ser de $1,3mg.dia^{-1}.animal^{-1}$. Similarmente a média da excreção de estrogênios em estrume é de $1,13mg.kg^{-1}$ em porcas prenhas, sendo que em porcas não prenhas isso é estimado ser de 100-200 vezes inferiores.

Assim os HSFs podem ser encontrados em diversos compartimentos ambientais e como não são completamente removidos nas ETEs podem retornar para o início da rota, tornando-se um ciclo vicioso.

Com respeito ao tratamento desses compostos dado nas ETEs, como os hormônios tem características hidrofóbicas, o que favorece a ocorrência de reações de adsorção com o material particulado em suspensão, espera-se que as técnicas de separação mecânica, como a sedimentação, promovam a remoção destes compostos orgânicos.

Na maioria das estações de tratamento de esgoto, os principais mecanismos de remoção dos compostos orgânicos envolvem (1) a adsorção em sólidos suspensos, (2) a associação dos compostos com ácidos graxos e óleos, (3) a biodegradação aeróbica ou anaeróbica, (4) a degradação química por processos de hidrólise ou nitrificação e (5) a volatização (Raimundo, 2007).

Apesar dos tipos de tratamentos convencionais serem efetivos, estudos tem mostrado que o tratamento por lodos ativados tem mostrado uma remoção mais eficiente de HSFs, seguido do filtro biológico (Ternes, 1999).

Segundo Khanal e colaboradores (Khanal et al., 2006), o motivo da maior eficiência dos sistema de lodos ativados se deve à nitrificação por bactérias nitrificantes, porém este processo exige um longo período.

Os reatores biológicos, de maneira geral são ambientes que favorecem as melhores condições para o crescimento de microorganismos degradadores de matéria orgânica,

em termos de pH, temperatura, nutrientes, presença ou ausência de oxigênio, contato da biomassa com substrato, entre outros (Chernicharo, 2007).

Os processos aeróbios são caracterizados pela degradação dos poluentes orgânicos na presença de oxigênio. Neste tipo de metabolismo, a matéria orgânica poluidora age como fonte de carbono e de energia (doador de elétrons), e o oxigênio é aceptor final de elétrons, que pode ser introduzido no sistema de maneira natural, muitas vezes caracterizando uma degradação mais lenta; ou de forma artificial, o que aumenta a concentração de oxigênio disponível para bactérias degradadoras, acelerando a remoção dos poluentes (Von Sperling, 2005).

No caso do processo anaeróbio os sistemas de tratamento de efluentes são caracterizados pela degradação sequencial dos poluentes, na ausência de oxigênio molecular, por um consórcio de microorganismos interdependentes, que utilizam a matéria orgânica como fonte de carbono e energia. Esses processos levam a produção de, metano e gás carbônico.

Outras técnicas de tratamento que podem melhorar a eficiência das ETEs na remoção dos hormônios sexuias femininos são a ozonização, radiação ultravioleta, membranas de filtração, carvão ativado e irradiação ionizante.

Experimentos preliminares mostraram que cerca de 80% de conjugados glicuronídeos de 17β-estradiol são detectados como estradiol (E2) e estrona (E1) em matrizes ambientais depois de 20-30 horas e após 50 horas 10-20% de E1 e E2 ainda são degradados. Em outros estudos a baixa degradação de E2 e o produto de degradação primária de E1 foram observados. No que diz respeito ao estrogênio sintético etinilestradiol (EE2), somente 20% foi degradado depois de 24 horas sob condições aeróbicas.

1.8 Efeitos da contaminação ambiental por estrógenos

Os estrogênios 17α-etinilestradiol ($17\alpha - EE2$) e o 17β-estradiol ($17\beta - E2$), são os mais potentes da classe dos interferentes endócrinos. Isso ocorre porque os estrogênios naturais e sintéticos são efetivos em níveis de ng.L^{-1}, enquanto que a maioria dos

compostos químicos apresentam atividade estrogênica em níveis de $\mu g.L^{-1}$, sendo que o sistema hormonal dos organismos é estimulado por baixíssimas concentrações de esteróides, da ordem de partes por bilhão (ppb) ou partes por trilhão (ppt), isto é, $\mu g.L^{-1}$ e $ng.L^{-1}$ respectivamente (Nogueira, 2003; Routledge et al., 1998).

Foram Purdon e colaboradores (1994) que deram os primeiros sinais de que os efluentes de ETEs são estrogênicos. Ele mostrou que trutas expostas por 10 dias a doses de 0,1 a 10ngmL^{-1} de 17α-etinilestradiol é forte indutor de vitelogenina (VTG), excedendo o efeito do estradiol. Com isso estudos similares na Alemanha, França, Estados Unidos, Inglaterra, Japão e Itália, foram feitos com peixes expostos a efluentes de esgoto doméstico e ou água de rio (Hylland e Haux, 1997).

Harris e colaboradores (Harris et al., 1996) realizaram novos estudos para determinar se a atividade estrogênica persistia a jusante do lançamento, em seis rios da Inglaterra, todos receptores de efluentes de ETEs e basicamente de origem doméstica. Para os testes foram utilizados trutas arco-íris onde os peixes machos foram expostos no ponto de descarga, por um período de três semanas. Foram coletadas e analisadas amostras de plasma dos peixes, onde verificou-se uma alta concentração de VTG (de 25mg.mL^{-1} até 52mg.mL^{-1}) nesses peixes, tornando evidente a atividade estrogênica ao longo do rio.

Snyder e colaboradores (Snyder, 1999) observaram que as carpas que viviam no Canal de Las Vegas (águas que abastecem o lago Mead, EUA) mostraram quantidades significativas de VTG no plasma de peixes. Os resultados mostraram que os estrogênios 17β-estradiol (natural) e o 17α-etinilestradiol (sintético) foram responsáveis pela atividade estrogênica da água do Lago Mead.

Pesquisas feitas por Solé (Solé et al., 2003) demonstraram que o estrogênio $17\beta - E2$ é um dos maiores responsáveis pela atividade estrogênica nos efluentes de ETEs. Estrogênios naturais também são encontrados em águas naturais, no solo e lodos biológicos em várias partes do mundo (Belfroid et al., 1999; Ternes et al., 1999; Lopez de Alda et al., 2001). Peterson e colaboradores (Peterson et al., 2000) relataram a presença de $17\beta - E2$ de 6 a 66 mgL^{-1} em águas subterrâneas próximas a áreas com

alta densidade de criação de animais.

De acordo com Thorpe e colaboradores (Thorpe et al., 2003), o $17\alpha - EE2$ foi encontrado em alguns ambientes aquáticos que receberam efluentes domésticos, sendo suficiente para induzir muitos dos efeitos relatados de feminização de peixes usados em testes de laboratórios e dos que vivem em seu habitat natural.

Estudos realizados por Folmar e colaboradores (Folmar et al., 2000) mostraram que etinilestradiol (EE2) é 10 vezes mais potente que estradiol (E2) para induzir VTG em peixes machos. Thorpe e colaboradores (Thorpe et al., 2003) investigaram a potência relativa de estrona (E1), estradiol (E2) e etinilestradiol (EE2), em peixes trutas juvenis que foram colocados por 14 dias sob a mistura binária de E2 e EE2, a fim de verificar a indução de VTG. Foi observado que a misutra foi mais potente do que os estrogênios individuais e que o EE2 é 11 a 27 vezes mais potente do que E2, e este é 33 a 66 vezes mais potente que E1.

Estudos realizados para detecção de 17β-estradiol em amostras coletadas em vários pontos de rios no estado de Maryland EUA, foram feitos por Dorabawila e Gupta (Dorabawila e Gupta, 2005). Os pontos eram localizados a montante e a jusante dos lançamentos de efluentes de ETEs. As concentrações variaram entre 1,9±0,4 até 2,0±0,9 ngL^{-1} nos pontos a montante da ETE, e entre 2,3±0,1 a 6,0±0,6 ngL^{-1} nos pontos a jusante da ETE. Nos açudes, as concentrações variaram entre 1,7±0,9 a 7,6±2,1 ngL^{-1}. Nos pontos de entrada das ETEs as concentrações variaram entre 18,9±2,7 a 71,2±1,5 ngL^{-1} e entre 6,5±0,3 a 53,1±1,7 ngL^{-1}.

Com respeito aos efeitos em seres humanos, há indícios quanto a exposição aos compostos estrogênicos em doses baixas por um tempo prolongado, onde os homens apresentaram redução na fertilidade e desenvolveram características secundárias do sexo feminino, como aumento das mamas. Existem também evidências de que o aumento da incidência de câncer de testículos e de outros males como a infertilidade masculina, podem estar relacionados com a ingestão de estrogênios por meio da alimentação ou da água. A exposição prolongada aos estrogênios também tem sido associada com o aumento da incidência de câncer de mama em mulheres (Lopes, 2007; Beck et al.,

2005).

Apesar de poucos trabalhos serem realizados com respeito aos efeitos dos hormônios na saúde humana, percebe-se um consenso entre a comunidade científica na busca de respostas quanto aos verdadeiros riscos que estes poluentes trazem para o homem.

1.9 Legislação

Ainda é pouco o conhecimento que se tem a respeito dos riscos provocados pelos hormônios nos seres vivos, e são quase inexistentes as normas que regulam a presença destes compostos no meio ambiente.

Nos EUA por meio da USFDA (United States Food and Drug Administration) houve a regulamentação de substâncias farmacêuticas no meio ambiente com base nos processos de revisão ambiental requerido por este orgão para aprovação de novos fármacos.

Na Europa existem algumas normas destinadas a avaliação do risco ambiental provocado pelos PPCPs (produtos farmacêuticos e de higiene pessoal) e interferentes endócrinos, porém em 2005 estas normas foram atualizadas, sendo regulamentado que produtos farmacêuticos ativos devem passar por avaliações de toxicidade crônica. A União Européia possui também uma diretriz, que orienta e estabelece níveis seguros de concentrações de substâncias farmacêuticas de uso veterinário no meio ambiente, que não devem exceder valores de $10 \mu g kg^{-1}$ no solo e 0,1 $ng.L^{-1}$ em efluentes.

No Brasil existe a resolução CONAMA n∘ 357 de 17 de março de 2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. Esta resolução estabelece os níveis de alguns compostos químicos que podem estar presentes nos corpos d'água, porém não estabelece concentrações permitidas dos hormônios tanto em águas superficiais, subterrâneas, entre outras.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

Durante as últimas décadas, o número de produtos químicos que entram no meio ambiente tem aumentado consideravelmente. A quantidade destes compostos, hormônios e resíduos farmacêuticos tem se tornado um motivo de preocupação devido a eles poderem exercer atividade biológica em organismos não-alvos e serem prejudiciais para o ecossistema e a saúde humana, através de alimentos e águas contaminadas (Ghiselli, 2006).

A ocorrência de hormônios e resíduos farmacêuticos tem sido relatada cada vez mais em águas residuais (Kummerer, 2009; Lopez de Alda et al., 2003), águas superficiais ou subterrâneas (Vulliet et al., 2008) e água potável (Loos et al., 2009; Jones et al., 2005). Com isso vem crescendo a preocupação da comunidade científica com respeito a essas classes de contaminantes, no que diz respeito aos verdadeiros efeitos que estes causam ao meio ambiente, assim como, em determinar as concentrações destes compostos em diferentes matrizes.

O número de trabalhos desenvolvidos para a deteção dessas substâncias em diferentes matrizes, e a utilização de diferentes técnicas empregadas para a detecção, também vem aumentando. A técnica utilizada para a detecção de hormômios em matrizes ambientais tem sido a cromatografia a gás/líquida acoplada a espectrometria de massas, porém nos últimos tempos em busca de melhores resultados, técnicas mais sensíveis e precisas vem tomando espaço, dentre as quais está a cromatografia líquida acoplada a

espectrometria de massas entre outras que serão mencionadas no decorrer do texto.

Segundo Kuster e colaboradores (Kuster et al., 2009) o ambiente é correntemente exposto a uma grande variedade de produtos químicos sintéticos (isto é, de uso industrial, medicinal) os quais tem potenciais efeitos adversos sobre o meio ambiente. Além disso, as zonas de elevada densidade populacional representam altas emissões locais destas substâncias químicas, que podem levar a consequências mais agravantes. Os compostos estrogênicos que acabam em água ambiental, afetam diretamente os organismos vivos, interferindo no seu metabolismo endócrino. A avaliação da presença desses compostos no ambiente exige métodos analíticos sensíveis e seletivos. Dezenove compostos estrogênicos pertencentes a diferentes classes (5 estrogênios livres, 6 estrogênios conjugados, 3 progestógenos e 5 fitoestrógenos) foram estudados por Kuster e colaboradores, sendo que a metodologia analítica desenvolvida foi baseada em extração em fase sólida, seguida por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas para verificar a ocorrência dos analitos mencionados acima, em águas do estado do Rio de Janeiro. Devido à insuficiente infra-estrutura na região, as águas residuais são liberadas no meio ambiente sem ou com tratamento prévio incorreto. Os resultados do trabalho mostraram altos níveis de fitoestrogênios, daidzein, coumestrol e genisteína de até $366 ng.L^{-1}$, e de progesterona de até $47 ng.L^{-1}$ na água do rio. O método mostrou bom desempenho com recuperações acima de 80% e limites de detecção $\leq 2 ngL^{-1}$.

Gabet-Giraud e colaboradores (Gabet et al., 2010) desenvolveram e validaram um método analítico por LC-MS/MS para quantificação de estrogênios em lodo de esgoto. Os passos de extração e purificação foram otimizados, assim como o efeito matriz. O método consistiu na extração acelerada por solvente (ASE) com uma mistura de solventes água/metanol, (80/20), v/v a 100°C seguida por duas purificações consecutivas em cartuchos Oasis HLB e Florisil. As recuperações foram determinadas em dois níveis de adição variando entre 86 e 126 %, dependendo da molécula. A repetitividade foi avaliada em cinco replicatas da mesma amostra de lodo fortificada em dois níveis diferentes, e a medição de estrogênios foi realizada em triplicata em doze amostras de lodo. Os desvios padrões relativos obtidos estiveram entre 2 e 27 %. A reprodutibilidade foi

analisada no mesmo lodo em quatro dias diferentes; o desvio-padrão relativo esteve entre 14 e 20 % de E1, βE2 e E3. Para o αE2, a reprodutibilidade observada não foi significativa. A sensibilidade do método foi avaliada levando em conta a sensibilidade instrumental e da matriz, e os limites de quantificação estimados foram de cerca de $1ng.g^{-1}$ para E1, entre 2 e $4ng.g^{-1}$ para αE2, βE2 e E3, e em cerca de $5ng.g^{-1}$ para EE2.

No estudo realizado por Nieto e colaboradores (Nieto et al., 2008) foi apresentado um método de cromatografia líquida com extração a líquido pressurizado (PLE/LC-MS/MS) para determinar um grupo de estrogênios e estrogênios conjugados em lodo de esgoto. No sistema LC-MS/MS, ionização eletrospray e analisador triplo quadrupólo foram utilizados, sendo que o monitoramento da reação permitiu que baixos níveis dos analitos alvos fossem detectados. Todas as recuperações encontradas foram acima de 81% exceto para estrona 3-glucuronida e estradiol 17-glucuronida que não foram detectadas. A repetitividade e a reprodutibilidade neste estudo foram menores que 6 e 9% respectivamente e o método desenvolvido permitiu que os analitos alvos fossem quantificados em níveis de $\mu g.kg^{-1}$. Os limites de detecção foram inferiores a $26\mu g.kg^{-1}$ para o lodo de esgoto seco, exceto para o 17α-estradiol, 17β-estradiol, 17α-etinilestradiol e acetato de estradiol, cujos valores foram entre 150 e $175\mu g.kg^{-1}$.

Em Esperanza (2007) foi determinado o destino de sete hormônios sexuais: estrona (E1), estradiol (E2), estriol (E3), etinilestradiol (EE2), testosterona, androstenediona e progesterona em duas estações de tratamento de esgoto em escala piloto, operada sob condições convencionais. Foram determinados os níveis de hormônios em matrizes líquidas e sólidas. Cada uma das estações consistia das seguintes etapas, clarificação primária seguida por um tanque de aeração em três estágios e uma clarificação final. Ambos os procedimentos analíticos, matrizes líquidas quanto sólidas foram quantificados via GC/MS e os limites de detecção para as matrizes líquidas foram de $1ng.L^{-1}$ para estradiol, etinilestradiol, estriol e de $2ng.L^{-1}$ para a estrona, testosterona, androstenediona e progesterona. Para as matrizes sólidas o LD encontrado foi de 5ng/g para estradiol, estinilestradiol e estriol e de $10ng.g^{-1}$ para a estrona, testosterona,

androstenediona e progesterona.

No trabalho de Kuster (2008) foi investigado a presença de 21 contaminantes emergentes de vários grupos químicos (7 estrogênios, 7 progestogênios, 6 farmacêuticos e produtos de higiene pessoal e 5 pesticidas ácidos) na bacia do rio Llobregat (Espanha). As análises químicas empregadas foram SPE-LC-MS/MS on line para estrogênios, progestogênios e pesticidas e para os produtos de higiene pessoal foi utilizado SPE-LC-MS/MS off-line. Os limites de detecção do método (em $ng.L^{-1}$) foram $\leq 0,85$ para estrogênios, $\leq 3,94$ para progestogênios, ≤ 30 para produtos de higiene pessoal, e $\leq 0,99$ para pesticidas. Dos estrogênios e progestogênios analisados, somente estrona sulfato-3, estrona, estriol e progesterona foram encontrados.

Lopez de Alda e colaboradores (Lopez de Alda et al., 2003) comentaram em seu trabalho, a utilização do método LC-MS e LC-MS/MS, para a determinação de surfactantes alquifenólicos, hormônios sexuais esteróides e drogas em ambiente aquático. Considerações práticas com respeito a análise destes grupos de substâncias usando diferentes espectrômetros de massas (quadrupólo único, íon trap e instrumentos de triplo quadrupólo), interfaces, ionização e modo de monitoração são apresentados neste trabalho. Aspectos com relação a preparação da amostra, focando na aplicação de técnicas avançadas tais como imunoadsorventes, materiais de acesso restrito e materiais de impressão molecular, para extração/purificação de amostras ambientais aquáticas e extratos também são discutidos neste artigo.

Gineys e colaboradores (2010) desenvolveram um método analítico confiável, eficaz e sensível para a determinação de traços de hormônios esteróides (incluindo estrogênios, androgênios e progestagênios) e corticoesteróides em solo. Um método de preparação da amostra envolvendo extração a líquido pressurizado (PLE) e extração em fase sólida (SPE) foi desenvolvida para a determinação de seis esteróides e cinco corticoesteróides em solo, seguida por análise LC-MS/MS. As condições empregadas para a PLE envolveram acetona/metanol (50:50) como solvente extrator, a uma temperatura de 80°C, e ciclos de 5 minutos. A extração SPE foi baseada em uma fase polimérica aonde o efeito matriz residual se destacou, e o limite de detecção em solo foi de 0,08-0,89 ng/g

para esteróides e de 0,09-2,84 $ng.g^{-1}$ para corticoesteróides.

No trabalho de Nie e colaboradores (Nie et al., 2009) um método analítico altamente sensível e seletivo foi desenvolvido para a determinação simultânea de duas classes de produtos, incluindo estrona (E1), 17β-estradiol (E2), estriol (E3), 17α-etinilestradiol (EE2), 4-nonilfenol (NP) e bisfenol A (BPA) na fase líquida e sólida de lodo ativado. Os procedimentos de preparação da amostra, derivatização do extrato e a quantificação por GC/MS foram todos otimizados de forma eficaz para determinar os traços desses compostos, minimizando a interferência da matriz. O método desenvolvido mostrou linearidade de calibração, recuperação, precisão e limite de quantificação baixo para todos os compostos selecionados em ambas as fases, líquida e sólida. Para estrogênios esteróides e BPA os limites de quantificação variaram de 0,2 a 4,0 ng/L na fase líquida e de 1,2 a 10,0 $ng.g^{-1}$ na fase sólida, porém para o nonilfenol o limite foi de 30,3 ng/L e 188,7 $ng.g^{-1}$.

Resultado de dois anos de pesquisa com respeito a relação de agentes bioativos, incluindo hormônios naturais, xeno-hormônios e agentes farmacêuticos dentre eles seis hormônios sexuais femininos naturais, estradiol, estrona e o esteróide sintético etinilestradiol, no estuário de Scheldt (Bélgica-Holanda), foram estudados por Noppe e colaboradores (Noppe et al., 2007). As análises de amostras de água foram realizadas usando extração acelerada por solvente (ASE) e a detecção foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS/MS). As concentrações de detecção foram na faixa de $ng.L^{-1}$. E2 e βE2 (isômero β de E2) foram detectados em água e material em suspensão, considerando que as concentrações de EE2 estavam abaixo do limite de quantificação. E1 foi observado mais frequentemente, e em concentrações de até $10ng.L^{-1}$ em água e de até 0,84 $ng.g^{-1}$ em material em suspensão.

No trabalho de Pailler e colaboradores (Pailler et al., 2009) foram realizadas análises em quatro classes de medicamentos veterinários e humanos (sulfonamidas, tetraciclinas, analgésicos e hormônios) em água superficial e residual em Luxemburgo. Onze medicamentos foram selecionados incluindo quatro sulfonamidas, 2 tetraciclinas, 2 analgésicos e 3 hormônios (dois naturais, estrona e β-estradiol, e um sintético 17α-etinilestradiol).

As partes inovadoras do estudo foram referentes a extração simultânea de todos os produtos farmacêuticos mencionados. O método inclui pré-concentração por extração em fase sólida usando cartuchos Oasis HLB os quais deram resultados superiores em comparação com os cartuchos Chromabond C18 EC, Chromabond Easy e Bond Elut PLEXA. As análises para a investigação dos compostos farmacêuticos foram realizadas por HPLC acoplada a um espectrômetro de massas triplo quadrupólo (HPLC-MS/MS). Os limites de quantificação foram de $1ng.L^{-1}$, exceto para o β-estradiol ($2ng.L^{-1}$) e para o 17α-etinilestradiol (6ng/L). As taxas de recuperação variaram de 70 a 94 %, com desvio-padrão relativo entre 4 e 19 %.

Chiu e colaboradores (Chiu et al., 2009) realizaram a otimização de um método analítico para determinação de estrogênios esteróides em lodo através da minimização do tamanho da amostra, resultando em recuperações maiores que 84 %, desvio-padrão relativo menores que 3 % e os limites de detecção foram de 2,1-5,3 $ng.g^{-1}$. Este método utilizou três estágios para limpeza da amostra e a análise foi feita por LC-MS/MS para determinação de três estrogênios e estrona conjugada em lodo de esgoto.

Em Beck e colaboradores (Beck et al., 20080 é apresentado um novo procedimento analítico para extração e determinação de estrogênios naturais em solos, baseada na extração a líquido pressurizado e determinação por GC-MS. Foram testados 11 solventes, sendo que a acetona provou ser o extrator mais eficiente. A temperatura de extração ótima foi 60°C. Os extratos de solos tiveram que ser purificados e concentrados para ser realizada a extração em fase sólida com cartuchos tipo C18. Estes extratos foram secos, derivatizados com N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoro-acetamida antes de ser analisados por GC-MS. Recuperações de 79-103 % com desvios-padrões relativos $\leq$ 13 % mostraram a confiabilidade deste método. Além disso, a rapidez de extração e o uso de limite de detecção baixo ($1ng.kg^{-1}$), representaram uma melhora na análise de estrogênios em solos em comparação com procedimentos já estabelecidos.

No trabalho de Ingrand e colaboradores (Ingrand et a., 2003) são determinados dois hormônios sexuais, o 17β-estradiol e a estrona, e o estrogênio contraceptivo sintético, 17α-etinilestradiol em efluentes de estações de tratamento de águas residuais. As amos-

tras foram extraídas via extração em fase sólida usando cartuchos C18. Os extratos em acetato de etila foram então purificados por uma separação líquido-líquido com cloreto de sódio aquoso e em seguida foi realizado um clean-up em cartucho Florisil. Os esteróides foram analisados usando um sistema íon-trap LC-MS/MS. A quantificação interna com os esteróides deuterados correspondentes levou a limites de quantificação de 5ng/L para estrona e 10ng/L para estradiol e etinilestradiol. Em água mineral enriquecida, as recuperações foram de 91 % para 17β-estradiol, 97 % para estrona e 87 % para 17α-etinilestradiol e desvio-padrão relativo de 15 % para o 17β-estradiol, 11 % para estrona e 23 % para 17α-etinilestradiol.

Ocorrência e remoção eficiente de vinte produtos farmacêuticos e produtos de cuidados pessoais (PPCPs) incluindo antibióticos e hormônios, foram investigados em cinco estações de tratamento de águas residuais de Ulsan, na maior cidade industrial da Korea (Behera2011). Os compostos foram extraídos das amostras de águas residuais por extração em fase sólida (SPE) e analisados por HPLC-MS/MS. Os resultados mostraram que acetaminofeno, atenolol e lincomicina foram os principais poluentes individuais usual-
mente encontrados em concentrações de $10\mu g.L^{-1}$ no afluente de esgoto. Nas ETAs, as concentrações do analgésico acetaminofeno, estimulante cafeína, hormônios estriol e estradiol diminuiu cerca de 99 %.

Isobe e colaboradores (Isobe et al., 2003) determinaram estrogênios esteróides e seus conjugados em amostras aquosas. Os analitos de quinze compostos foram extraídos por fase sólida e fracionados em duas frações: uma contendo esteróides não conjugados (livres) e a outra contendo conjugados (sulfatos e glucuronidase). A identificação e a quantificação foi realizada usando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. As recuperações de cada um dos compostos variaram de 57 a 116 % e a reprodutibilidade representadas como desvio-padrão variaram de 2,9 a 17 %.

No trabalho de Koh e colaboradores (2007) foram determinados quatro hormônios esteróides e um esteróide conjugado (estrona 3-sulfato) em esgotos. O método utilizado foi LC-MS/MS seguido de extração em fase sólida e dois estágios de clean-up, encon-

trando limites de detecção de 0,2 $ng.L^{-1}$ para estriol, 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol, e 0,1 $ng.L^{-1}$ para estrona e conjugados. A pesquisa demonstrou que o uso adequado de clean-up e padrões internos deuterados, faz com que o impacto do efeito matriz na ionização possa ser superado para determinar estrogênios em concentrações ambientais relevantes. A robustez do método foi demonstrada, atingindo recuperações maiores que 83 % para todos os esteróides em esgoto e amostras de efluentes finais com desvio-padrão de 0,5-12 %.

Sodré e colaboradores (Sodré et al., 2010) desenvolveram e validaram um método sensível e específico para a determinação de estrogênios e xenoestrogênios em águas superficais usando LC-MS/MS. A separação cromatográfica foi realizada usando soluções de hidróxido de amônia em água e em metanol como fase móvel. Os compostos foram determinados por um espectrômetro de massas triplo quadrupólo, ionização eletrospray, operando no modo negativo. As condições de monitoramento de reação múltipla foram utilizadas para estrona, 17β-estradiol, estriol, 17α-etinilestradiol, bisfenol A, 4-n octilfenol e 4-n nonilfenol. O método foi linear de 0,1 $ng.L^{-1}$ a 10$\mu g.L^{-1}$. Os limites de quantificação variaram entre 0,1 e 3,1 $ng.L^{-1}$ e recuperações de 50 $ng.L^{-1}$ em solução de água de superfície fortificada variaram entre 72 a 140 %. O método foi usado para determinar níveis de estrogênios e xenoestrogênios em amostras de águas no Brasil coletadas ao longo do Rio Atibaia, no estado de São Paulo. As concentrações de estrogênios variaram de 22 a 39 $ng.L^{-1}$, sendo bisfenol A o composto detectado mais frequentemente, bem como os xenoestrogênios em concentrações de 25 a 84 $ng.L^{-1}$.

Em Ternes e colaboradores (Ternes et al., 2002), dois métodos foram desenvolvidos para determinação de estrogênios abaixo de 2 $ng.g^{-1}$ em lodo digerido e ativado de estações de tratamento de esgoto doméstico e abaixo de 0,2 $ng.g^{-1}$ em sedimentos de água doce. O método consistiu de extração com solvente, um passo de clean-up por cromatografia em permeação gel (GPC), em coluna de silica gel de 1g, e finalmente detecção por GC-MS/MS dos estrogênios sililados com MSTFA. Para sedimentos, a extração com solventes foi sucessivamente seguida pelo clean-up com silica gel, enriquecimento da fase sólida (SPE) e um clean-up HPLC antes da derivatização e detecção por

GC-MS/MS. As médias das recuperações dos estrogênios ultrapassaram 70 % em lodo e 90 % em sedimentos. Em lodo de esgoto ativado e digerido, estrona e 17β-estradiol foram detectados até 37 $ng.g^{-1}$ e 49 $ng.g^{-1}$, respectivamente, e 17α-etinilestradiol até 17 $ng.g^{-1}$. A ocorrência de estrogênios em lodo digerido indica que estrogênios podem ser persistentes durante a digestão do lodo. Em sedimentos de rios, estrona e 17β-estradiol foram detectados até 2 $ng.g^{-1}$, e o contraceptivo 17α-etinilestradiol foi encontrado com um máximo de 0,9 $ng.g^{-1}$.

Um método de cromatografia líquida de rápida resolução e sensível com espectrometria de massas (RRLC-MS/MS), combinada com extração em fase sólida, extração ultrassônica e clean-up com cartucho de silica gel, foi desenvolvido por Liu e colaboradores (Liu et al., 2011), para determinar 28 tipos de esteróides incluindo 4 estrogênios (estrona, 17α-etinilestradiol, 17β-estradiol, dietilstilbestrol), 14 androgênios, 5 progestagênios entre eles progesterona e norgestrel, e 5 glucocorticóides em água superficial, água residual e em amostras de lodo. As recuperações em água superficial, afluentes e efluentes e amostras de lodo foram de 90,6-119 %, 44-200 %, 60,7-123 % e 62,6-138 %, respectivamente. Os limites de detecção do método para os 28 analitos foram de 0,01-0,24 $ng.L^{-1}$ em água superficial, 0,02-1,44 $ng.L^{-1}$ (afluentes), 0,01-0,49 $ng.L^{-1}$ (efluentes) e 0,08-2,06 ng/g (amostras de lodo). O método foi aplicado em duas estações de tratamento de águas residuais (ETA Milhu e Huiyang) em Guangbong (China).

Como já mencionado, as análises ambientais de estrogênios e progestagênios em concentrações ativas fisiologicamente (faixa abaixo de $ng.L^{-1}$) requer o uso de métodos muito sensíveis e seletivos, os quais em muitos casos, fazem necessário um passo de extração e purificação. No estudo de Lopez de Alda e colaboradores (Lopez de Alda et al., 2001) são relatados procedimentos para a determinação de vários estrogênios (estriol, estradiol, etinilestradiol, estrona e dietilstilbestrol) e progestogênios (progesterona, noretinolrona e levonorgestrel) em matrizes ambientais incluindo água e sedimento de rio. As análises finais dos compostos padrões foram realizadas por cromatografia líquida de fase reversa com espectrometria de massas e detecção por arranjo de diodos, além disso fez-se o uso da extração em fase sólida. Para o SPE off-line de amostras de água, um

cartucho tipo seringa LiChrolut RP-18 (500mg) foi selecionado para uso com o instrumento de preparação de amostras automatizado. Para o SPE on-line o cartucho GP de resina HySphere foi selecionado para ser usado com o sistema Prospekt.

Zorita e colaboradores (Zorita et al., 2009) estudaram a ocorrência e a taxa de remoção de 7 produtos farmacêuticos, 2 metabólitos, um produto de degradação e 3 estrogênios (17α-etinilestradiol, 17β-estradiol, estrona) na entrada e saída de uma estação de tratamento de esgoto terciária na Suécia. A técnica usada para a preparação da amostra e para a determinação dos hormônios esteróides, foi a extração líquido-líquido com membrana microporosa. Os extratos foram derivatizados com N-metil-N-trifluoroacetamida (MSTFA). e analisados por um cromatógrafo a gás Agilent equipado com detector de espectrometria de massas 5973-N. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização de impacto de elétrons. A quantificação dos analitos foi realizada usando o método de adição padrão.

No trabalho de Labadie e colaboradores (Labadie et al., 2005) foram determinadas as concentrações de esteróides hormonais conjugados e não conjugados (estrona, 17β-estradiol, estriol, 17α-etinilestradiol, mestranol, progesterona, noretindrona e D-norgestrel) em efluentes da estação de tratamento de esgoto Eysines (próxima a Bordeaux, França), e ao longo do rio Jalle dÉysines. A técnica analítica utilizada foi a extração em fase sólida seguida pela análise por GC/MS. Estrona foi o composto dominante (detectada em todas as amostras de efluentes, 17,1-71,0 $ng.L^{-1}$), enquanto estradiol e seus metabólitos estriol foram detectados algumas vezes em níveis baixos (4,4 e 2,9 $ng.L^{-1}$). As recuperações de todos os analitos foram de cerca de 70% (72-91%) e os limites de detecção estiveram na faixa de 0,4-1,9 $ng.g^{-1}$.

Hu e colaboradores (Hu et al., 2005) aperfeiçoaram um método LC/MS para analisar quatro estrógenos, 17β-estradiol (E2), estriol (E3), estrona (E1) e etinilestradiol (EE2) em águas ambientais. A quantificação foi realizada no modo de ionização negativa usando o monitoramento do íon selecionado. Os limites de detecção instrumental foram de 20-30 $ng.L^{-1}$ para os quatro analitos. Em água Milli-Q, as recuperações foram de 72-81%, as quais foram similares as encontradas em água de rio com os cor-

respondentes estrogênios deuterados. Os limites de detecção em água de rio foram de 0,1-0,2 $ng.L^{-1}$. O método desenvolvido foi usado para detectar resíduos de estrogênios no rio Tonghui, que recebe água da estação de tratamento de esgoto de Beijing, sendo detectados 1,1 $ng.L^{-1}$ de E1 e 0,2 $ng.L^{-1}$ de E2.

Estudo realizado por Zheng e colaboradores (Zheng et al., 2011), estabeleceram um método para determinar quatro estrogênios incluindo estriol, 17β-estradiol, 17α-etinilestradiol e estrona em água. O método consistiu de extração em fase sólida (0,5 L de água) e subsequente análise dos analitos por cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) com detector de ultravioleta (UVD). As recuperações obtidas foram maiores que 88% e os limites de detecção estiveram na faixa entre 12,5-23,7 $ng.L^{-1}$ para os quatro estrogênios, com desvio-padrão de 7 a 11%.

Cordeiro (Cordeiro, 2009) determinou o hormônio natural 17β-estradiol e os hormônios sintéticos levonorgestrel e 17α-etinilestradiol nas águas da Represa Municipal de São José do Rio Preto (SP), utilizando como método de extração a técnica de extração em fase sólida, e a técnica analítica HPLC-FLU-DAD. Os limites de detecção e de quantificação foram de 25 e 100 $ng.L^{-1}$ para o 17α-etinilestradiol; de 100 e 150 $ng.L^{-1}$ para o 17β-estradiol e de 50 e 150 $ng.L^{-1}$ para o levonorgestrel, respectivamente.

Capítulo 3

Técnicas cromatográficas de determinação de hormônios esteróides

A análise de traços de compostos orgânicos em água pode ser considerada como um dos maiores desafios da química analítica. Dentre estes, os compostos os hormônios sexuais femininos tem recebido atenção, devido a estes serem encontrados no meio ambiente em concentrações da ordem de $ng.L^{-1}$ (Lopez de Alda et al., 2001).

Devido à dificuldade de identificação desses microcontaminantes, muitos métodos analíticos foram desenvolvidos para detectar e quantificar essas substâncias em matrizes ambientais complexas, tais como águas superficiais e subterrâneas, esgoto bruto, efluentes de ETEs, sedimentos marinhos, solo e lodo biológico (Queiroz, 2011).

Das diversas técnicas existentes para a quantificação desses compostos destacam-se as que empregam cromatografia de fase líquida ou fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (Queiroz, 2011). Neste trabalho foi utilizado a cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). Estes procedimentos denominados de técnicas de extração, tem como objetivo diminuir os interferentes presentes na matriz, além de garantir a longevidade das colunas analíticas e concentrar os compostos de interesse a

níveis detectáveis pelos instrumentos utilizados.

3.1 Extração em fase sólida

Até recentemente a técnica analítica mais usada no preparo de amostras era a extração líquido-líquido. Esta se baseia na solubilidade relativa dos analitos presentes na amostra em dois solventes idealmente imiscíveis, sendo que esta técnica requer grandes volumes de solventes orgânicos, apresentando com isso elevado custo e de difícil automação (Araujo, 2006).

Em meados da década de 1970 uma nova técnica surgiu, a extração em fase sólida ou solid phase extraction (SPE). A SPE é uma técnica de separação líquido-sólida baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão. Esta técnica emprega cartuchos recheados com sorventes, nas formas de funil ou seringa. Um cartucho típico é formado por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50 a 500 mg do material sorvente, com 40-60 μm de tamanho de partícula, fixado em tubo através de dois filtros (Queiroz, 2011). Os mecanismos da extração em fase sólida (SPE) são:

Concentração dos Analitos

O objetivo é passar um grande volume de amostra pelo cartucho a fim de aprisionar somente o analito. Na etapa seguinte elui-se o analito de interesse com pequena quantidade de solvente. Este procedimento é comum para análises de amostras ambientais.

Isolamento do Analito (Clean-up)

Neste caso o objetivo não é de concentrar a amostra mas sim, isolar o analito de interesse dos interferentes da matriz. Um exemplo típico de aplicação do "clean-up" é na análise de agrotóxicos em alimentos.

Isolamento da Matriz

Neste procedimento o que se quer é reter na fase sólida os interferentes da matriz, em vez do analito de interesse.

Estocagem da Amostra

Este procedimento é bastante usado em análises de amostras que se encontram em locais distantes dos laboratórios. Neste caso é passada a amostra pelo cartucho no próprio local. Após este processo o cartucho é armazenado em baixas temperaturas e transportado até o laboratório analítico.

A FIG. 3.1 mostra as etapas envolvidas na extração em fase sólida:

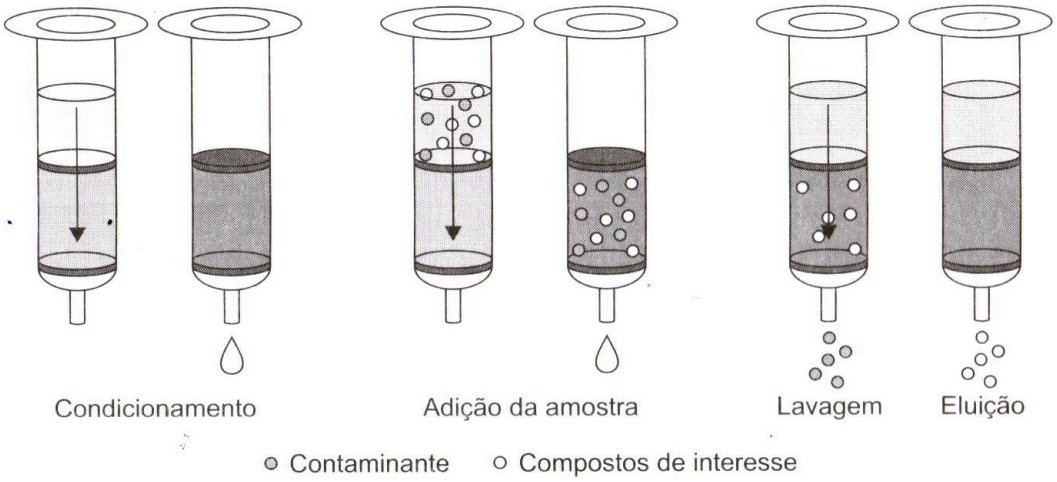

Figura 3.1: Principais etapas empregadas em SPE visando o isolamento de um composto ou classe de compostos (Lanças, 2004)

Condicionamento do Cartucho

Este passo destina-se a ativar o material existente dentro do cartucho. Um dos fatores mais importantes é não deixar que o material contido no cartucho seque, ou seja, não deixar que todo o solvente seja eliminado (deixa-se cerca de 2mm acima do material do empacotamento com solvente).

Adição da Amostra

Geralmente feita com pipeta, ou uma seringa, incluindo o manifold dependendo do volume de amostra. Idealmente esta etapa deve ser lenta, com fluxo inferior a 2mL por minuto, que pode ser controlado com o vácuo ou a pressão.

Remoção dos interferentes

Também conhecida como lavagem, visa eliminar os interferentes com um solvente

que não possua forção suficiente para arrancar o analito de interesse do material de empacotamento. O solvente ideal é o próprio solvente da amostra.

Eluição do Analito

O ideal é eluir o analito com um pequeno volume de eluente de forma que a solução coletada já se encontre em concentração apropriada para análise. Em geral, o solvente de eluição deve ter maior força de eluição que o solvente utilizado na etapa anterior.

Os mecanismos de separação da SPE, dependem da natureza do grupo ligado a sílica, ou do co-polímero, com isso a fase poderá ser apolar, polar ou trocador de íons. Os principais mecanismos de separação são: a adsorção, a partição (fase normal e fase reversa), troca iônica e exclusão por tamanho. Esses mecanismos estão associados a processos químicos, físicos e mecânicos que atuam durante a separação. Dentre as principais forças químicas atuantes entre as moléculas do analito e do sorvente destacam-se: forças iônicas, ligações de hidrogênio, interações do tipo dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido e dipolo induzido-dipolo induzido (forças de dispersão) (Lanças, 2004).

Com respeito ás fases sólidas utlizadas em SPE, atualmente existe uma variedade de sorventes empregados em cartuchos de SPE, e eles podem ser combinados com o objetivo de aumentar a seletividade da extração. Uma maneira de combiná-los é usar as chamadas fases mistas com vários grupos funcionais de características diferentes ligados ao mesmo suporte (Queiroz, 2011).

Na adsorção os sorventes mais usados são: a sílica, a alumina e o silicato de magnésio-florisil. A sílica gel possui uma superfície ligeiramente ácida, que permite a retenção de compostos básicos, enquanto a superfície básica da alumina é apropriada para a absorção de compostos de caráter básico.

A partição empregada na SPE surgiu para evitar problemas da adsorção irreversível que ocorre na utilização de adsorventes polares em análises de compostos altamente polares. Na partição o mecanismo ocorre de duas maneiras: fase reversa e fase normal. Na fase reversa, o sorvente é menos polar que o solvente de eluição; e na fase normal, o solvente é menos polar que o sorvente (Lanças, 2004).

A troca iônica por sua vez é empregada para o isolamento de analitos de caráter ácido ou básico, presentes em soluções aquosas. Os compostos básicos são retidos por intermédio de uma fase sólida, um trocador de cátions (SCX), enquanto os compostos ácidos são retidos por trocadores de ânions (SAX) (Lanças, 2004).

A exclusão por tamanho tem sido utilizada para eliminar compostos indesejáveis da amostra por intermédio de um mecanismo físico de separação similar a filtração.

Na SPE, os adsorventes são empregados para retêr os analitos de interesse, sendo os materiais como, sílica gel, alumina, silicato de magnésio (Florisil), carvão ativado, polímeros (estireno-divinil benzeno como XAD-2 e PRP-1) e fases baseadas em sílica quimicamente ligadas, os mais empregadas para esses fins (Lanças, 2004).

Os estudos visando desenvolver novas fases de SPE são constantes e um exemplo disso são as resinas poliméricas apolares as quais possuem como principal característica uma maior capacidade que a sílica, e seletividades normalmente superiores as obtidas com as fases derivadas de sílica. Além disso podem ser empregadas em toda a faixa útil de pH e com os mais diversos tipos de solventes. Essa resina também é caracterizada pelo seu tamanho de partícula pequeno (aproximadamente $85A^{\circ}$) quando comparada a outras fases de extração. O bom desempenho da resina PS-DVB se deve á sua alta hidrofobicidade e área superficial que pode atingir até 800 m^2g^{-1}, sendo seu mecanismo de retenção baseado em interações entre os grupamentos aromáticos da fase e dos compostos de estudo.

Lacey e colaboradores (Lacey et al., 2008) testaram os adsorventes Strata-X, Supelco C8, Supelco C18, OASIS HLB, Varian Focus, LiChrolut-EV para determinação de 20 fármacos em água residual e efluentes de tratamento de esgoto. O adsorvente escolhido foi o Strata-X.

No trabalho de Wille e colaboradores (Wille et al., 2010) foi testada a eficiência de diferentes adsorventes OASIS HLB, Strata-X, Chromabond HR-X, Bakerbond Speedisk para determinação de fármacos em água do mar. O adsorvente escolhido foi o Chromabond HR-X com recuperações maiores que 70%.

Em outro estudo, Hilton e colaboradores (Hilton et al., 2003) utilizaram diferentes

tipos de sorventes para a determinação de 13 fármacos em efluentes de tratamento de esgoto e água superficial. Eles utilizaram os cartuchos Isolute ENV, Isolute C18, Isolute C8, OASIS HLB e OASIS MCX, Varian Bond Elut e Phenomenex Strata-X. O cartucho com recuperações acima de 60% foi o Strata-X, e também foi considerado como o melhor extrator para a maioria dos compostos.

Vulliet e colaboradores (Vulliet et al., 2008) também utilizaram o cartucho Strata-X (adsorvente polimérico) para a extração simultânea de estrogênios (E1, αE2, β-E2, E3 e EE2) e sete corticoesteróides em águas residuais. A eluição foi realizada com metanol e a recuperação obtida para todos os analitos foi de 81%.

3.2 Cromatografia Gasosa

A cromatografia é hoje uma das técnicas modernas de grande destaque, devido à facilidade com que a separação, identificação e quantificação das espécies químicas é feita, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas, como a espectrometria de massas. O uso bastante acentuado da cromatografia a gás se deve também aos baixos limites de detecção que podem ser conseguidos. Dependendo do tipo de substância analisada e do tipo de detector, consegue-se detectar cerca de 10^{-12}g ou até menos.

A técnica usada em cromatografia gasosa é a eluição. Uma corrente de gás passa continuamente pela coluna e quando a amostra é vaporizada, é introduzida rapidamente nessa corrente de gás, onde ela é arrastada através da coluna. As substâncias presentes na amostra, depois de separadas, chegam ao detector, que gera um sinal para um sistema de registro de dados (Collins, 2009). O esquema básico de um cromatógrafo a gás é mostrado na FIG. 3.2.

Em um cromatograma ideal, os picos apresentam-se separados e simétricos, podendo haver sobreposição parcial dos picos devido a separação deficiente na coluna, ou a presença de picos com assimetria frontal ou caudas. A assimetria frontal está relacionada com um excesso de amostra injetada ou devido ao uso de colunas em uma temperatura abaixo do ideal para determinada análise. No caso das caudas, estas apa-

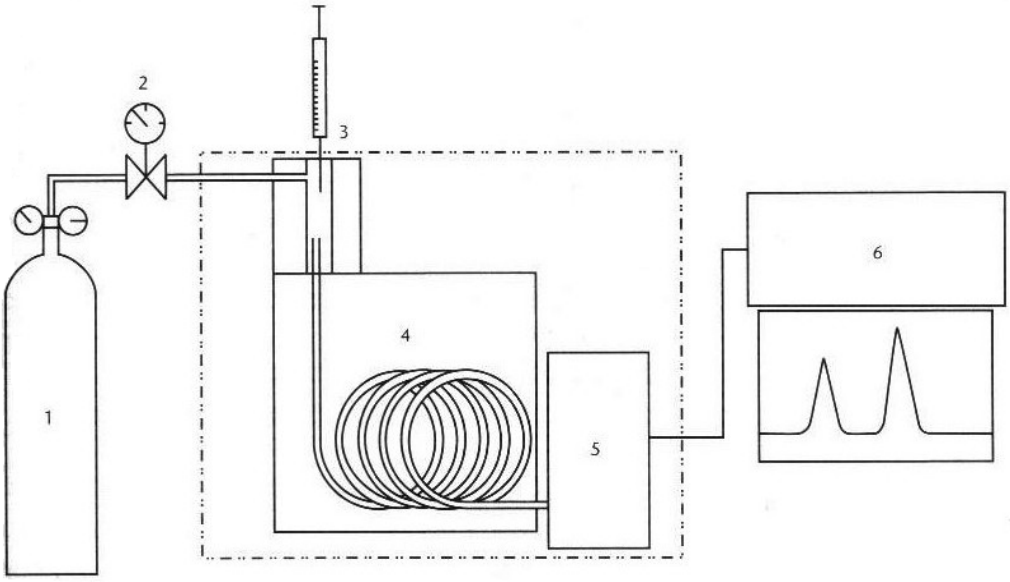

Figura 3.2: Esquema de cromatógrafo a gás: 1:fonte do gás de arraste; 2: controlador da vazão e regulador de pressão; 3: sistema de injeção da amostra; 4: coluna cromatográfica; 5: sistema de detecção; 6: sistema de registro e tratamento dos dados (Collins, 2009)

recem devido as falhas na técnica de injeção da amostra, ou devido a adsorção excessiva na fase estacionária ou suporte.

A programação da temperatura é significativamente importante em cromatografia gasosa, já que melhora a separação e diminui o tempo de análise. Ela consiste em começar a análise com a coluna em uma temperatura mais baixa, para que os solutos de baixo ponto de ebulição possam eluir como picos separados. Durante a análise, a temperatura da coluna é aumentada com o objetivo de diminuir a retenção de substâncias de maior ponto de ebulição (Collins, 2009).

As colunas utilizadas em cromatografia gasosa podem ser recheadas ou capilares. As colunas recheadas são constituídas preferencialmente com aço inoxidável ou vidro, com diâmetros internos de 1 a 4 mm, comprimento de 1 a 3 m e podem ser recheadas com uma fase estacionária sólida ou líquida. As colunas capilares são preparadas com capilares de sílica fundida de diâmetro interno de 0,10 a 0,75 mm e comprimento de 10

a 100 m. A fase estacionária pode ser espalhada, ou imobilizada na parte interna do capilar (Collins, 2009).

De acordo com o tipo de fase estacionária usada, a cromatografia pode ser classificada em cromatografia gás-sólido e cromatografia gás-líquido. Na cromatografia gás-sólida o mecanismo de separação baseia-se na adsorção e é utilizada na análise de gases permanentes e compostos polares de massa molar baixa. Já o mecanismo utilizado na cromatografia gás-líquido é a partição e corresponde a cerca de 95% das aplicações.

A eficiência de uma coluna é medida em termos de número de pratos, sendo que o prato corresponde a uma etapa de equilíbrio da substância entre a fase estacionária e a fase móvel, portanto, quanto maior o número de pratos, maior será a eficiência (picos mais estreitos). O número de pratos é dado por:

$$N = 16(d_R/w_b)^2, \tag{3.1}$$

onde: N=número de pratos; d_R=distância de retenção; w_b=largura do pico na linha da base.

Como se sabe as substâncias presentes na amostra passam através da coluna, onde são separadas e em seguida chegam ao sistema de deteção. Os detectores mais usados em cromatografia gasosa são o detector por condutividade térmica (TCD), detector por ionização em chama (FID), detector por captura de elétrons (ECD), detector termiônico e detector por espectrometria de massas (MS).

3.3 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas ou mass spectrometry (MS) é uma técnica analítica utilizada para identificar substâncias químicas, fornecendo informações qualitativas e quantitativas sobre a composição atômica e molecular de materiais inorgânicos e orgânicos (Vega-Bustillos, 2001).

Para análise por MS, as amostras podem ser inseridas diretamente no espectrômetro de massas, ou o equipamento pode ser acoplado a uma técnica de separação, como a cromatografia gasosa (GC), a cromatrografia líquida (LC) ou a eletroforese capilar. A possibilidade de automação aliada á rapidez das análises permite que grande número de amostras sejam analisadas em curto período de tempo (segundos ou minutos para cada amostra). Resumidamente, a análise por MS consiste na geração de íons com base em compostos (orgânicos ou inorgânicos) por meio de um método de ionização apropriado. Em seguida, os íons são separados por meio de sua relação massa-carga (m/z) em um analisador de massas e detectados qualitativamente e ou quantitativamente por meio de um detector, o qual "conta" os íons. A magnitude do sinal elétrico em função da razão m/z é convertida por um processador de dados, o qual gera o espectro de massas correspondente

Basicamente, os espectrômetros de massas possuem uma fonte e acelerador de íons, analisador de massas e detector de íons (FIG. 3.3). Neles, uma amostra de pressão de vapor moderada é introduzida num sistema de injeção operado sob vácuo (10^{-4} a 10^{-6} torr) e temperatura superior a 300 °C.

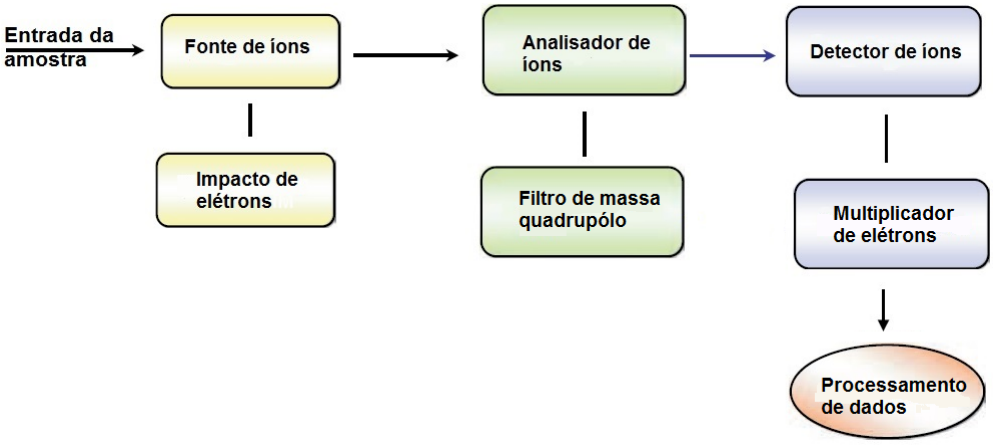

Figura 3.3: Esquema de um espectrômetro de massas, adaptado de (Collins, 2009)

Fonte de íons

Em um espectrômetro de massa a regra da fonte de íons é criar íons na fase gasosa.

Átomos do analito, moléculas, ou agregados são transferidos na fase gasosa e ionizados simultaneamente (como na ionização electrospray) ou separados. A fonte de íons depende muito da aplicação (Ekman et al., 2008).

As técnicas de ionização existentes são:

- Fotoionização a pressão atmosférica (APPI);
- Eletrospray (ESI);
- Ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI);
- Ionização química a pressão atmosférica (APCI);
- Ionização por impacto de elétrons (IE).

A ionização por impacto de elétrons foi introduzida em 1921 por Dempster, que a usou para medir isótopos de lítio e magnésio. A fonte de íons (IE) consiste de uma câmara com algumas aberturas como mostra a FIG. 3.4. As moléculas dos analitos são introduzidas diretamente na fonte. O feixe de elétrons é criado pelo aquecimento de um filamento, o qual passa diretamente através da fonte e é recolhido pela armadilha. O ímã produz um campo em espiral com os elétrons, aumentando com isso as chances das reações entre molécula-elétron. Sendo a massa do elétron significativamente menor que a massa de um íon qualquer, a intensidade do campo magnético não os afetam. Após as interações, um ou mais elétrons são removidos do analito criando íons moleculares com radicais positivos. Se o analito tiver elétrons com alta afinidade a íons negativos estes podem ser formados através da fixação de elétrons, embora o modo negativo seja limitado. Para íons positivos a energia do elétron é na maioria dos casos definida em 70 eV. Normalmente a entrada da amostra é regulada tal que as reações íons-moléculas sejam mínimas. Ionização por impacto de elétrons é uma fonte contínua, adequada para uso com analisadores do tipo quadrupólo e setor magnético (Ekman et al., 2008).

Analisador de massa

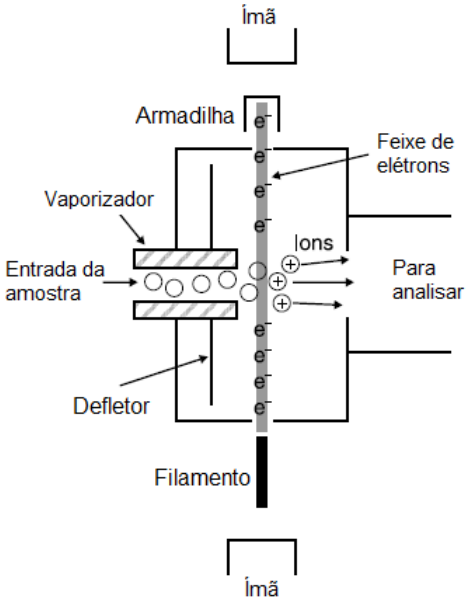

Figura 3.4: Esquema de uma fonte por impacto de elétrons (IE) (Collins, 2009)

Um analisador de massa é um equipamento que pode separar as espécies, isto é, átomos, moléculas de acordo com a sua massa. Todos os analisadores de massa utilizados na atualidade são baseados em eletromagnetismo e também são acoplados a uma fonte de íons. O analisador separa os íons advindos da fonte de íons de acordo com sua m/z. Há vários tipos de analisadores de massas usados em espectrometria de massas, dentre os quais podem ser citados o time-of-flight (TOF); setor magnético/elétrico; filtro de massa quadrupólo (Q); ion trap quadrupólo (QIT); orbitrap.

O filtro de massa quadrupólo é um equipamento relativamente pequeno se comparado com o magnético, que pode ser ajustado de forma que íons em uma faixa limitada de razão m/z sejam detectados. A trajetória dos íons com menor ou menor razão m/z é curvilínea. O princípio básico do filtro de massa quadrupólo foi publicado em 1953. O analisador emprega uma combinação de potencial de corrente direta (CD) e potencial de rádio frequência (RF). Quatro hastes paralelas são arranjadas simetricamente como mostra a FIG. 3.5.

Hastes opostas são conectadas eletricamente em pares. Os dois pares tem potenciais

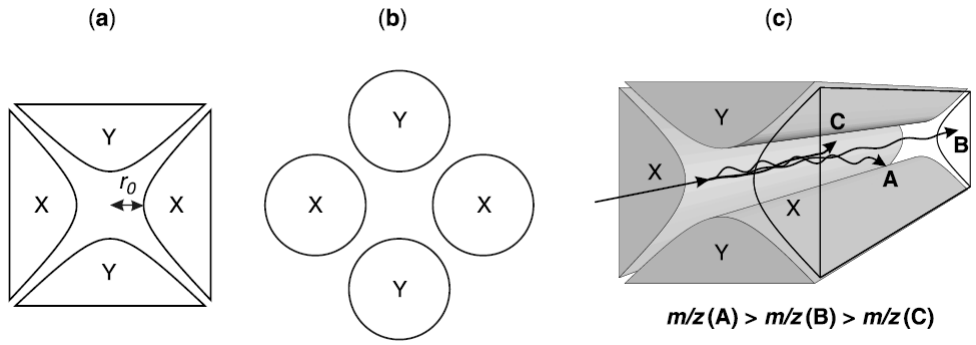

Figura 3.5: Esquema de um analisador quadrupólo. (a) Uma seção hiperbólica transversal; (b) seção transversal de uma haste cilíndrica; (c) o princípio de operação de um filtro de massa quadrupólo (Ekman et al., 2008)

da mesma magnitude, mas de sinais opostos. Íons emergentes da fonte, tipicamente acelerados sobre um potencial de 5 a 20 V, entram na região do analisador entre as hastes e passam paralalelamente por elas. Dependendo de certos valores de potenciais CD e RF e a frequência de RF, somente íons em uma estreita faixa de m/z irão ter uma trajetória estável através do quadrupólo. Íons que não tem uma trajetória estável irão colidir com as hastes, não chegando ao detector, isto pode ser visto na FIG. 3.5 item (c), onde o íon C tem m/z baixa e o íon A tem m/z alta, assim nenhum dos dois íons conseguem passar pelo filtro. No caso do íon B, ele possue m/z na faixa estável permitindo a passagem pelo filtro (Ekman et al., 2008).

Detector

Dois tipos de detectores são utilizados na espectrometria de massas. O Copo de Faraday (CF) e o Multiplicador de Elétrons (ME). A função do detector consiste em converter a energia das partículas que chegam do analisador em um sinal de corrente que é registrado por um equipamento eletrônico e transferido para o computador do sistema de aquisição do espectrômetro de massas. Quando uma partícula vinda do analisador colide com o detector, a anergia do impacto causa a emissão de partículas secundárias, por exemplo, elétrons e prótons. O número de partículas secundárias criadas pelo impacto dependem muitas vezes da energia e/ou da velocidade do íon de

entrada. Um detector deve preferencialmente ter alta eficiência em converter a energia do íon de entrada em elétrons e prótons, ter uma resposta linear, baixo nível de ruído, tempo de recuperação curto, e variações mínimas no tempo em trânsito (Ekman et al., 2008).

Um detector multiplicador de elétrons (ME) amplifica uma corrente fraca das partículas de entrada usando uma série de eletrodos de emissão secundária ou dínodos para produzir uma corrente consideravelmente alta no ânodo. Quando a partícula colide no dínodo, a energia é transferida diretamente para os elétrons no material dínodo e um número de elétrons secundários são emitidos. O dínodo muitas vezes consiste de uma liga alcalina ou um metal alcalino terroso com mais um metal nobre. Deste modo um fino filme isolante de metal alcalino oxidado é formado no suporte de condução. Um bom material dínodo deve emitir muitos elétrons secundários por partícula de entrada primária, ter ganho linear em correntes altas, e ter emissão termiônica baixa, isto é, baixo ruído (Ekman et al., 2008).

A obtenção dos cromatogramas em espectrometria de massas pode ser de dois tipos, um no qual o detector registra todos os íons obtidos, chamado de modo "SCAN", e outro em que apenas um pequeno número de íons (tipicamente 2 a 4) são selecionados para serem registrados, conhecido como modo monitoramento de íon selecionado ou Selected Ion Monitoring (SIM). A diferença entre esses dois modo de operação é fundamental na análise de matrizes com vários compostos em níveis traços. Em geral, utiliza-se o modo SCAN para obtenção de um espectro de massas individual de cada subtância que se espera encontrar em uma determinada matriz. A partir da avaliação desse espectro de massas, determinam-se os íons mais abundantes e característicos de cada substância para analisá-las no modo SIM na matriz real (Lopes, 2011).

Capítulo 4

Ferramentas Estatísticas para Análise dos Dados

Neste capítulo é abordado um conceito importante para os estudos de validação de métodos analíticos, a inferência estatística, a qual é uma parte da estatística, que tem por objetivo a coleta, redução, análise e modelagem dos dados, para então ser realizada a inferência para uma população da qual os dados (a amostra) foram obtidos. Este estudo faz com que o pesquisador tenha um grau de confiabilidade nas afirmações que faz para a população baseada nos resultados das amostras. Primeiramente será dado um enfoque a alguns conceitos básicos de estatística, para então entrar nos conceitos sobre inferência.

4.1 Variância e desvio padrão

Duas medidas de variação habitualmente utilizadas que levam em consideração o modo como todos os valores nos dados estão distribuídos são a variância e o desvio-padrão. Essas estatísticas medem a dispersão "média" em torno da média aritmética, isto é, como os valores mais altos flutuam acima dela e o modo como os dados mais baixos se distribuem abaixo dela.

A variância da amostra é portanto a soma das diferenças em torno da média

aritmética elevadas ao quadrado, dividida pelo tamanho da amostra menos 1:

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \overline{x})^2}{n-1} \tag{4.1}$$

onde $\overline{x}$ é a média aritmética, n é o tamanho da amostra e x_i é o i-ésimo valor da variável x.

O desvio-padrão da amostra é a raiz quadrada da soma das diferenças em torno da média aritmética elevadas ao quadrado, dividida pelo tamanho da amostra menos 1:

$$S = \sqrt{S^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \overline{x})^2}{n-1}} \tag{4.2}$$

4.2 Coeficiente de variação

É uma medida relativa de variação que é sempre expressa sob a forma de percentagem, e não em termos das unidades dos dados específicos. O coeficiente de variação (CV) mede a dispersão dos dados em relação a média aritmética, sendo dado por:

$$CV = \left(\frac{S}{\overline{x}}\right).100\% \tag{4.3}$$

onde S é o desvio-padrão e $\overline{x}$ é a média aritmética.

4.3 Escore z

Um valor extremo ou "outlier", é um valor localizado bem distante da média aritmética. Escores z são úteis no sentido de identificar valores extremos. Quanto maior o escore z, maior a distância do valor em relação a média aritmética. O escore z corresponde à diferença entre o valor e a média aritmética, dividida pelo desvio padrão (Levine et al., 2008), dado por:

$$Z = \frac{x - \overline{x}}{S} \tag{4.4}$$

4.4 Distribuição normal

Um dos modelos estatísticos mais importantes, talvez o mais importante, é a distribuição normal (ou gaussiana), que o famoso matemático Karl F. Gauss propôs no início do século XIX, para calcular a probabilidade de ocorrência de erros em medições.

Uma distribuição estatística é uma função que descreve o comportamento de uma variável aleatória. Uma variável aleatória é uma grandeza que pode assumir qualquer valor dentro do conjunto de valores possíveis para o sistema a que se refere.

A distribuição normal é portanto uma distribuição contínua, isto é, uma distribuição em que a variável pode assumir qualquer valor dentro de um intervalo previamente definido. Para uma variável normalmente distribuída, o seu intervalo é $(-\infty, +\infty)$.

Indica-se que uma variável aleatória x se distribui normalmente, com média μ e variância σ^2, como $x \approx N(\mu, \sigma^2)$ por:

$$f(x)dx = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} dx \tag{4.5}$$

4.5 Distribuição t de Student

No início do século XX, um estatístico que trabalhava para a Cervejaria Guinness queria realizar inferências sobre a média aritmética quando σ era desconhecido. Seu nome era William S. Gosset, porém como não era autorizado a publicar trabalhos de pesquisas fazendo uso de seu nome, ele adotou o pseudônimo de "Student" sendo a distribuição por ele desenvolvida conhecida como distribuição t de Student (Levine et al., 2008).

Se a variável aleatória X for distribuída nos moldes da distribuição normal, então a estatística abaixo tem uma distribuição t, com n-1 graus de liberdade:

$$t = \frac{\overline{x} - \mu}{\frac{S}{\sqrt{n}}}. \tag{4.6}$$

4.5.1 Graus de liberdade

O número de informação independentes da amostra dá o número de graus de liberdade ϕ da distribuição de t. Pode-se dizer que o número de graus de liberdade é igual ao número de informações independentes da amostra (n) menos o número (k) de parâmetros da população a serem estimados além do parâmetro inerente ao estudo, isto é, $\phi = n - k$ (Morettin e Bussab, 2002).

4.6 Teste de Hipóteses

Os testes de hipóteses são regras vinculadas a decisões que possibilitam avaliar, se determinadas hipóteses podem ser rejeitadas ou não.

No campo da inferência estatística, a busca por respostas acerca de certas características da população é de fundamental importância, pois apenas com base nessas características é que se devem estabelecer regras e tomar decisões sobre as hipóteses formuladas.

Para comparar duas populações por exemplo P_1 e P_2, deve-se basear em dados fornecidos por amostras destas populações. Em grande parte das técnicas utilizadas em estatística supõe-se que as variáveis aleatórias envolvidas tenham distribuição normal. Contudo, se essa suposição de normalidade for violada, procedimentos mais "robustos" têm de ser utilizados.

Em muitos casos a igualdade dos parâmetros que identificam a curva, implicam na igualdade ou coincidência das duas populações, sendo pouco provável que um mesmo fenômeno obedeça a formas de distribuições distintas. Porém o que pode ocorrer é seguir a mesma distribuição com parâmetros distintos.

Para que se possa realizar um teste de hipóteses é preciso formular algumas suposições sobre os parâmetros de certa população, isto é, formular hipóteses a respeito dessa população. Para isso faz-se o uso de duas hipóteses, uma chamada de hipótese nula (H_0), que é a hipótese que está sendo testada, e a outra chamada de hipótese alternativa (H_α, H_1) que é a que difere de H_0. Assim, primeiro testam-se as hipóteses,

para então ser tomada uma decisão entre as duas alternativas.

Os testes de hipóteses podem ser realizados utilizando as médias quanto as variâncias das amostras sendo o procedimento básico para realizá-lo descrito abaixo:

4.6.1 Procedimentos para se efetuar um teste de hipóteses

O procedimento padrão para a realização de um teste de hipótese é o que se segue (Morettin e Bussab, 2002):

- definem-se as hipóteses do teste H_0 e H_1;
- fixa-se o limite de erro α e identifica-se a variável do teste;
- levanta-se uma amostra de tamanho n;
- calcula-se o valor crítico, valor observado ou valor calculado, na amostra;
- determinam-se as regiões de aceitação (RA) e as regiões críticas (RC) em função do nível de α, pelas tabelas estatísticas;
- se o valor observado pertence á região de não rejeição, a decisão é a de não rejeitar H_0;
- se o valor observado pertence á região crítica, a decisão é a de rejeitar H_0.

4.7 Teste de hipóteses para populações normais com variâncias desconhecidas e iguais

Em muitos casos a variância das duas populações não são conhecidas sendo que as únicas informações que se tem são as médias aritméticas das amostras e as variâncias das amostras. Tomando que as amostras são selecionadas de maneira aleatória e indenpendente, estão distribuídas nos moldes da distribuição normal e sendo que as variâncias das populações são iguais ($\sigma_1^2 = \sigma_2^2$), o teste t com variância desconhecida

pode ser utilizado para determinar se existe uma diferença significativa entre as médias aritméticas das duas populações.

Para testar a hipótese nula de que não existe nenhuma diferença entre as médias aritméticas de duas populações independentes faz-se uso de, $H_0 : \mu_1 = \mu_2$ ou $\mu_1 - \mu_2 = 0$ contra a hipótese alternativa $H_1 : \mu_1 \neq \mu_2$ ou $\mu_1 - \mu_2 \neq 0$ utilizando a estatística do teste t de variância desconhecida dada por:

$$t = \frac{(\overline{x_1} - \overline{x_2}) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{S^2\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} \tag{4.7}$$

em que $S^2 = \frac{(n_1-1)S_1^2+(n_2-1)S_2^2}{(n_1+n_2-2)}$, sendo S^2 a variância desconhecida; $\overline{x}_1$ a média aritmética da amostra extraída da população 1; S_1^2 a variância da amostra extraída da população 1; n_1 tamanho da amostra extraída da população 1; $\overline{x}_2$ média aritmética da amostra extraída da população 2; S_2^2 variância da amsotra extraída da população 2 e n_2 tamanho da amostra extraída da população 2.

4.7.1 Procedimento para o teste de hipóteses para a média μ de uma população normal com σ^2 desconhecida

1) Enunciar as hipóteses:

   $H_0 : \mu = \mu_0$ e $H_1 :$ uma das alternativas

   $$H_1 : \begin{cases} \mu \neq \mu_0 (a) \\ \mu > \mu_0 (b) \\ \mu < \mu_0 (c) \end{cases}$$

2) Fixar o nível de significância α, admitindo-se que a variância populacional não é conhecida e a variável do teste será "t" de Student com $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade.

3) Com o auxílio da tabela da distribuição "t" determinar RA e RC.

4) Calcular o valor da variável t_{cal};

5) Conclusões:

a) Se $-t_{\frac{\alpha}{2}} \leq t_{cal} \leq t_{\frac{\alpha}{2}}$, aceita-se H_0.

Se $t_{cal} > t_{\frac{\alpha}{2}}$ ou $t_{cal} < -t\frac{\alpha}{2}$ rejeita-se H_0.

b)Se $t_{cal} < t_\alpha$, aceita-se H_0. Se $t_{cal} > t_\alpha$, rejeita-se H_0. c)Se $t_{cal} > t_\alpha$, aceita-se H_0. Se $t_{cal} < t_\alpha$, rejeita-se H_0.

4.8 Teste de hipóteses para populações normais com variâncias desconhecidas e diferentes

Se as populações são normais com σ_1^2 e σ_2^2 desconhecidas e diferentes e sendo $n_1 + n_2 \leq 30$, temos que:

$$t_{cal} = \frac{\overline{x}_d - \mu_{H_0}}{S_{\overline{x}_d}}, \tag{4.8}$$

onde $S_{\overline{x}_d} = \sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}$, portanto

$$t_{cal} = \frac{(\overline{x}_1 - \overline{x}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}, \tag{4.9}$$

com ϕ graus de liberdade dado por:

$$\phi = \frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1+1} + \frac{\left(\frac{S_2^2}{n_2}\right)}{n_2+1}} - 2. \tag{4.10}$$

4.9 Teste de hipóteses para a diferença entre duas variâncias

Para testar se duas populações independentes possuem a mesma variabilidade, testam-se as variâncias. Isto é importante pois é através desta análise que se esco-

lhe o teste a ser utilizado, teste t para variâncias iguais ou teste t para variâncias diferentes.

Como sabe-se que o teste t para a diferença entre as variâncias é baseado na fração entre as variâncias das duas amostras então se considerar que cada uma das populações é distribuída nos moldes da distribuição normal, a fração S_1^2/S_2^2 segue a **distribuição F de Snedecor** (Levine et al., 2008) dada por:

$$F_{cal} = \frac{S_1^2}{S_2^2} \tag{4.11}$$

com n_1-1 graus de liberdade no numerador e n_2-1 graus de liberdade no denominador.

O procedimento para a realização deste teste segue-se abaixo:

1) $H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2$

   $H_1 : \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$

2) Fixa-se α, a variável escolhida é a "F de Snedecor" com (n_1-1) graus de liberdade no numerador e $(n_2 - 1)$ graus de liberdade no denominador.

3) Com o auxílio da tabela de distribuição F, determinar RA e RC.

4) Calcula-se a variável F_{cal};

5) Conclusões:

   Se $F_{inf} \leq F_{cal} \leq F_{sup}$, aceita-se H_0.

   Se $F_{cal} > F_{sup}$, ou $F_{cal} < F_{inf}$, rejeita-se H_0.

4.10 Correlação e Regressão Linear

Considere a existência de uma variável quantitativa X a qual acredita-se apresentar alguma relação com uma outra variável quantitativa Y. A construção de um gráfico de dispersão dos valores de X versus os valores de Y, constitui uma ferramenta estatística

simples e muito útil, para investigar a existência de uma possível relação entre essas duas variáveis, sendo chamada de regressão linear (Estatística III, 2009).

Essa relação pode ser representada como:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i \tag{4.12}$$

em que β_0 é o intercepto de y para a população; β_1 é a inclincação da população; y_i é a variável dependente e x_i é a variável independente.

Contudo os valores observados não se encontram exatamente sobre esta linha reta (equação 4.12), ou seja, existe uma diferença entre o valor observado e o valor fornecido pela equação. Esta diferença é determinada **erro** e é representada por ϵ. Incorporando esse erro a equação 4.12 tem-se:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + \epsilon_i \tag{4.13}$$

que é denominado modelo de regressão linear simples.

Para verificar a relação linear entre as duas variáveis pode ser utilizado o modelo de regressão linear dado pela 4.13, sendo necessário para isso estimar os parâmetros desconhecidos β_0 e β_1 com base na amostra observada. Este método de estimação é denominado Mínimos Quadrados Ordinários (MQO ou SQ) e consiste em escolher β_0 e β_1 de modo que a soma dos quadrados dos erros $\epsilon_i (i = 1, \ldots, n)$ seja mínima. Da equação 4.13 tem-se que $\epsilon_i = y_i - \beta_0 - \beta_1 x_i$. Para minimizar esta soma, expressa por [63]:

$$SQ = \sum_{i=1}^{2} \epsilon_i^2 = \sum_{i=1}^{n} (y_i - \beta_0 - \beta_1 x_i)^2 \tag{4.14}$$

deve ser diferenciada com respeito a β_0 e β_1 e em seguida ser igualada a zero. Assim tem-se que os estimadores serão:

$$\widehat{\beta_0} = \overline{y} - \widehat{\beta_1}\overline{x}; \tag{4.15}$$

$$\widehat{\beta_1} = \frac{\sum_{i=1}^{n} y_i x_i - n\overline{yx}}{\sum_{i=1}^{n} x_i^2 - n\overline{x}^2}, \tag{4.16}$$

em que $\overline{y}$ é a média amostral dos $y_i's$ e $\overline{x}$ é a média amostral dos $x_i's$.

Os desvios $e_i = y_i - \widehat{y}_i (i = 1, \ldots, n)$ são denominados resíduos e são considerados uma amostra aleatória dos erros.

Fazendo uso do método dos mínimos quadrados para determinar os coeficientes de regressão é preciso calcular três importantes medidas de variação. A primeira é a soma total dos quadrados (STQ) que é a medida de variação dos valores de y_i em torno de sua média aritmética $\overline{x}$. A variação total por sua vez é subdividida entre variação explicada ou variação dos quadrados da regressão (SQReg) e a variação não explicada ou soma dos quadrados dos resíduos (SQR).

A soma dos quadrados da regressão ou variação explicada (SQReg) é igual a soma das diferenças ao quadrado entre o valor previsto de y e $\overline{y}$:

$$SQReg = \sum_{i=1}^{n} (\widehat{y}_i - \overline{y})^2. \tag{4.17}$$

A soma dos quadrados dos resíduos ou erros ou variação não explicada (SQR) é igual a soma das diferenças ao quadrado entre o valor observado y e o valor previsto de y:

$$SQR = \sum_{i=1}^{n} (y_i - \widehat{y}_i)^2. \tag{4.18}$$

Assim obtêm-se a soma total dos quadrados (STQ) que será dada pela soma das diferenças so quadrado entre cada valor observado de y e $\overline{y}$,

$$STQ = SQReg + SQR = \sum_{i=1}^{n} (y_i - \overline{y})^2. \tag{4.19}$$

No entanto fazendo somente o uso de SQReg, SQR e STQ, estas somas oferecem poucas informações para análise dos dados, porém o quociente das somas dos quadrados da regressão (SQReg) e a soma total (STQ) são ferramentas úteis. Este quociente é denominado coeficiente de determinação dado pela equação 4.20, variando de 0 a 1 (ou 0 a 100%) sendo que quanto mais próxima de 1 melhor o ajuste.

$$r^2 = \frac{SQReg}{STQ}. \tag{4.20}$$

O coeficiente de determinação também pode ser calculado utilizando o coeficiente de correlação de Pearson, dado por:

$$r = \frac{\sum(x_i - \overline{x})(y_i - \overline{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \overline{x})^2 \sum(y_i - \overline{y})^2}} = \frac{\sum x_i y_i - n\overline{x}\overline{y}}{\sqrt{[\sum x_i^2 - n\overline{x}^2]\,[\sum y_i^2 - n\overline{y}^2]}}, \tag{4.21}$$

sendo $\overline{x}$ e $\overline{y}$ as médias amostrais dos $x_i's$ e $y_i's$, respectivamente.

Além de utilizar o método dos mínimos quadrados para realizar regressão, e ver se há uma relação linear entre os dados, deve-se verificar se quatro pressupostos se adequam ao modelo de regressão escolhido. Esses pressupostos são a linearidade, independência dos erros, normalidade e igualdade das variâncias. Se nenhum desses pressupostos for violado, pode ser utilizado o teste t e o teste F para a inclinação da curva [63].

No caso do teste t para a inclinação, para determinar a existência de uma relação linear significativa entre as variáveis x e y, testa se β_1 é igual a zero. A hipótese nula e a hipótese alternativa são expressas como:

$$H_0 : \beta_1 = 0 \text{ (não existe nenhuma relação linear)}$$

$$H_1 : \beta_1 \neq 0 \text{ (há relação linear) .}$$

Se a hipótese nula for rejeitada há evidências de uma relação linear, sendo esta estatística dada por:

$$t = \frac{b_1 - \beta_1}{S_{b_1}}, \tag{4.22}$$

em que $S_{b_1} = \frac{Syx}{\sqrt{SQx}}$, $SQx = \sum_{i=1}^{n}(x_i - \overline{x})^2$ e $Syx = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \widehat{y}_i)^2}{n-2}}$.

Para o teste F para inclinação faz-se o uso entre a variância que é devido a regressão (MQReg) dividida pela variância do erro (MQR) [63]:

$$F = \frac{QMReg}{QMRes} \tag{4.23}$$

em que $QMReg = \frac{SQreg}{p-1}$ e $QMRes = \frac{SQR}{n-p}$.

Utilizando o nível de significância α, a regra de decisão é rejeitar H_0 se $F > F_S$, caso contrário não rejeita-se H_0. A tabela ANOVA (TAB. 4.1) abaixo organiza o conjunto dos resultados.

Tabela 4.1: Análise de Variância ANOVA

*(Estatística III, 2009)

Fonte de Variação	g.l.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio
Regressão	$p-1$	$SQ_{Reg} = \sum_{i=1}^{n} (\widehat{y}_i - \bar{y})^2$	$QM_{Reg} = \frac{SQ_{Reg}}{(p-1)}$
Resíduos	$n-p$	$SQ_{Res} = \sum_{i=1}^{n} (y_i - \widehat{y}_i)^2$	$QM_{Res} = \frac{SQ_{Res}}{(n-p)}$
Total	$n-1$	$SQ_{Total} = \sum_{i=1}^{n} (y_i - \bar{y})^2$	

p = número de parâmetros do modelo e n = tamanho amostral.

Capítulo 5

Validação de ensaio químico

Validar um sistema é dar ao mesmo validade, credibilidade, confiança. No caso da análise de substâncias químicas, a validação objetiva principalmente, assegurar que o sistema funcione adequadamente dentro das condições para as quais foi validado. Todo sistema tem suas limitações, assim o importante é que a validação conheça essas limitações e assegure que o sistema analítico apresente o desempenho esperado, dentro desses limites determinados no processo de validação,

Entre os fatores que influenciam a não exatidão e imprecisão do método pode-se citar a variabilidade da amostra, eventual contaminção, reagentes inadequados, pipetagem errada, variações de temperatura, variações e descuidos na manutenção dos equipamentos, além da calibração ineficiente (Lanças, 2004).

A importância da validação em análise química tornou-se mais acentuada a partir da constatação, na década de setenta, de resultados obtidos em análise toxicológica de amostras submetidas a estudos interlaboratoriais por orgão do governo americano. A partir dos resultados desses estudos, criou-se o sistema denominado ISO/IEC-25 (International Standardization Organization/International Electrotechnical Commission). O principal objetivo dessas organizações é a padronização das exigências a serem seguidas pelos laboratórios a fim de demonstrarem competência na realização dos serviços, assim como tornarem os resultados internacionalmente aceitos e passíveis de reprodução em outros laboratórios (Lanças, 2004). A partir dessas normas, cada país estabelece

seu próprio programa para assegurar a qualidade de serviços, mas sempre em concordância com as normas da International Standardization Organization/International Electrotechnical Commission.

No Brasil, há três agências para verificar a competência de laboratórios de ensaios; a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial), o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Estes orgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação, tais como a Resolução ANVISA RE n° 899, de 29/05/2003, o documento do INMETRO DOQ-CGCRE-008/04, de julho de 2011 e a Instrução Normativa n° 46 de 10 de junho de 2003 (INMETRO, 2011; ANVISA, 2003).

No presente trabalho, para a realização dos cálculos estatísticos envolvidos no processo de validação baseou-se na planilha eletrônica "Validação de Ensaios Químicos" desenvolvida por Furusawa (Furusawa, 2007), com embasamento no documento DOQ-CGCRE-008 do INMETRO de 2003 e sua revisão de 2007.

5.1 Seletividade

A seletividade é um parâmetro de grande importância na análise de amostras complexas, como resíduos de pesticidas em alimentos. Neste caso deve-se analisar várias alíquotas diferentes da mesma matriz de forma a determinar, inequivocamente, os componentes da matriz que interferem na determinação do analito de interesse. O termo seletividade tem sido empregado como sinônimo de especificidade, a despeito da objeção de alguns autores (Lanças, 2004).

De fato, o termo *específico* refere-se a um método que produz uma resposta para um único analito, enquanto o termo *seletivo* refere-se a um método que fornece resposta para um grupo de compostos ou elementos químicas. Se a resposta do composto de interesse é distinguível das outras respostas, o método é denominado seletivo. Na prática poucos métodos respondem a apenas um analito, fazendo com que o termo seletividade seja mais apropriado (Lanças, 2004).

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método. Algumas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos que não foram observados inicialmente, que podem coeluir com a substância de interesse (Ribani et al., 2004).

Uma forma simples de verificar a seletividade de um método cromatográfico é observar a presença de picos na região do tempo de retenção do analito de interesse, injetando-se um branco obtido com a mesma matriz a ser analisada. Nesse caso, deve-se empregar várias amostras, e a ausência de picos próximos ao tempo de retenção do analito de interesse deve ser observado (Lanças, 2004).

Teste de Seletividade

A matriz a ser analisada pode conter compostos que interferem no desempenho do detector, sem causar um sinal visível no teste de especificidade, tal como aumentar ou reduzir o sinal.

Para resolver esse problema pode-se aplicar testes estatísticos para verificar a variabilidade da amostra. Os testes utilizados são os testes de hipóteses (ver seção 4.6, de onde parte-se da hipótese nula em que a matriz não afeta o sinal e fazendo o uso também do teste F de Snedecor para quociente de variâncias e do teste t de Student para populações normais com variâncias desconhecidas e iguais, tiram-se as conclusões se a matriz afeta ou não o método.

Para realizar os testes preparam-se dois grupos de amostras, um com matriz e outro sem matriz, ambos com a concentração do analito idêntica em cada nível de concentração (sete concentrações para cada grupo). Cada uma das concentrações é injetada sete vezes no equipamento, sendo tomados os valores das áreas de cada pico correspondente a cada uma das concentrações, para posterior análise estatistíca.

5.2 Linearidade e Faixa Linear de Trabalho

A linearidade trata-se da capacidade de um método analítico de produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma dada faixa de concentração (Ribani et al., 2004). A faixa linear por sua vez, é definida como o intervalo entre os níveis superior e inferior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com precisão, exatidão e linearidade exigidas sob as condições especificadas no ensaio (Ribani et al., 2004).

Ela expressa a correlação na qual o sinal analítico medido (área ou altura do pico cromatográfico), denominado variável dependente y_i, é linearmente proporcional à concentração da substância a ser quantificada, denominada variável independente x_i. Essa correlação pode ser expressa matematicamente através de uma função matemática qualquer denominada curva analítica. O ajuste de qualquer equação matemática é feito pelo método dos mínimos quadrados, no qual a melhor curva será aquela que fornecerá o menor valor para a soma quadrática dos resíduos.

Para a construção da curva de calibração é necessário vários níveis de concentração, no mínimo cinco. O número de replicatas em cada nível de concentração deve ser o mais próximo possível daquele empregado na rotina do laboratório (INMETRO, 2011). Segundo (Lanças, 2004), o número mínimo de pontos geralmente aceito nos gráficos de calibração varia entre 5 e 6 pontos. Essas concentrações devem ser escolhidas de forma a cobrir uma faixa desde 50% até 150% do valor que se espera encontrar na amostra em estudo.

A equação que descreve uma curva analítica pode ser expressa por:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x, \tag{5.1}$$

onde, y_i é a resposta medida (altura ou área do pico), x é a concentração do analito, β_0 é o coeficiente linear (interseção da curva com o eixo y) e β_1 é o coeficiente angular (inclinação da curva).

Para que esta reta seja a melhor que se ajusta aos dados, deve-se minimizar a

soma das diferenças entre os valores de $f(x)$ tabelados (y_i) e os valores da curva de ajuste $\beta_0 + \beta_1 x + \epsilon$ em cada ponto. Assim, colhida uma amostra de n indivíduos, com n equações e n+2 incógnitas ($\beta_0, \beta_1, \epsilon_1, \epsilon_2, \ldots \epsilon_n$) é preciso encontrar os valores de β_0 e β_1 que minimizam a soma dos erros (ver seção 4.10). Feito isso constrói-se um gráfico dos resíduos estatísticos versus a concentração , onde estes resíduos devem estar distribuídos de forma aleatória entre valores positivos e negativos, não apresentando nenhuma tendência.

Além de ser possível calcular os coeficientes de regressão β_0 e β_1, é possível com o uso da regressão linear calcular o valor do coeficiente de correlacção r ou coeficiente de Pearson (ver seção 4.10). Este parâmetro permite avaliar a qualidade da curva obtida, e quanto mais próximo de 1 menor será a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,990 enquanto o INMETRO recomenda um coeficiente acima de 0,90.

O coeficiente angular da curva (β_1) também representa a sensibilidade do método. Quanto maior o ângulo de inclinação da reta, maior será a variação do sinal em relação a pequenas variações de concentração e maior será a sensibilidade do método (Gerolin, 2008).

A análise de resíduos, por meio do teste t (Student) pode ser aplicada para verificar a linearidade do método, uma vez que desvios de linearidade são difíceis de serem detectados visualmente (Souza, 2011). O teste F fazendo uso da análise de variância (ANOVA) também pode ser realizado para verificar a linearidade do método. O primeiro verifica a adequação do modelo de regressão adotado aos dados obtidos, com um determinado limite de confiança, enquanto que o segundo (teste F), verifica o quanto o modelo se ajusta ao conjunto de dados obtidos, com o mesmo limite de confiança. Este teste ainda faz uma avaliação da porcentagem de variação explicada e de porcentagem máxima de variação explicável (Souza, 2011).

5.3 Limite de Detecção e Quantificação

O limite de detecção (também dito limite inferior de detecção) é a menor quantidade de analito que "difere significativamente" do branco. Há um procedimento que produz um limite de detecção com 99% de chance de ser maior do que o branco. Isto é, somente 1% das amostras que não contêm o analito darão um sinal maior que o limite de detecção (ver FIG. 5.1) (Harris, 2007).

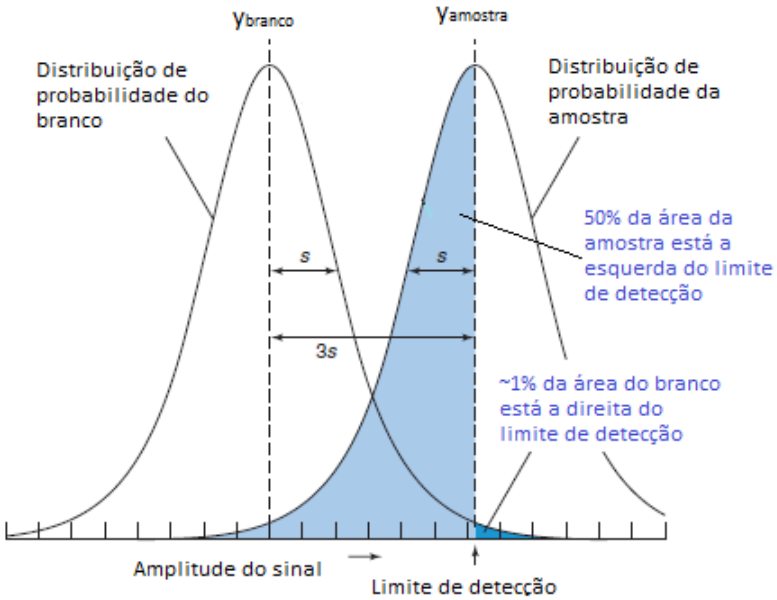

Figura 5.1: Limite de detecção (Harris, 2007)

Pela FIG. 5.1 percebe-se que as curvas mostram a distribuição das medidas esperadas para um branco, e de uma amostra cuja concentração se situa no limite de detecção, sendo a área de uma região proporcional ao número de medições da região. Percebe-se ainda que aproximadamente 1% das medidas do branco são esperadas exceder o limite de detecção, enquanto 50% das medidas para uma amostra contendo o analito no limite de detecção estarão abaixo do limite.

É assumido que o desvio padrão do sinal das amostras próximas ao limite de detecção sejam similares ao desvio padrão do branco. Abaixo segue o procedimento para encontrar o limite de detecção

- Depois de estimar o limite de detecção a partir de experiências, é preparada a amostra cuja concentração é de aproximadamente 1 a 5 vezes o limite de detecção.
- Medir o sinal de n replicatas das amostras ($n \geq 7$).
- Calcular o desvio padrão (s) das n medidas.
- Medir o sinal dos n brancos (sem o analito) e encontrar o valor médio, y_{branco}.
- O sinal mínimo detectável, y_{md}, é definido como:

$$y_{md} = y_{branco} + 3s, \text{ limite de detecção do sinal .} \tag{5.2}$$

- O sinal traduzido, $y_{amostra} - y_{branco}$, é proporcional a concentração na amostra:

$$y_{amostra} - y_{branco} = m \times \text{ concentração da amostra .} \tag{5.3}$$

onde $y_{amostra}$ é o sinal observado para a amostra e m é a inclinação da curva de calibração linear. A concentração mínima detectável é dita o limite de detecção, e é obtido pela substituição de y_{md} pelo $y_{amostra}$, isto é:

$$\text{Concentração mínima detectável} = \frac{3s}{m}. \tag{5.4}$$

Ou ainda pode-se calcular o limite de detecção pela multiplicação do desvio padrão em nosso caso das 7 replicatas de menor concentração da curva analítica, pela distribuição t de Student para (n-1) graus de liberdade, com 95% de confiança, como mostra a equação:

$$LD = t_{n-1,1-\alpha}.S \tag{5.5}$$

S é o desvio padrão das 7 replicatas de menor concentração e t é o valor da distribuição t de Student para (n-1) graus de liberdade.

Quando o sinal é três vezes maior que o ruído, ele já é detectável, mas ainda é muito pequeno para uma medida precisa. Um sinal que é 10 vezes maior que o ruído é

definido como o limite inferior de quantificação, ou a menor quantidade que pode ser medida com razoável precisão.

$$\text{Limite inferior de quantificação } \equiv \frac{10s}{m}. \tag{5.6}$$

Assim o limite de quantificação (LOQ) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e com uma fidelidade determinada. Essa fidelidade, na prática é aceita como um coeficiente de variação de até 10% e uma exatidão de ±10% [62], podendo ser dado por:

$$LQ = \overline{x} + (5, 6 \text{ ou } 10).S \tag{5.7}$$

$\overline{x}$ é a média das 7 replicatas da concentração do menor ponto da curva analítica e S é o desvio padrão das 7 replicatas da concentração do menor ponto da curva analítica.

5.4 Precisão

A precisão pode ser determinada em condições de repetitividade ou em condições de reprodutibilidade. O desvio padrão da reprodutibilidade é, usualmente, cerca de duas vezes maior que o da repetitividade. A precisão pode, também, ser expressa como precisão intradia ("intra-day" ou "within-day"), quando medida em um mesmo dia, ou como precisão interdias ("inter-days" ou "between-days"), quando medida ao longo de vários dias (Lanças, 2004).

A repetitividade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio de análise de padrões, material de referência ou adição do analito ao branco da amostra, em várias concentrações de trabalho. O número de replicatas para cada nível de concentração deve expressar a rotina do laboratório. É aconselhável calcular o limite de repetitividade (r) pois ele capacita o analista a decidir se a diferença entre as análises são significativas. O limite de repetitividade é dado por:

$$r = t_{(n-1,1-\alpha)}\sqrt{2}S, \tag{5.8}$$

onde S é o desvio padrão amostral associado aos resultados considerados para cada nível de concentração.

Em cromatografia a precisão é sempre determinada por intermédio da injecção de padrões analíticos, não de amostras desconhecidas. Pelo menos cinco devem ser injetadas para determiná-la.

A precisão tem sido medida pelo desvio padrão ou pelo coeficiente de variação. O procedimento usual para o cálculo envolve inicialmente a obtenção do quadrado da diferença entre cada valor medido (x_i) e a média, ou seja $(x_i - \overline{x})^2$. A somatória desses valores, dividida pelo número de medidas é denominado variância amostral,

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \overline{x}^2)}{n-1}. \tag{5.9}$$

Na prática a forma comum de expressão de pureza tem sido o coeficiente de variação CV (ver seção 4.2), e quanto menor o coeficiente de variação, mais preciso é o conjunto das medidas (Lanças, 2004), sendo dado por :

$$CV = \frac{S}{\overline{x}} \times 100. \tag{5.10}$$

Na revisão de mais de 150 estudos interlaboratoriais com diferentes analitos medidos por diferentes técnicas, foi observado que o coeficiente de variação dos valores médios relatados pelos diferentes laboratórios, aumentava quando a concentração do analito diminuía. Na melhor das hipóteses, o coeficiente de variação nunca pareceu melhor que a Curva de Horwitz , dada por (Harris, 2007):

$$CV(\%) \approx 2^{1-0,5logC}(\text{ Curva de Horwitz }) \tag{5.11}$$

onde C é a fração do analito na amostra (C=g analito/g amostra). O coeficiente de variação é mais ou menos de um meio a um terço da variação entre laboratórios.

Resultados experimentais da curva idealizada variam de aproximadamente 2 na direção vertical e de 10 na direção horizontal (Harris, 2007).

Quando a concentração de um analito é 1ppm, o coeficiente de variação entre laboratórios é 16% que corresponde a 2^4 do eixo vertical. Quando a concentração é 1ppb, o coeficiente de variação é 45%, que é dado rebatendo o valor do eixo horizontal para o eixo vertical. A distribuição Gaussiana nos diz que aproximadamente 5% das medidas estão acima de $\overline{x} + 1,65S$. Se o nível alvo permitido do analito é 1ppb, a quantidade permitida observada será de $1 + 1,65 \times 0,45ppb$, ou 1,7ppb. Este nível nos da uma taxa de 5% de falso positivo que excede o valor permitido mesmo que os valores verdadeiros estejam abaixo de 1ppb (Harris, 2007). Estes cálculos podem ser melhores entendidos observando a FIG. 5.2.

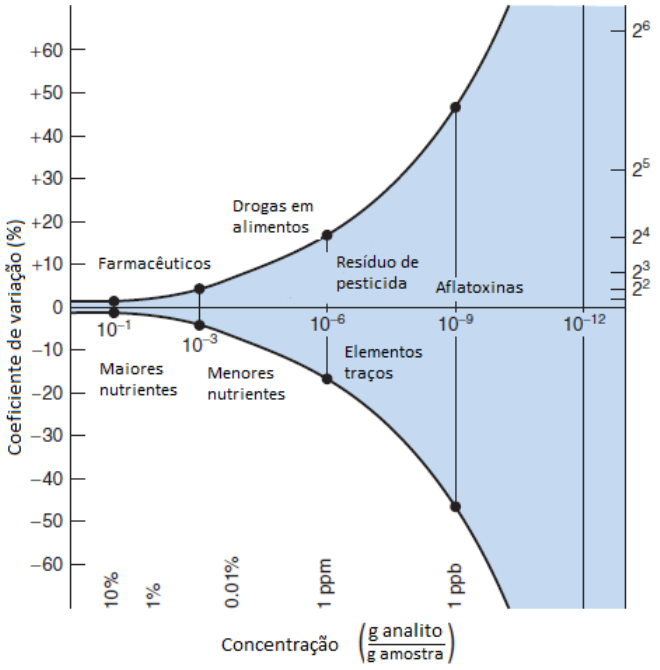

Figura 5.2: Trombeta de Horwitz (Harris, 2007)

5.5 Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (Ribani, 2004).

A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços.

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

Os MRC são materiais de referência acompanhados de um certificado que possui o valor de concentração de uma dada substância, ou outra grandeza para cada parâmetro e uma incerteza associada. Os materiais de referência certificados são fornecidos por organismos reconhecidos e confiáveis, como NIST (National Institute of Standards and Technology), LGC (Laboratory of the Government Chemist), USP, FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme) entre outros.

A exatidão pode ser calculada pelo erro relativo expresso da seguinte forma:

$$ER = \frac{X_{lab} - X_v}{X_v} \times 100. \tag{5.12}$$

onde X_{lab} é o valor obtido experimentalmente ou a média aritmética de valores obtidos; X_v é o valor aceito como verdadeiro (valor certificado pelo MRC).

Outra maneira de verificar a exatidão é pelo cálculo do índice Escore z (seção 4.3), o qual é dado por:

$$z = \frac{X_{lab} - X_v}{S}, \tag{5.13}$$

onde X_{lab} é o valor obtido do laboratório; X_v é o valor aceito como verdadeiro e S é o desvio padrão do ensaio de proficiência.

A avaliação desse índice é feita com o seguinte critério de decisão:

$|z| \leq 2 \Rightarrow$ resultado satisfatório;

$2 < |z| < 3 \Rightarrow$ resultado questionável;

$|z| \geq 3 \Rightarrow$ resultado insatisfatório.

5.6 Recuperação

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo (Spike). As amostras devem ou são usualmente fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações: baixa, média e alta, da faixa de uso do método (INMETRO, 2011). A limitação deste procedimento é que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que a presente amostra.

A recuperação é calculada segundo:

$$R(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100, \tag{5.14}$$

onde C_1 é a concentração do analito na amostra fortificada; C_2 é o branco C_3 é a concentração do analito adicionada à amostra fortificada.

É importante avaliar a recuperação em várias concentrações, uma vez que esta pode variar em concentrações muito baixas. Na maioria dos procedimentos analíticos de validação, recuperações dentro da faixa de $70\% - 120\%$ são aceitas para compostos orgânicos em amostras ambientais (Lanças, 2004).

A recuperação pode ser obtida de forma absoluta ou relativa. A recuperação absoluta é definida como a porcentagem de resposta de um padrão analítico puro que não foi submetido ao mesmo pré-tratamento da amostra. A recuperação relativa é determinada comparando-se a resposta obtida com a matriz àquela obtida com solvente (Lanças, 2004).

A quantificação do analito durante os estudos de recuperação é, geralmente feita por meio dos métodos do padrão externo ou do padrão interno.

Padrão Externo

Neste caso, a porcentagem em massa de uma amostra de concentração desconhecida é determinada a partir de um gráfico de calibração. Prepara-se o gráfico com as áreas dos picos obtidos em função das massas dos padrões que as geraram. A seguir injeta-se a amostra cuja massa se quer conhecer, determina-se sua área e lança-se no gráfico de calibração.

A porcentagem em massa desconhecida é, então, encontrada dividindo-se a massa determinada (m_d) pela total da amostra (m_a) e multiplicando-se o resultado por 100 (Lanças, 2004):

$$\%massa = \frac{m_d}{m_a} \times 100. \tag{5.15}$$

Padrão Interno

Um padrão interno é uma quantidade conhecida de um composto, diferente do constituinte em análise, que é adicionado à amostra desconhecida. O sinal do constituinte em análise é comparado com o sinal do padrão interno para encontrar a quantidade do constituinte presente.

Padrões internos são especialmente úteis para análises nas quais a quantidade de amostra analisada ou a resposta do instrumento varia ligeiramente de corrida para corrida por razões que são difíceis de controlar. Desde que a concentração do padrão seja conhecida, a concentração correta do constituinte em análise pode ser calculada. Padrões internos são muito utilizados em cromatografia, porque as pequenas quantidades de solução de amostra injetadas no cromatógrafo não são muito reprodutíveis em alguns experimentos.

Padrões internos são também desejáveis quando a perda da amostra pode ocorrer durante a etapa de preparo da mesma antes da análise. Se uma quantidade conhecida de padrão é adicionada à amostra desconhecida antes de qualquer manipulação, a razão entre o padrão e o constituinte em análise permanece constante, porque a mesma fração de cada um é perdida em qualquer operação (Harris, 2007).

Superposição de Matriz

No método de superposição de matriz a curva é confeccionada utilizando uma matriz

de referência, ou seja, uma matriz semelhante à amostra, porém isenta da substância de interesse. O objetivo deste método é eliminar o efeito de interferentes, principalmente durante o processo de extração, separação ou detecção (Otomo, 2010).

Adição Padrão

Na adição-padrão quantidades conhecidas de constituinte são adicionadas à amostra desconhecida. Do aumento do sinal, deduz quanto de constituinte estava na amostra original. Esse método requer uma resposta linear para o constituinte.

A adição-padrão é especialmente apropriada quando a composição da amostra é desconhecida ou complexa e afeta o sinal analítico. Define-se um efeito de matriz como uma mudança no sinal analítico causado por qualquer coisa na amostra além do constituinte (Ribani, 2004).

5.7 Robustez

Embora não faça parte de alguns procedimentos de validação, como da International Conference on Harmonisation (ICH), a robustez deve ser incluída em um procedimento completo de validação, uma vez que ela mede a confiabilidade do método em condições normais de operação, permitindo fixar as tolerâncias dos fatores do método. A influência dos fatores na resposta da análise pode ser verificada individual ou simultaneamente (Lanças, 2004).

No caso em que se deseja avaliar a influência de vários parâmetros, simultaneamente, um método multivariado, como por exemplo, um planejamento fatorial é sugerido. Os fatores determinados como relevantes no planejamento fatorial são, então, submetidos a um estudo do tipo superfície de resposta para obter uma descrição mais completa do efeito dos fatores (Lanças, 2004).

Para determinação da robustez o INMETRO recomenda a execução do teste de Youden, onde é possível conhecer além da robustez do método, a influênica de cada uma das variações no resultado final de forma ordenada. Neste trabalho o método utilizado foi o planejamento fracionário saturado, onde sete parâmetros são selecionados

e agrupados em uma combinação fatorial, resultando em oito experimentos distintos, onde as letras maiúsculas indicam os valores nominais e as minúsculas, suas variações (TAB. 5.1) (Souza, 2011).

Tabela 5.1: Planejamento Fatorial Saturado para avaliação do erro da distribuição dos efeitos (Souza, 2011)

Valor da variável	Combinação Ensaiada							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	B	b	b	B	B	b	b
C ou c	C	c	C	c	C	c	C	c
D ou d	D	D	d	d	d	d	D	D
E ou e	E	e	E	e	e	E	e	E
F ou f	F	f	f	F	F	f	f	F
G ou g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

Para determinar a influência da variação de cada parâmetro no resultado final, compara-se a média dos quatro valores correspondentes às letras maiúsculas com a média dos quatro valores correspondentes às letras minúsculas, utilizando a equação:

$$EfeitoC/c = \frac{s+u+w+y}{4} - \frac{t+v+x+z}{4} \tag{5.16}$$

A estimativa inicial do erro em um efeito é obtido por:

$$S_0 = 1,5.\ \text{média}\ |E_i| \tag{5.17}$$

onde E_i é o valor do efeito i, e o valor de 1,5 é para variáveis aleatórias que seguem uma distribuição normal.

Uma estimativa final do erro padrão (S_1) é dada por:

$$S_1 = \sqrt{m^{-1}\sum E_i^2} \forall\, |E_i| \leq 2,5.S_0 \tag{5.18}$$

onde m é o número de efeitos absolutos menores que $2,5.S_0$. Este valor de S_1 é usado para calcular o que chama-se de margem de erro (ME) dada por:

$$ME = t_{(1-\alpha/2;df)}.S_1, \tag{5.19}$$

onde $1 - \alpha/2 = 0,975$ e df=m. A ME é estatisticamente um critério de teste de significância quando somente um efeito tem de ser testado. Quando efeitos múltiplos são testados a probabilidade de efeitos não-significantes que excedem ME, aumentam. Para compensar estes eventos, o nível de significância tem de ser ajustado e um segundo limite é definido, a margem de erro simultânea (SME), dada por:

$$SME = t_{(1-\alpha*/2;df)}.S_1, \tag{5.20}$$

onde $\alpha* = 1 - (1 - \alpha)^{(\frac{1}{m})}$.

Capítulo 6

Materiais e Métodos

O desenvolvimento do trabalho experimental foi dividido em: readaptação da metodologia analítica desenvolvida por Otomo (Otomo, 2010) para quantificação dos cinco compostos estrona, estradiol, etinilestradiol, norgestrel e progesterona, utilizando extração em fase sólida e análise via CG/EM. A etapa seguinte do trabalho foi a validação da metodologia seguindo as orientações do INMETRO e sequencialmente, foi realizada a aplicação do método no monitoramento dos compostos estudados em amostras de água subterrânea do IPEN.

6.1 Materiais e métodos

Os materiais utilizados para a realização deste trabalho foram:

6.1.1 Reagentes e soluções

Água ultrapura (tipo 1) de baixa condutância; metanol (MeOH) e diclorometano (DCM)de grau HPLC; ácido clorídrico; padrões de estrona 99,5%, etinilestradiol 99,4%, norgestrel 98%, progesterona 99,6% e estradiol 99,5% todos da Sigma Aldrich.

6.1.2 Materiais para filtração e para a extração em fase sólida (EFS)

- Cartuchos de EFS de 6 mL preenchidos com 500mg de octadecil (C18), Supelclean ENVI;
- Cartucho de EFS de 3 mL preenchidos com 500mg de pirrolidona e benzila (Strata-X), Phenomenex;
- Filtro LCR em PTFE $0,4\mu m$, Millipore;
- Vidraria básica de laboratório tais como béqueres, provetas, balões, entre outros.

6.1.3 Equipamentos

- Cromatógrafo a gás-GC17A, acoplado ao detector de espectrometria de massas-QP 5000 (CG/EM), ambos da marca Shimadzu;
- Sistema de filtração a vácuo, marca Sartorius;
- Equipamento de purificação de água por osmose reversa, ELIX 3, Millipore;
- Equipamento de purificação de água, EASY pure PR, Barnstead;
- Compressor/aspirador (Dia pump), modelo 089 cal, marca FANEM;
- Sistema de extração em fase sólida desenvolvido nos laboratórios do CQMA;
- Centrífuga, Solumix.

6.2 Caracterização da área de estudo

O IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares) faz parte de uma autarquia da Universidade de São Paulo desenvolvendo pesquisas em sua maioria relacionadas a

atividades nucleares, podendo com isso gerar efluentes de caráter radioativo ou não. Com o intuito de averiguar a qualidade das águas subterrâneas presentes no instituto surgiram dois programas de monitoramento ambiental. O primeiro programa é voltado para avaliar a presença de produtos radioativos no ambiente (Programa de Monitoramento Radiológico Ambiental, PMRA) e o outro avalia a presença de produtos químicos não radioativos (Programa de Monitoramento Químico Ambiental, PMQA). Ambos os programas realizam o controle de substâncias químicas presentes na saída dos efluentes como também nos lençóis freáticos presentes na área do instituto.

Há no IPEN sete poços, os quais têm profundidades e localizações variáveis. O ponto de coleta escolhido para desenvolvimento do trabalho foi o poço denominado P3 localizado a 23°33'40.76" ao sul e a 46°44'27.90" ao norte (FIG. 6.1) , o qual é o poço de maior profundidade e de fácil acesso. As coletas foram realizadas todas no período da manhã a cada dois meses.

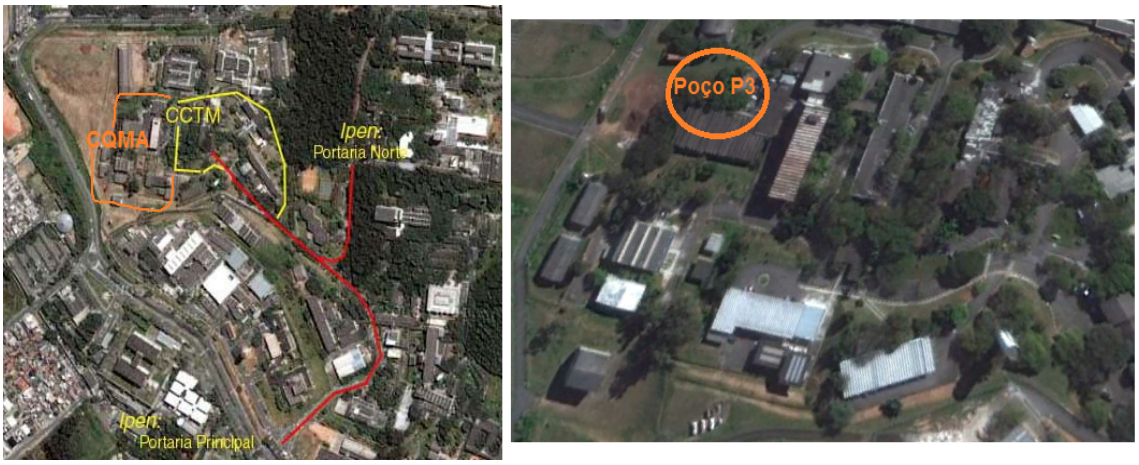

Figura 6.1: Localização do ponto de coleta (googleearth)

O método de coleta das águas do poço seguiram as recomendações do Guia CETESB para coleta e preservação de amostras de água (CETESB, 1987) e a Norma 64-10 também da CETESB sobre amostragem e monitoramento das águas subterrâneas (CETESB, 1988).

6.3 Coleta e armazenamento das amostras

O ponto de coleta da água subterrânea foi escolhido por ser de fácil acesso e por ser um dos poços mais profundos do IPEN (poço P3). Todas as coletas foram realizadas com o acompanhamento dos funcionários do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. O procedimento de coleta como já mencionado, foi seguido pelas recomendações da CETESB (1987) e (1988).

As amostras foram coletadas em frascos de 1 L de vidro âmbar durante a estação de seca (julho/setembro), pela manhã. Após serem coletadas foram armazenadas em geladeira e em seguida feita a filtração, sendo refrigeradas novamente.

6.4 Preparo das soluções analíticas

As soluções analíticas estoques individuais contendo 1 mg de cada composto (estradiol, estrona, etinilestradiol, norgestrel e progesterona) foram preparados em metanol grau HPLC em balões volumétricos calibrados de 10 mL e acondicionadas em freezer. A partir dessas soluções estoques foi preparada uma solução mix na concentração de 10 $\mu g.mL^{-1}$ com os cinco compostos de interesse. As soluções de trabalho nas concentrações 0,8; 1,2; 1,5; 1,8; 2,0; 2,3 e 2,5 $\mu g.mL^{-1}$ foram preparadas a partir da solução mix de 10 $\mu g.mL^{-1}$.

6.5 Metodologia analítica

Devido às baixas concentrações e ao grande número de compostos que podem estar presentes nas amostras, foram adotados procedimentos para reduzir possíveis contaminações durante o processo de amostragem, armazenamento, filtração, extração e injeção das amostras.

Todos os materiais e vidrarias utilizados foram devidamente lavados com água corrente, detergente e enxaguados com água de osmose reversa e água de alta pureza (tipo

1). Após secas, as vidrarias foram deixadas por pelo menos 12 horas em solução de ácido nítrico e ácido sulfúrico, ambos p.a. (pureza analítica) na proporção 1:1. Passadas as 12 horas, as vidrarias foram novamente lavadas com água de osmose reversa e em seguida com água de alta pureza (tipo 1), sendo colocadas para secagem.

A metodologia analítica empregada na avaliação dos compostos estrona, estradiol, etinilestradiol, norgestrel e progesterona, consistiu de: filtração da amostra; extração em fase sólida e deteção por CG/EM.

6.5.1 Filtração

Primeiramente a água de poço em temperatua ambiente foi filtrada à vácuo (FIG. 6.2) com filtro de PTFE de poro $0,4\mu m$ a fim de eliminar partículas sólidas em suspensão. Após a filtração essas amostras foram armazenadas em geladeira para posterior extração.

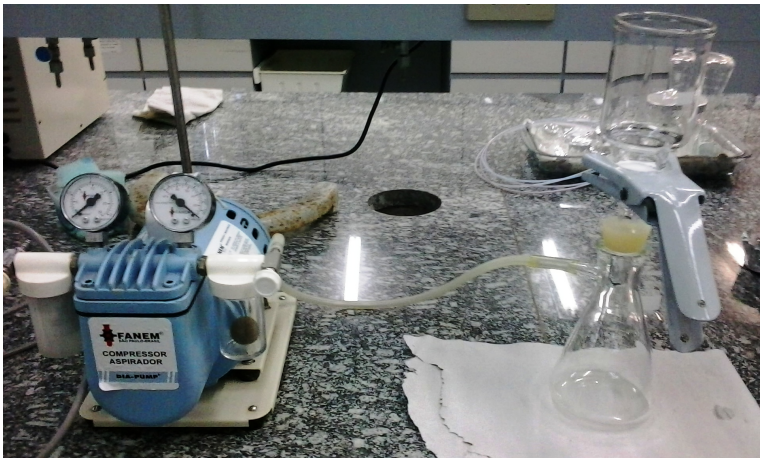

Figura 6.2: Sistema de Filtração a vácuo

6.5.2 Extração em fase sólida (EFS)

O sistema “manifold” utilizado neste trabalho foi composto de aparelhagem á vácuo, desenvolvida nos laboratórios do CQMA aonde podem ser feitas até 10 extracções simultaneamente (FIG. 6.3).

Figura 6.3: Sistema de Extração em Fase Sólida

Neste estudo foram utilizados os cartuchos de extração em fase sólida Strata-X (500mg e 3mL) da marca Phenomenex. Os cartuchos foram condicionados antes da percolação da amostra, primeiramente com 6mL de metanol, e em seguida com uma solução de 60:30 (MeOH:H_2O). Para que houvesse uma melhor ativação do material adsorvente do recheio do cartucho com esta solução, a torneira de escoamento do sistema foi fechada por mais ou menos 2 minutos. Em seguida eluiu-se através do cartucho 500mL de água de poço acidificada (pH 3) com a adição de ácido clorídrico. O volume escolhido para a percolação foi baseado nas especificações do fabricante. A transferência ocorreu a uma vazão de $3mL.min^{-1}$ por sucção em função do vácuo aplicado ao sistema, controlado através de válvulas individuais. Ao final desta etapa os cartuchos foram secos por centrifugação a 2500 rpm (rotações por minuto) por 30 minutos, sendo a posterior eluição dos analitos de interesse, realizada com uma solução na proporção 30:60 v/v de MeOH:DCM. A secagem do eluato foi realizada por fluxo suave de nitrogênio a fim de reduzir o volume e concentrar o eluato para 1 mL e ser feita a análise da solução resultante por CG/EM.

6.5.3 Condições da Cromatografia a Gás/Espectrometria de Massas (CG/EM)

As análises por espectrometria de massas foram realizadas em um cromatógrafo a gás acoplado ao detector de espectrometria de massas. A TAB. 6.1 representa as características operacionais do sistema empregado:

Tabela 6.1: Características e condições de análise do sistema CG/EM

Modelo	GC-17A acoplado a espectrômetro de massas QP-5000			
Gás de arraste	Hélio			
Coluna	DB-5 com diâmetro interno de 0,25mm, comprimento de 28,8m e espessura de 0,25µm			
Programaçao da temperatura	Parâmetros	Taxa (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)
	T injetor		265°C	
	T detector		270°C	
	T coluna		100 °C	1 min
		18°C/min	215°C	6 min
		10°C/min	243°C	5 min
		5°C/min	248°C	6 min
		15°C/min	270°C	2 min
Pressão na coluna	113,8 kPa			
Fluxo na coluna	1,6 mL/min			
Fluxo total	30,7 mL/min			
Velocidade linear do gás de arraste	48 cm/sec			
Modo de aquisição	SIM			
Tempo de corte do solvente	3 min			
Voltagem do detector	2,5 kV			
Volume de injeção	1µL			
Modo de injeção	Splitless			
Tempo total de corrida	31,66 min			

O modo de aquisição SCAN (varredura de íons) foi empregado para as análises qualitativas enquanto o modo SIM (seleção de íons monitorados) para as análises quantitativas. A análise quantitativa dos compostos de interesse na amostra de água subterrânea foi realizada pela padronização externa. A relação massa/carga (m/z) no modo SIM dos analitos, o intervalo de monitoramento dos fragmentos e os tempos de retenção estão descritos abaixo (TAB. 6.2):

Tabela 6.2: Relação massa/carga (m/z) dos 5 íons monitorados no modo SIM

Compostos	Tempo de retenção (minutos)	Relação (m/z)				
Estrona	20,00-21,08 minutos	146	213	270	271	272
Estradiol	21,08-22,25 minutos	160	213	272	273	274
Etinilestradiol	22,25-23,50 minutos	213	228	296	297	298
Norgestrel	23,50-25,50 minutos	91	245	297	312	313
Progesterona	25,50-28,00 minutos	124	147	314	315	316

6.6 Ensaios para validação da metodologia

A validação do método proposto seguiu os procedimentos baseados nas orientações do documento DOQ-CGC-008 do INMETRO [47], utilizando como ferramenta para os cálculos a planilha de validação de ensaios químicos de Furusawa. Os parâmetros para a validação da metodologia estudada na quantificação dos hormônios em água subterrânea foram: seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), o limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão, recuperação e robustez.

Após definidas as condições para a extração em fase sólida e as condições cromatográficas, foram realizados ensaios na própria matriz de água subterrrânea e somente em solvente, para avaliação dos parâmetros de validação. Nas análises das soluções de trabalho da curva analítica sem matriz, seguiu-se o procedimento descrito na secção 6.4. Para a obtenção das soluções de trabalho em matriz, seguiu-se o procedimento descrito na secção 6.5.2, onde foram realizadas quatro extrações sendo o eluato recolhido no mesmo recipiente coletor, obtendo com isso um único extrato que foi dividido em oito partes iguais. Em sete alíquotas foram adicionadas as soluções de trabalho, sendo a oitava alíquota considerada como branco. As injeções para cada concentração foram realizadas em setuplicatas para ambos os ensaios, com matriz e sem matriz.

6.6.1 Determinação da seletividade

Primeiramente este parâmetro foi avaliado a partir dos cromatogramas obtidos pela injeção da solução mix com os cincos hormônios em estudo estrona, estradiol,

etinilestradiol, norgestrel e progesterona na própria matriz e em solvente.

Após a obtenção dos cromatogramas nos ensaios com matriz e sem matriz o parâmetro seletividade foi avaliado pelo uso dos testes t de Student para variâncias desconhecidas e iguais (secção 4.7) e pelo teste F de Snedecor somente para variâncias (secção 4.9). Estas duas ferramentas estatísticas permitem que decisões a respeito de certos parâmetros das amostras em estudo sejam tomadas.

Neste caso o parâmetro que pretende-se averiguar é se a matriz afeta ou não o método estabelecido. Para isso foram realizadas injeções em setuplicatas utilizando as soluções de trabalho nos sete níveis de concentrações (0,8; 1,2; 1,5; 1,8; 2,0; 2,3 e 2,5 $\mu g.mL^{-1}$) em metanol e em matriz, a fim de obter duas curvas uma denominada curva sem matriz e a outra, curva com matriz.

A partir da obtenção dessas curvas, tomando a área do pico de cada composto no cromatograma e fazendo uso da planilha "Ensaio de Validação Química" de Furusawa (Furusawa, 2007), foi possível calcular os valores de F e t para então ser tomadas as decisões.

6.6.2 Determinação da linearidade

Para avaliação da linearidade fez-se sete ensaios com matriz e sete ensaios sem matriz. Novamente as áreas dos picos de cada composto foram utilizadas para levantar as curvas de regressão sem matriz e com matriz. Estas curvas de regressão foram obtidas pelo método dos mínimos quadrados, os quais nos forneceram os parâmetros β_0 (intercepto) e β_1 (inclinação) da reta bem como o coeficiente de determinação r^2.

Através deste coeficiente pode-se medir a variação em que a variável y é explicada pela variável independente x. Segundo a ANVISA um valor recomendado para r^2 é de $r^2 > 0,90$.

Adotado o modelo de regressão é preciso verificar se ele satisfaz os quatro pressupostos: linearidade, independência de erros, normalidade dos erros e igualdade de variâncias (homoscedasticidade). Para isto faz-se o uso da análise de resíduos através

dos gráficos de resíduos. Após verificada a não violação dos pressupostos, pôde ser realizada a inferência sobre a inclinação, utilizando a equação 4.22 e a equação 4.23.

6.6.3 Determinação do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção do método foi avaliado pela média das injeções em setuplicatas da menor concentração aceitável do analito na matriz e sem matriz, calculado pela equação 5.5 (ver seção 5.3), admitindo a distribuição t de Student com (n-1) graus de liberdade e o nível de significância (α) igual a 5%.

O limite de quantificação foi avaliado pela média de injeções em setuplicatas do primeiro ponto da curva analítica, obtido pela equação 5.7 (ver secção 5.3).

6.6.4 Determinação da precisão

Este parâmetro foi analisado pelo coeficiente de variação (CV), pelo limite de reprodutibilidade (R) e pelo limite de repetitividade (r), em ensaios realizados pelo mesmo analista, mesmo método em setuplicatas, em dias diferentes e em três níveis de concentração (baixa, média e alta) na matriz.

6.6.5 Determinação da exatidão

A exatidão como sabe-se está relacionada com a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro. Assim, para a avaliação deste parâmetro foi utilizado material de referência, onde os valores obtidos foram comparados com os valores tidos como verdadeiros e utilizando o índice Escore z, obtido pela equação 5.13 (ver seção 5.5).

6.6.6 Determinação da recuperação

Para a avaliação da recuperação foi realizado o ensaio em matriz com a solução mix dos cinco compostos no nível de concentração baixo 0,8 $\mu g.mL^{-1}$ devido a presença dos compostos estar abaixo dessa concentração. O cálculo da recuperação foi realizado pela equação 5.14 da secção 5.6.

6.6.7 Determinação da robustez

A robustez do método cromatográfico foi avaliada por meio do teste de Youden que consiste na seleção de sete variáveis de influência significativa sobre o método, realizando os ensaios de acordo com uma combinação fatorial, que resultam em oito ensaios distintos. Com os resultados destes ensaios, isto é, com as médias de três replicatas para cada um dos estudos, a robustez foi avaliada e a influência de cada variável verificada. Na TAB. 6.3 estão apresentados os parâmetros selecionados para o ensaio de robustez, onde foram realizadas oito extrações na própria matriz de água subterrânea fortificada com a adição de concentração conhecida da solução mix dos cinco compostos, de acordo com o planejamento fatorial saturado proprosto na TAB. 7.1.

Tabela 6.3: Fatores selecionados para a avaliação da robustez

Fator	Nominal	Variação
Mistura extratora	60DCM:40MeOH	40MeOH:60DCM
pH da amostra	3	6
Temperatura do injetor (°C)	265	240
Temperatura da interface (°C)	270	250
cartucho	Strata-X	C18
fluxo na coluna (mL/mim)	1,6	2
volume de extração (mL)	6	8

Para a verificação dos efeitos significativos, foi utilizado o planejamento de Plackett-

Burman para a realização dos gráficos de rankit e o algoritmo de Dong, foi utilizado para calcular a margem de erro (ME) e a margem de erro simultânea (SME).

Capítulo 7

Resultados e Discussões

7.1 Escolha do material sorvente para extração em fase sólida (EFS)

O método analítico envolveu a extração, concentração dos analitos na amostra e a sua determinação por CG/EM, utilizando o método de Otomo (2010) com algumas modificações. As modificações foram a troca do cartucho de EFS C18 pelo cartucho Strata-X e a corrida cromatográfica que iniciou-se em 100°C, em vez de 80°C, sendo o restante do método mantido o mesmo.

A escolha por este cartucho deveu-se ao Strata-X ser preenchido com sorvente polimérico o qual tem uma superfície modificada com estireno e com um grupo pirrolidona, cujos mecanismos são retenção hidrofóbica, ligações de hidrogênio e aromáticos. Este sorvente é utilizado para extração em fase reversa de compostos ácidos, básicos e neutros. Em muitos trabalhos o cartucho Strata-X tem sido comparado com outros sorventes disponíveis no mercado para a retenção de compostos polares e não polares em amostras de água, e é indicado como melhor sorvente para EFS de analitos com diferentes propriedades físico-químicas (Babic et al., 2010), incluindo os hormônios. Visto a boa credibilidade com respeito ao cartucho Strata-X é que optou-se pelo seu uso neste trabalho.

7.2 Validação do método

7.2.1 Seletividade

A fim de verificar a seletividade do método foram realizadas as análises cromatográficas das soluções de trabalho com os cinco compostos de estudo em solvente e em matriz de água subterrânea.

Comprovou-se pela amostra do branco (matriz) que não havia interferentes da matriz no tempo de retenção próximo ao dos analitos de interesse, o que poderia resultar em falsos positivos ou negativos. Pela FIG. 7.1, pode-se observar a boa distinção entre os picos dos diferentes compostos e o seu tempo de retenção.

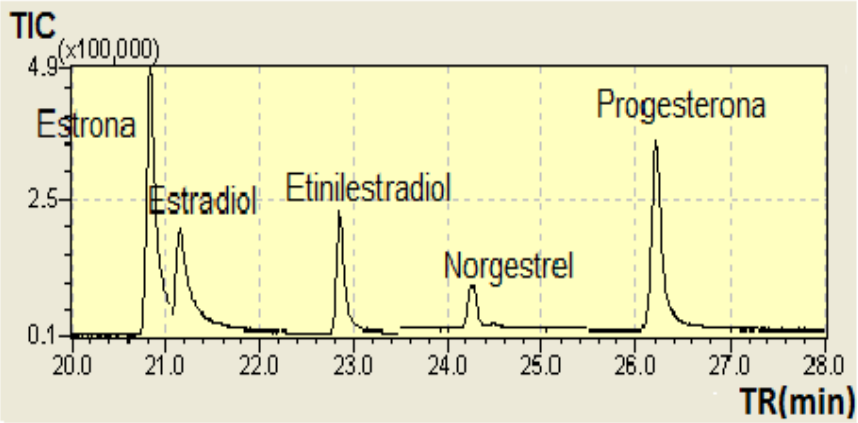

Figura 7.1: Cromatograma obtido na análise de solução de trabalho (1,2 $\mu g.mL^{-1}$) no modo SCAN

Contudo esta análise visual não é suficiente para verificar se o método é seletivo ou não. Para isto fez-se necessário o uso de cálculos estatísticos para uma melhor comprovação dos resultados e para verificar, se houve um efeito da matriz nas análises. Os dados obtidos (valor das áreas dos picos de cada composto) nas sete concentrações de trabalho foram utilizados para fazer os cálculos estatísticos, utilizando o teste F de Snedecor (Levine et al., 2008) e o teste t de Student (Levine et al., 2008).

O primeiro teste, o F de Snedecor foi utilizado para verificar a homocedasticidade

das variâncias ($H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2$), isto é, para comparar as variâncias das duas populações (sem matriz e com matriz). Através desta comparação pôde-se verificar se as populações possuem a mesma variabilidade.

O teste F de Snedecor utilizado para a avaliação da seletividade foi um teste unicaudal a direita, devido a estar trabalhando com amostras coletadas no mesmo local, onde calculou-se F_{calc} ao nível de significância de 5% e n=6 graus de liberdade, determinando com isso a região de não rejeição e a região de rejeição da hipótese nula. Aqui tomamos como a hipótese nula $H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2$ e a hipótese alternativa $H_1 : \sigma_1^2 > \sigma_2^2$ sendo que, se $F_{calc} > F_{tab}$ rejeita-se H_0, isto é, ao nível de 5% pode-se concluir que a matriz tem efeito sobre o método e se $F_{calc} < F_{tab}$ não se rejeita H_0, isto é, ao nível de 5% pode-se concluir que a matriz não afeta o método.

Pela TAB. 7.1 e TAB. 7.2 percebe-se que a maior parte dos valores obtidos de F_{calc} foram superiores a F_{tab} ($F_{tab} = 4,28$), então rejeita-se H_0 e conclui-se que com 95% de confiabilidade é significativo o efeito da matriz sobre o método.

Tabela 7.1: Dados para os testes de seletividade dos compostos estudados. Adição de padrão na matriz de água subterrânea (AS) e sem matriz.

		Estrona-Concentração µg.mL^{-1}						
		0,8	1,2	1,5	1,8	2	2,3	2,5
Sem matriz	s^2	3,52E+07	9,20E+06	2,33E+08	3,43E+07	6,73E+09	5,49E+08	1,35E+08
	s^2	4,76E+08	1,54E+08	6,46E+08	1,26E+09	2,34E+09	4,01E+08	6,24E+09
Matriz AS	F_{calc}	**13,53**	**16,78**	**2,78**	**36,69**	**0,35**	**0,73**	**46,31**
	t_{calc}	**124,76**	**249,99**	**126,47**	**107,19**	**43,50**	**155,1**	**66,31**

Tabela 7.2: Dados para os testes de seletividade dos compostos estudados. Adição de padrão na matriz de água subterrânea (AS) e sem matriz.

Estradiol-Concentração µg.mL^{-1}								
		0,8	1,2	1,5	1,8	2	2,3	2,5
Sem matriz	s^2	4,39E+16	4,64E+15	7,93E+16	3,13E+17	8,57E+18	7,05E+16	7,70E+18
	s^2	4,39E+16	4,64E+15	7,93E+16	3,13E+17	8,57E+18	7,05E+16	7,70E+18
Matriz AS	F_{calc}	**157,73**	**3,97**	**4,73**	**9,38**	**2,42**	**1,11**	**8,89**
	t_{calc}	**60,72**	**103,73**	**80,87**	**89,63**	**92,21**	**86,71**	**31,72**

Etinilestradiol-Concentração µg.mL^{-1}								
		0,8	1,2	1,5	1,8	2	2,3	2,5
Sem matriz	s^2	6,66E+06	1,41E+07	3,46E+07	2,90E+07	4,93E+08	1,66E+09	1,50E+08
	s^2	3,37E+08	5,45E+07	4,98E+07	3,66E+08	9,98E+07	3,62E+07	5,12E+07
Matriz AS	F_{calc}	**50,65**	**3,85**	**1,44**	**12,62**	**0,20**	**0,02**	**0,34**
	t_{calc}	**30,37**	**80,64**	**77,28**	**43,74**	**46,59**	**27,01**	**95,51**

Norgestrel-Concentração µg.mL^{-1}								
		0,8	1,2	1,5	1,8	2	2,3	2,5
Sem matriz	s^2	4,21E+06	6,06E+06	1,32E+07	1,02E+07	3,61E+06	3,94E+08	5,44E+07
	s^2	9,83E+08	2,95E+07	2,71E+07	1,79E+08	1,21E+09	6,32E+07	3,03E+09
Matriz AS	F_{calc}	**233,41**	**4,86**	**2,05**	**17,54**	**335,55**	**0,16**	**55,63**
	t_{calc}	**12,39**	**68,65**	**67,65**	**35,11**	**20,57**	**27,73**	**12,74**

Progesterona-Concentração µg.mL^{-1}								
		0,8	1,2	1,5	1,8	2	2,3	2,5
Sem matriz	s^2	2,50E+09	2,49E+07	8,51E+07	1,74E+08	1,95E+08	1,61E+09	1,18E+09
	s^2	1,43E+08	1,73E+09	5,64E+09	1,95E+09	1,52E+10	7,63E+09	3,94E+10
Matriz AS	F_{calc}	**0,06**	**69,30**	**66,29**	**11,20**	**78,22**	**4,75**	**33,46**
	t_{calc}	**34,00**	**53,90**	**34,44**	**69,45**	**31,14**	**48,26**	**25,15**

No caso do teste t, este também foi um teste unicaudal a direita, porém agora em vez de trabalhar com variâncias, trabalhou-se com as médias das amostras. Foi calculado o valor de t_{calc} ao nível de significância de 5% e n=12 graus de liberdade, determinando com isso a região de não rejeição e a região de rejeição da hipótese nula, sendo a hipótese nula dada por $H_0 : \mu_1 = \mu_2$ e a hipótese alternativa $H_1 : \mu_1 > \mu_2$. Assim, se o valor de $t_{calc} > t_{tab}$ rejeita-se a hipótese nula tendo a matriz efeito sobre o método, e sendo $t_{calc} < t_{tab}$ não se rejeita a hipótese nula, portanto a matriz não tem efeito sobre o método.

Observando a TAB. 7.1 e a TAB. 7.2, verifica-se que todos os valores de t_{cal} foram superiores ao valor de t_{tab} ($t_{tab} = 1,78$), o que conclui-se pela significância do efeito da matriz no método analítico. Esses resultados evidenciam que para realizar a quantificação dos analitos, deve ser utilizada a curva analítica preparada na própria matriz.

7.2.2 Linearidade

Neste trabalho, o modelo de calibração empregado baseou-se na regressão linear simples, onde foram realizadas injeções em sete replicatas nas concentrações de 0,8; 1,2; 1,5; 1,8; 2,0; 2,3 e 2,5 $\mu g.mL^{-1}$ em metanol e na matriz, obtendo com isso as curvas analíticas.

Na TAB. 7.3 e TAB. 7.4 estão apresentadas as equações das retas e os coeficientes de determinação (r^2) para os ensaios com matriz e sem matriz. Na FIG. 7.2 e 7.3, podem ser observados os gráficos das curvas de calibração obtidas para cada composto na matriz e sem matriz .

Tabela 7.3: Equação da reta e coeficiente de determinação (r^2) obtidos pela adição padrão na matriz de água subterrânea (AS)

Composto	Adição na matriz AS	
	equação da reta	r^2
Estrona	y=861129x+527870	0,991
Estradiol	y=223347x+147304	0,994
Etinilestradiol	y=331067x+4111	0,993
Norgestrel	y=154026x+22197	0,995
Progesterona	y=1000000x-423958	0,992

Tabela 7.4: Equação da reta e coeficiente de determinação (r^2) obtidos pela adição padrão somente em solvente

Composto	Adição no solvente	
	equação da reta	r^2
Estrona	y=471499x-220154	0,999
Estradiol	y=120176x-38968	0,998
Etinilestradiol	y=148535x-39813	0,997
Norgestrel	y=43263x-10306	0,995
Progesterona	y=287657x-204751	0,993

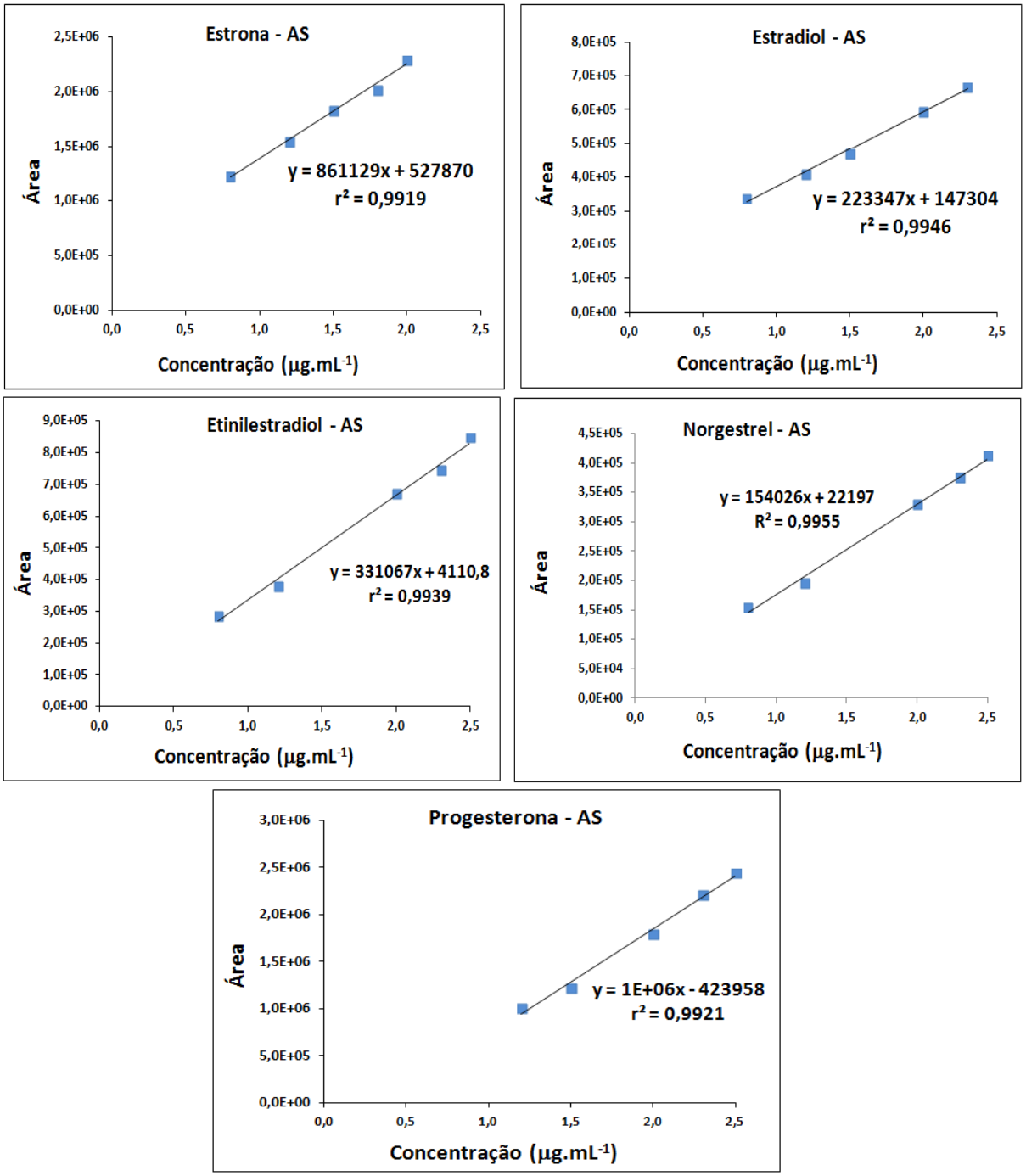

Figura 7.2: Representação gráfica da linearidade para os cinco compostos estudados na matriz de água subterrânea

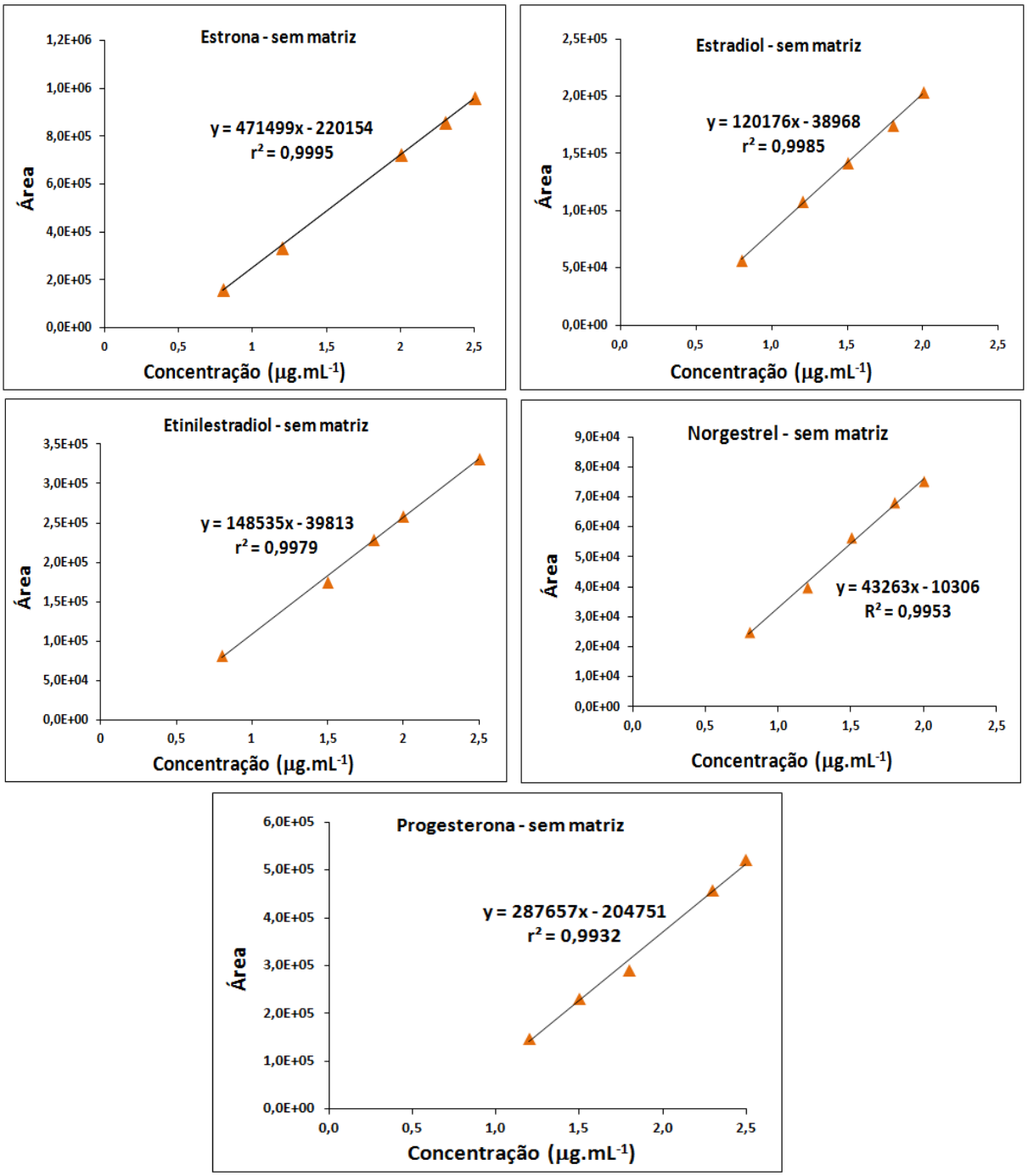

Figura 7.3: Representação gráfica da linearidade para os cinco compostos estudados em solvente

Segundo o INMETRO, coeficiente de correlação (r) acima de 0,90 são valores aceitáveis para avaliar a linearidade do método analítico. No presente trabalho foram obtidas curvas analíticas lineares e coeficientes de determinação superiores a 0,99, concluindo que as curvas analíticas encontradas podem ser utilizadas para a quantificação das amostras, sendo o modelo de regressão adotado, linear.

Como mencionado na seção 4.10, após encontrado o modelo de regressão é necessário verificar se este modelo escolhido é adequado. Nesta verificação é utilizada a análise de resíduos para avaliar se os pressupostos: linearidade, independência dos erros, normalidade e igualdade de variâncias são satisfeitos.

Para avaliar o primeiro pressuposto, a linearidade, foram inseridos os resíduos $(y_i - \widehat{y})$ no eixo vertical do plano cartesiano versus os valores correspondentes da variável x (concentrações) no eixo horizontal. Observando os gráficos de resíduos (FIG. 7.4, 7.5 e 7.6) para o ensaio com matriz e sem matriz para os cinco compostos de estudo, percebe-se que nenhum padrão aparente aparece, isto é, os resíduos encontram-se distribuídos aleatoriamente em torno de zero, indicando que a média dos mesmos se aproxima de zero. Isto confirma a linearidade do modelo, até mesmo para o composto etinilestradiol no ensaio sem matriz em que os valores estão distribuídos abaixo do eixo horizontal.

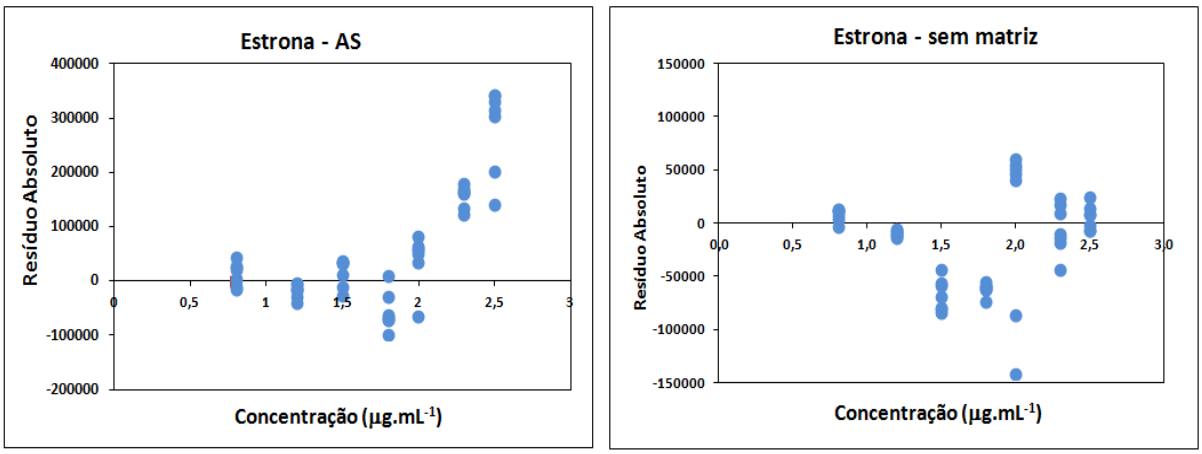

Figura 7.4: Gráfico de resíduo absoluto para o composto estrona em matriz e sem matriz

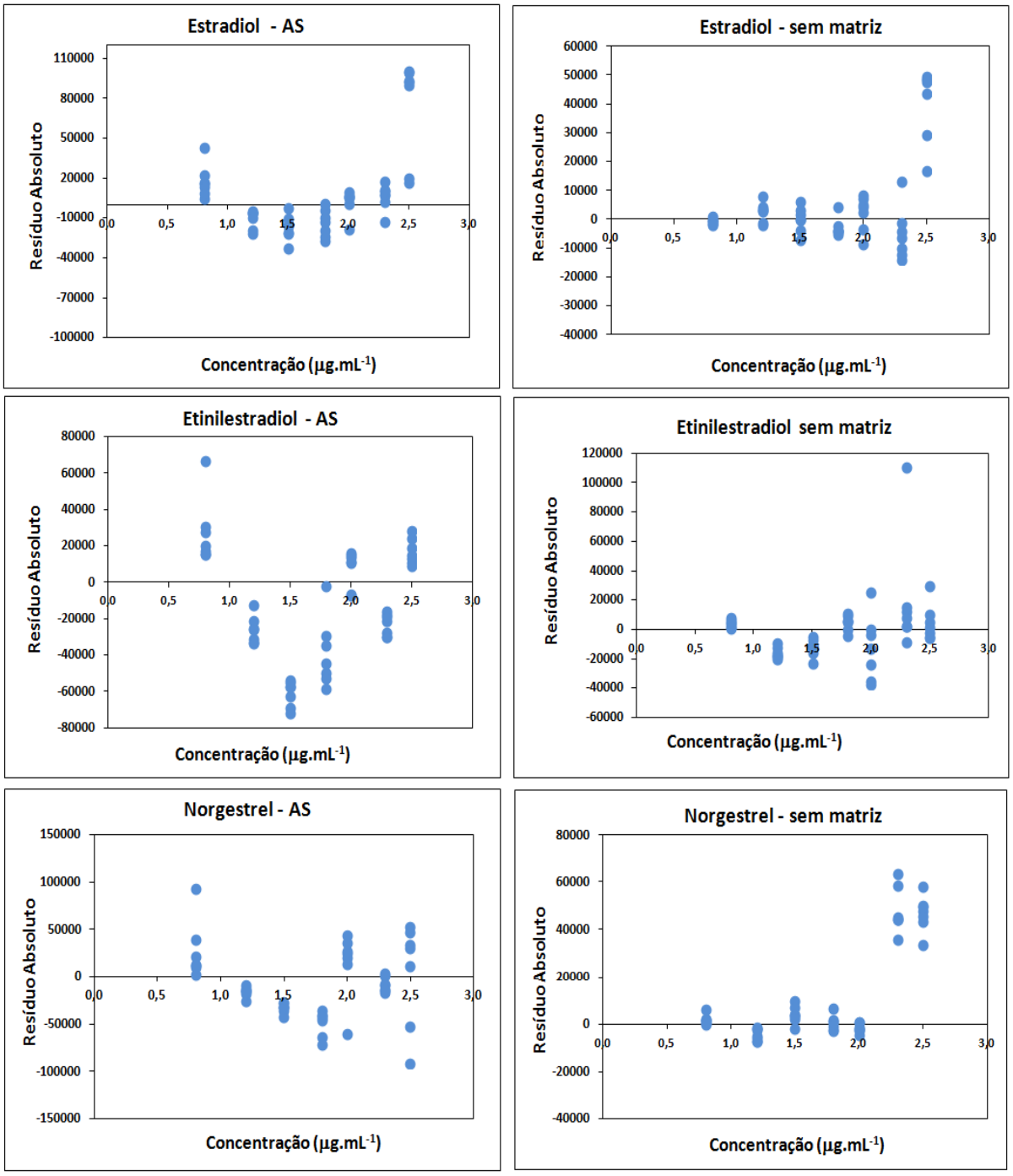

Figura 7.5: Gráficos de resíduos absolutos para os compostos estradiol, etinilestradiol e norgestrel em matriz e sem matriz

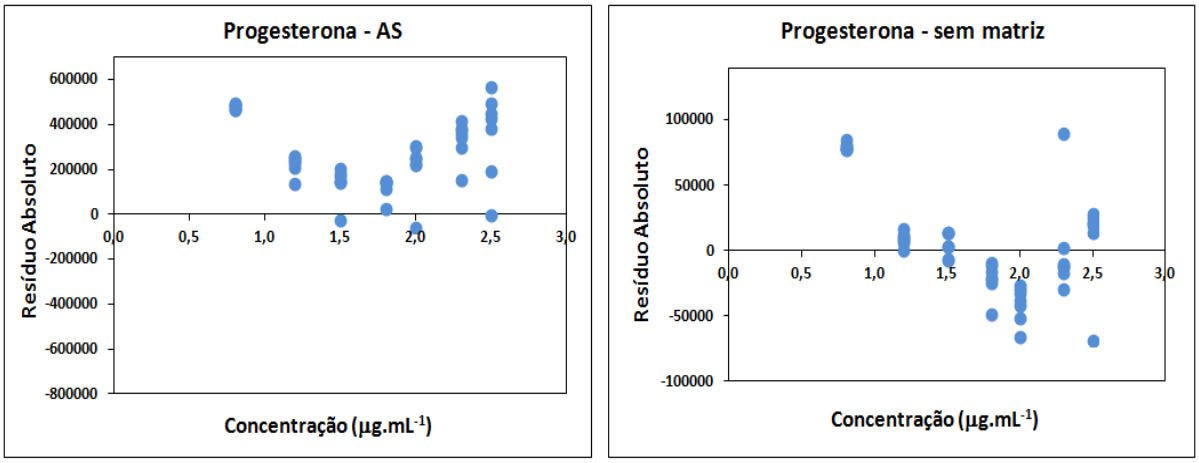

Figura 7.6: Gráfico de resíduo absoluto para o composto progesterona em matriz e sem matriz

Para avaliar o pressuposto de independência dos erros, poderia ser feito um gráfico de resíduos na ordem e sequência em que os dados foram coletados, porém como os dados do presente trabalho foram coletados durante o mesmo período de tempo, a avaliação desse parâmetro não faz-se necessária.

Para avaliar o terceiro pressuposto, a normalidade dos erros, comparou-se os valores normalizados com os resíduos e com isso construiu-se um gráfico de probabilidade normal padronizada versus os resíduos (FIG. 7.7 e 7.8) para os ensaios com matriz e sem matriz para os cinco compostos de estudo.

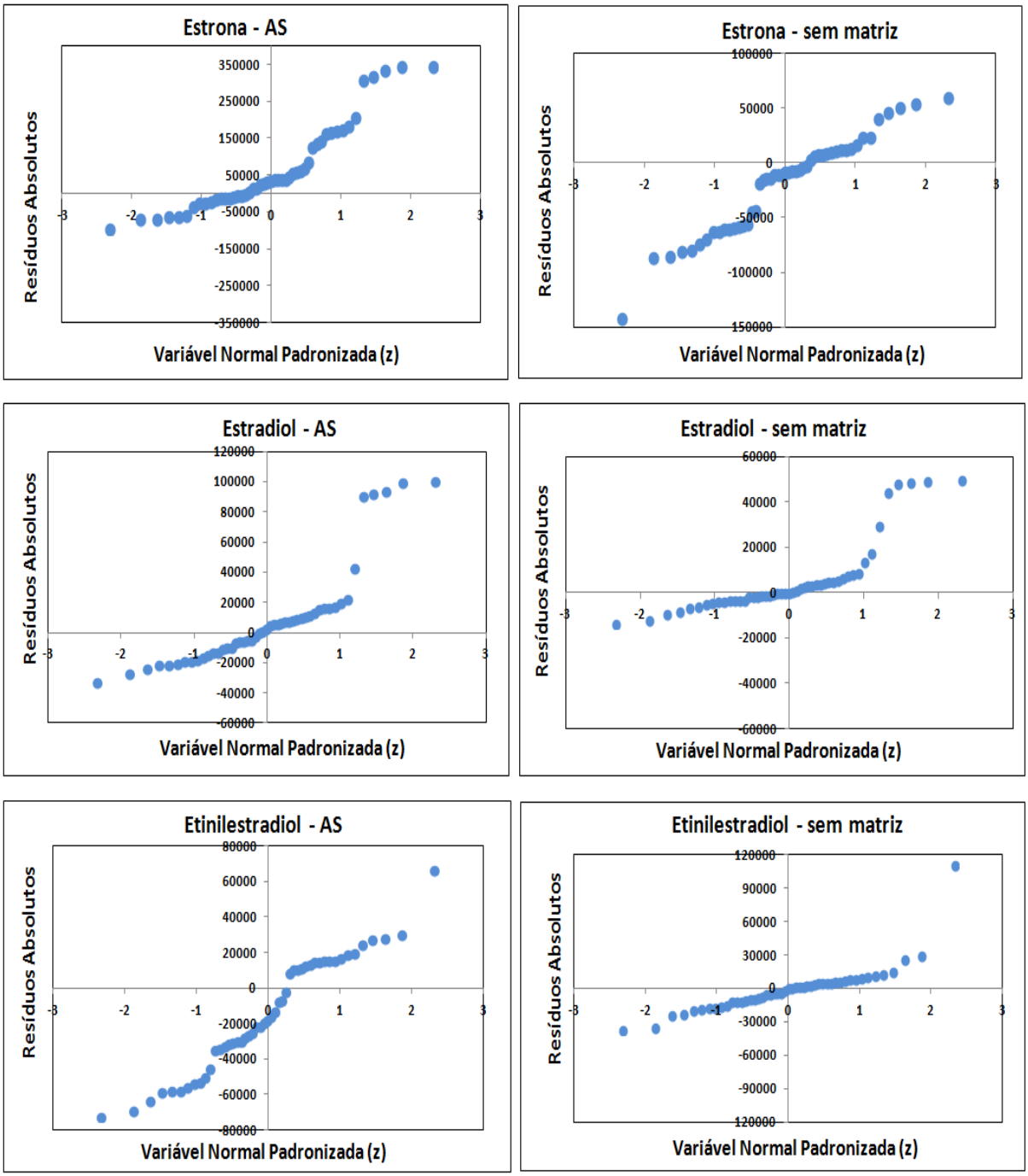

Figura 7.7: Gráficos de resíduos normalizados para os compostos estrona, estradiol, etinilestradiol em matriz e sem matriz

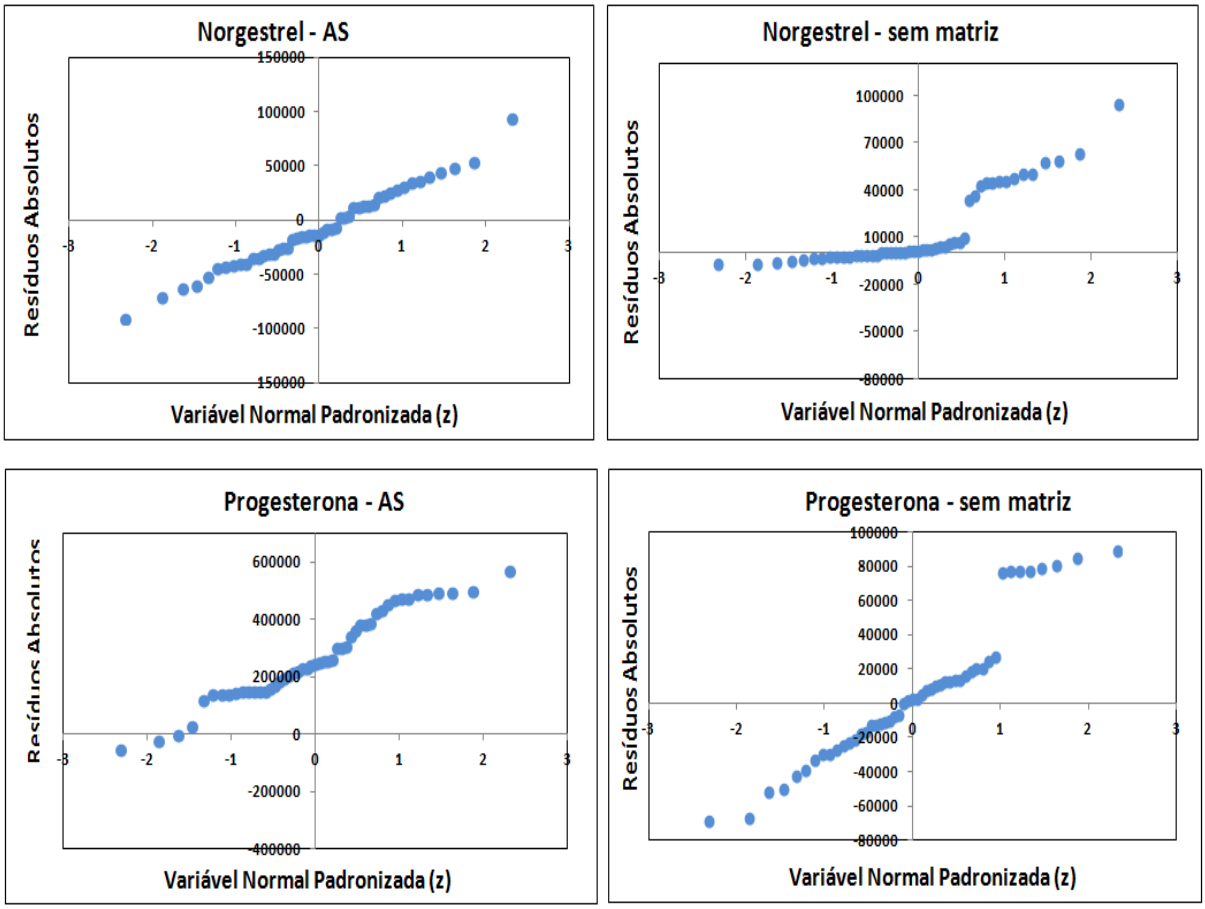

Figura 7.8: Gráficos de resíduos normalizados para os compostos norgestrel e progesterona em matriz e sem matriz

Na FIG. 7.7 e FIG. 7.8, observa-se que os dados não aparentam se distanciar substancialmente da distribuição normal, apresentando algumas flutuações devido ao fato de estar trabalhando com pequenas amostras e apresentando um comportamento próximo ao linear. Assim conclui-se que não há a necessidade de se preocupar com o afastamento do pressuposto da normalidade dos erros.

Para o último pressuposto, a igualdade das variâncias, esta análise pode ser realizada observando a FIG. 7.4, FIG. 7.5 e FIG. 7.6, utilizadas na verificação do pressuposto de linearidade. Nestas figuras pode-se observar que não existe diferenças significativas em termos da variabilidade nos resíudos para diferentes concentrações. Com

isso conclui-se que não existe uma violação aparente no pressuposto da igualdade de variâncias em cada um dos níveis de concentrações.

Observando somente os coeficientes de correlação de Pearson na FIG. 7.2 e FIG. 7.3 e pela avaliação dos pressupostos, pode-se dizer que há relação linear entre as variáveis quantitativas x e y. Porém, além de investigar a relação linear através desses itens, pode-se avaliar a qualidade do modelo de regressão pela realização de inferências estatísticas sobre seus parâmetros, isto é, sobre o coeficiente angular da reta (β). Para tanto, utilizou-se a equação 7.1, dada por:

$$t = r\sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}} \tag{7.1}$$

sendo a hipótese nula dada por $H_0 : \beta = 0$ e a hipótese alternativa $H_1 : \beta \neq 0$, onde t é a distribuição t de Student com (n-2) graus de liberdade, n é o tamanho amostral e r é o coeficiente de correlação entre x e y (Levine, 2008). Se $t_{calc} > t_{tab}$ rejeita-se H_0, conlcuindo com risco α que há regressão linear entre as variáveis, porém se $t_{cal} < t_{tab}$ não se rejeita H_0, concluindo com risco α que não há regressão linear.

Outra forma de realizar o teste de existência de regressão linear é a utilização da análise das variâncias, ou seja, fazer o estudo do comportamento das variações totais, explicadas e residuais (ver secção 4.10). Para a realização deste teste fez-se uso da hipótese nula ($H_0 : \beta = 0$) e da hipótese alternativa ($H_1 : \beta \neq 0$), utilizando o teste F onde se $F_{calc} > F_{tab}$ rejeita-se H_0, concluindo com risco α que existe regressão linear. Caso $F_{cal} < F_{tab}$ não rejeita-se H_0, concluindo com risco α que não existe regressão linear.

Pela TAB. 7.5, percebe-se que todos os valores de F calculados para a regressão ($F_{1,12,95\%} = 4,75$) foram superiores ao valor de F_{tab} rejeitando-se H_0 e concluindo-se com risco de 5% que há regressão linear entre a área dos picos e a concentração. Com respeito aos valores de F calculados para o ajute $F_{5,7,95\%} = 3,97$, percebe-se que os valores foram todos superiores ao F_{tab}, e como a variável independente x (concentração), explica os possíveis erros da variável dependente y (áreas), observa-se que aproximadamente 99% da variação nas áreas é explicada pela variação nas concentrações.

Tabela 7.5: Resultados da análise de variância (ANOVA) para os cinco compostos de estudo na matriz de água subterrânea

Composto	F_{calc}		% de variação explicada	% máxima de variação explicável
	Regressão F_{tab}=4,75	Ajuste F_{tab}=3,97		
Estrona	786,24	48,2	98	100
Estradiol	316,4	205,72	97	100
Etinilestradiol	481,74	7,86	98	100
Norgestrel	73,08	39,71	86	100
Progesterona	464,81	32,54	97	100

Um último item a ser considerado com respeito a linearidade do modelo, é que devido ao modelo de regressão ter apresentado elevados coeficientes de determinação e também ter obtido êxito sobre a existência de relação linear, pode-se utilizar o modelo encontrado nos ensaios em solvente para realizar previsões de y (área), dado os valores de x (concentrações). Para isto fez-se uso do intervalo de confiança para a média de y, dado por:

$$\widehat{y}(x) \pm t_{\frac{\alpha}{2}} S \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x-\overline{x})^2}{\sum (x-\overline{x})^2}}. \tag{7.2}$$

Com isso estima-se a área média da amostra dado um valor de concentração, com 95% de confiança. Estes resultados podem ser observados na FIG. 7.2.2 e FIG. 7.9:

Contudo, para que as previsões da estimativa de y sejam mais precisas devem ser tomados alguns critérios, com respeito aos valores dos intervalos de confiança, sendo estes critérios, quanto menor for S (desvio padrão) menor será a dispersão dos valores observados de y em torno da reta de regressão; quanto maior for o tamanho da amostra menor serão as flutuações.

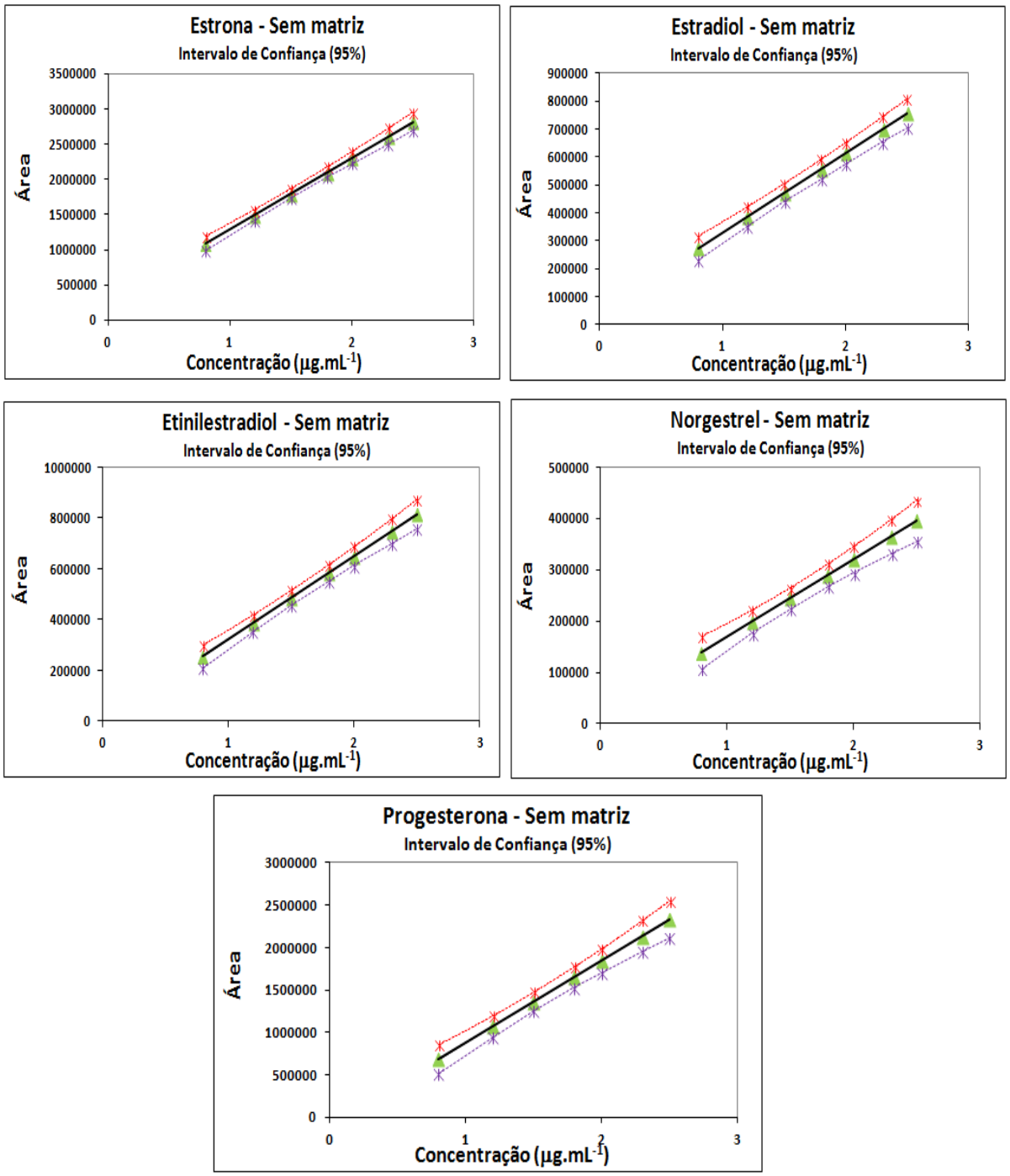

Figura 7.9: Gráficos de intervalo de confiança para o composto progesterona somente em solvente

7.2.3 Limite de detecção/Limite de quantificação

Os valores do limite de detecção e quantificação foram determinados pelo desvio padrão das replicatas (n=7) da menor concentração dos analitos adicionados na matriz e em solvente. Primeiramente foram injetados os padrões mix em baixas concentrações até ser encontrado o limite de detecção do aparelho. Em seguida com o desvio padrão das sete replicatas da menor concentração dos analitos em matriz e em solvente, foi possível calcular o limite de detecção utilizando a equação 7.5 secção 5.3.

O limite de quantificação foi calculado utilizando as médias das sete replicatas da menor concentração do analito seguindo a equação 7.7 secção 5.3. Não foram descartados pontos outilers para os cálculos.

Na TAB. 7.6 e TAB. 7.7 estão apresentados os valores dos limites de detecção e quantificação do método para as análises em água subterrânea (AS) e em solvente.

Tabela 7.6: Limite de detecção e quantificação para os cinco compostos estudados em matriz de água subterrânea (AS)

Composto	Limite do método - Água subterrânea (AS)	
	LD ($\mu g.L^{-1}$)	LQ ($\mu g.L^{-1}$)
Estrona	0,062	0,942
Estradiol	0,137	1,158
Etinilestradiol	0,136	1,160
Norgestrel	0,498	1,033
Progesterona	0,029	1,343

Tabela 7.7: Limite de detecção e quantificação para os cinco compostos estudados em solvente

Composto	Limite do método - Sem matriz	
	LD ($\mu g.L^{-1}$)	LQ ($\mu g.L^{-1}$)
Estrona	0,030	0,879
Estradiol	0,020	0,833
Etinilestradiol	0,043	0,916
Norgestrel	0,116	1,081
Progesterona	0,024	1,125

7.2.4 Precisão

A precisão foi avaliada através da reprodutibilidade (R), repetitividade (r) e pelo coeficiente de variação (CV). Para este estudo as amostras foram injetadas pelo mesmo analista, no mesmo instrumento, sob as mesmas condições de análise e mesmo local.

A TAB. 7.8 apresenta os valores para o coeficiente de variação (CV) das sete replicatas no ensaio com a matriz em três níveis de concentração (baixa, média e alta), estando estes valores abaixo de 20%, os quais são valores aceitáveis pelo INMETRO (2011).

Tabela 7.8: Coeficientes de variação para os cinco compostos estudados em três níveis de concentração em ensaio com matriz de água subterrânea (AS)

Composto	Valores do Coeficiente de Variação (CV)		
	Baixa	Média	Alta
Estrona	3,07	1,22	0,93
Estradiol	2,59	2,10	1,84
Etinilestradiol	1,48	0,81	0,85
Norgestrel	3,19	2,61	2,30
Progesterona	0,93	2,28	3,28

Com respeito a repetitividade (r) e a reprodutibilidade (R), os testes foram rea-

lizados pela análise em setuplicata da solução mix dos padrões na matriz de água subterrânea em três níveis de concentração, sendo que para a avaliação da reprodutibilidade os ensaios foram realizados em dias diferentes, enquanto para a avaliação da repetitividade os ensaios foram realizados no mesmo dia. Utilizou-se para os cálculos o limite de reprodutibilidade (R) e o limite de repetitividade conforme descritos na seção 5.4. A TAB. 7.9 e TAB. 7.10 apresentam os valores encontrados para R e r respectivamente.

Tabela 7.9: Valores do limite de repetitividade (r) para os cinco compostos em três níveis de concentração no ensaio com matriz de água subterrânea (AS)

Composto	**Limite de repetitividade (r)**			
		Baixa	Média	Alta
Estrona	$S_{replicatas}$	0,025	0,014	0,023
	r	0,071	0,040	0,065
Estradiol	$S_{replicatas}$	0,030	0,042	0,043
	r	0,085	0,119	0,121
Etinilestradiol	$S_{replicatas}$	0,030	0,018	0,022
	r	0,084	0,051	0,061
Norgestrel	$S_{replicatas}$	0,035	0,034	0,052
	r	0,099	0,095	0,145
Progesterona	$S_{replicatas}$	0,012	0,044	0,087
	r	0,033	0,124	0,087

Tabela 7.10: Valores do limite de reprodutibilidade (R) para os cinco compostos em três níveis de concentração no ensaio com matriz de água subterrânea (AS)

Composto	Limite de reprodutibilidade (R)			
		Baixa	Média	Alta
Estrona	$S_{replicatas}$	0,009	0,006	0,010
	R	0,026	0,016	0,029
Estradiol	$S_{replicatas}$	0,010	0,015	0,020
	R	0,030	0,043	0,056
Etinilestradiol	$S_{replicatas}$	0,013	0,011	0,008
	R	0,035	0,031	0,021
Norgestrel	$S_{replicatas}$	0,020	0,014	0,031
	R	0,056	0,041	0,088
Progesterona	$S_{replicatas}$	0,004	0,024	0,026
	R	0,012	0,068	0,074

Segundo Chui e colaboradores (Chui et al., 2009), para que a metodologia apresente repetitividade e reprodutibilidade, os valores de r e R devem ser superiores à diferença entre as replicatas. Portanto, pelos valores da TAB. 7.9 e TAB. 7.10, verifica-se que a metodologia proposta é precisa, uma vez que todos os valores de r e R são superiores aos seus respectivos desvios padrão.

7.2.5 Exatidão

O ensaio para avaliação da exatidão consistiu em obter o valor do escore z, sendo este valor considerado adequado quando $|z| \leq 2$. O ensaio foi realizado em matriz de água subterrânea na menor concentração de trabalho, obtendo com isso os valores de z conforme descrito na TAB. 7.11:

Pelos resultados descritos na TAB. 7.11, percebe-se que o método apresentou valores de z inferiores a 2 em ambos os ensaios, conluindo que o método analítico possui exatidão, não havendo valores extremos.

Tabela 7.11: Resultado do teste escore z para os cinco compostos estudados na matriz de água subterrânea (AS) e no ensaio sem matriz

Composto	z Score	
	Matriz AS	Sem matriz
Estrona	0,621	1,245
Estradiol	1,407	0,993
Etinilestradiol	1,486	1,697
Norgestrel	1,629	0,766
Progesterona	1,864	0,473

7.2.6 Recuperação

O ensaio para a avaliação da recuperação foi realizado com 500 mL de água subterrânea fortificada com a solução mix dos cinco compostos em nível baixo de concentração. A tabela 7.12 apresenta os resultados obtidos para o teste de recuperação no ensaio com matriz.

Tabela 7.12: Índice de recuperação para os cinco compostos estudados

Composto	Recuperações (%) - Matriz AS
	Concentração baixa
Estrona	86
Estradiol	94
Etinilestradiol	105
Norgestrel	105
Progesterona	70

Observando os valores contidos na TAB. 7.12 verifica-se que as porcentagens de recuperação variaram de 70 a 120% estando estes dentro da faixa recomendada pela literatura, que é de 70 a 120% para análises de resíduos, ou de 50 a 120% para amostras complexas (Ribani et al., 2004).

7.2.7 Robustez

A robustez do método cromatográfico para quantificação dos cinco compostos foi avaliada por meio do teste de Youden (INMETRO, 2011). A influência de sete parâmetros analíticos (mistura extratora, pH da amostra, temperatura do injetor, temperatura da interface, cartucho, fluxo da coluna e volume de extração) foi avaliada em oito experimentos conforme descrito na seção 5.7. O resultado gerado sobre a forma de gráficos de barras FIG. 7.10 e FIG. 7.11, mostram os efeitos dessas variações sobre o método.

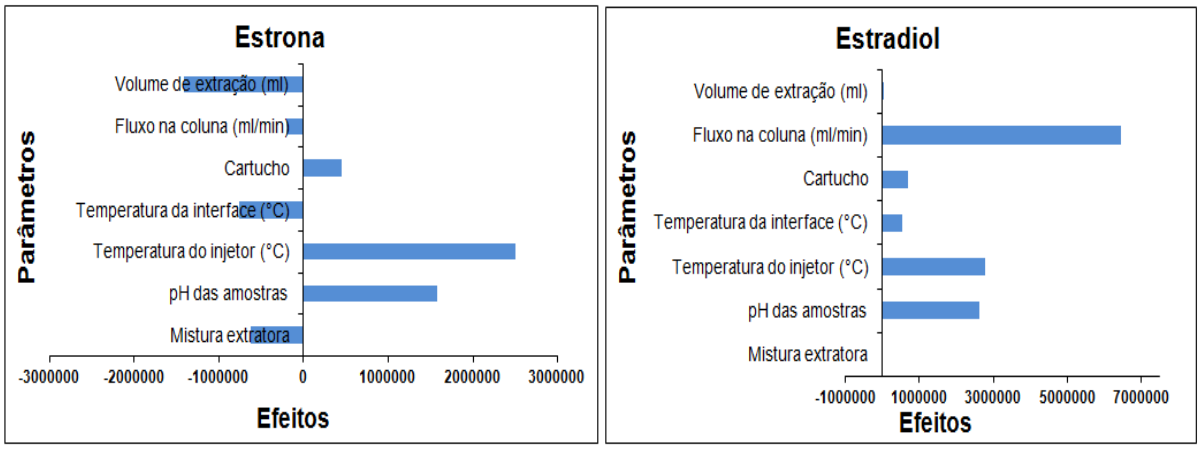

Figura 7.10: Gráficos para estrona, estradiol representando o teste de Youden

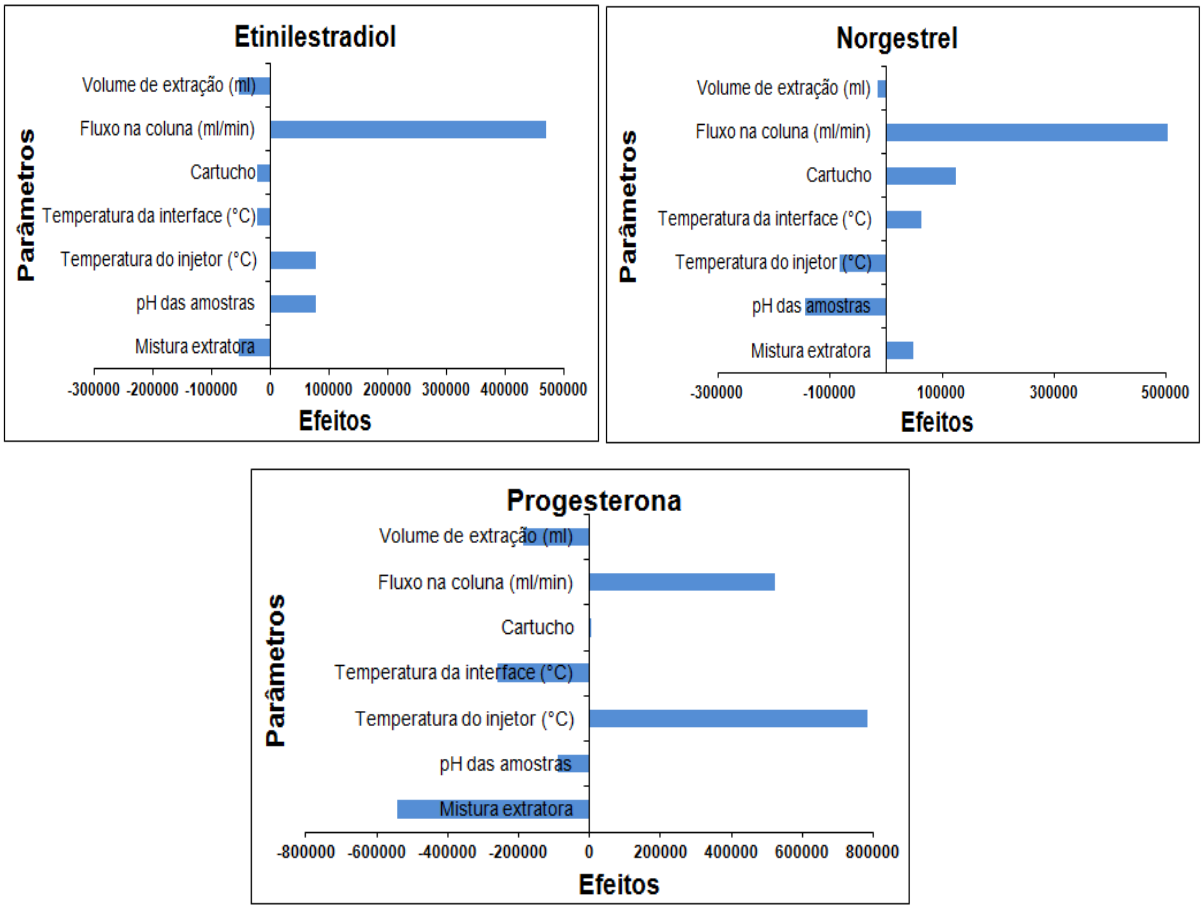

Figura 7.11: Gráficos para etinilestradiol, norgestrel e progesterona representando o teste de Youden

Os resultados dos oito ensaios foram obtidos a partir da média dos quatro valores correspondentes às variações, menos a média dos quatro valores obtidos nas condições nominais, conforme equação 5.16 e descritos pela FIG. 7.10 e FIG. 7.11.

De acordo com os gráficos de significância dos efeitos, onde o eixo x corresponde a área dos picos, observa-se que o método adotado se mostrou robusto em relação as variações que foram induzidas, sendo que o fator de maior influência positiva para a maioria dos compostos foi a temperatura do injetor para a estrona, o estradiol e a progesterona e em menor escala para o etinilestradiol. Um dos parâmetros de grande interesse neste estudo da robustez foi com respeito ao carutcho, no qual fez-se o uso do

cartucho Strata-X e do cartucho C18, para verificar qual deles teria melhores resultados com respeito a extração dos compostos. Os resultados obtidos para os compostos estrona, estradiol e norgestrel, foram favoráveis ao cartucho Strata-X, porém como o teste de recuperação para os cinco compostos utilizando o cartucho Strata-X foram satisfatórios, não há a necessidade da troca do cartucho para realização dos ensaios. Com respeito aos fatores de maior influência negativa estes foram, a mistura extratora e o volume de extração.

Os gráficos descritos na FIG. 7.12 e FIG. 7.13 são os gráficos de probabilidade normal e os gráficos de rankit, respectivamente.

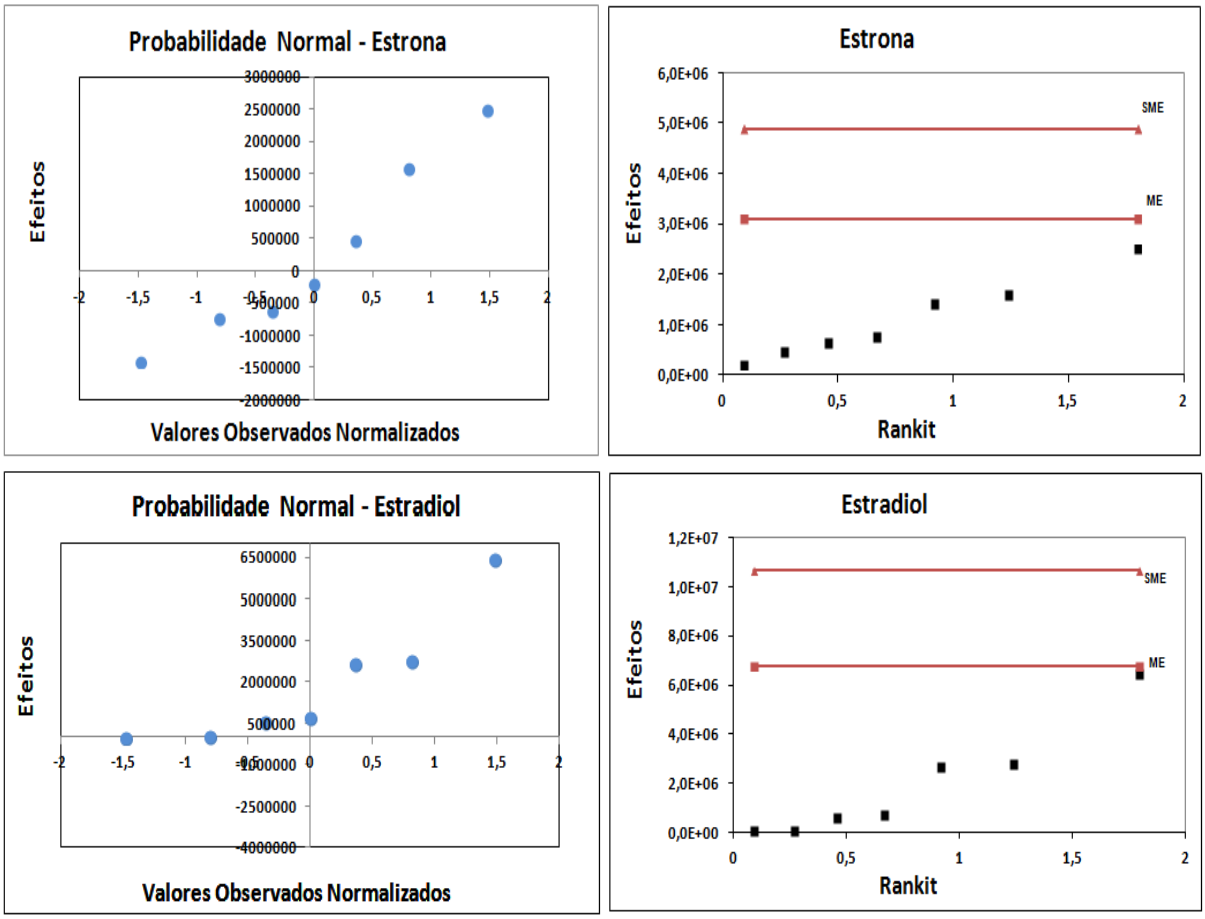

Figura 7.12: Gráficos de probabilidade normal e rankit para os compostos estrona e estradiol

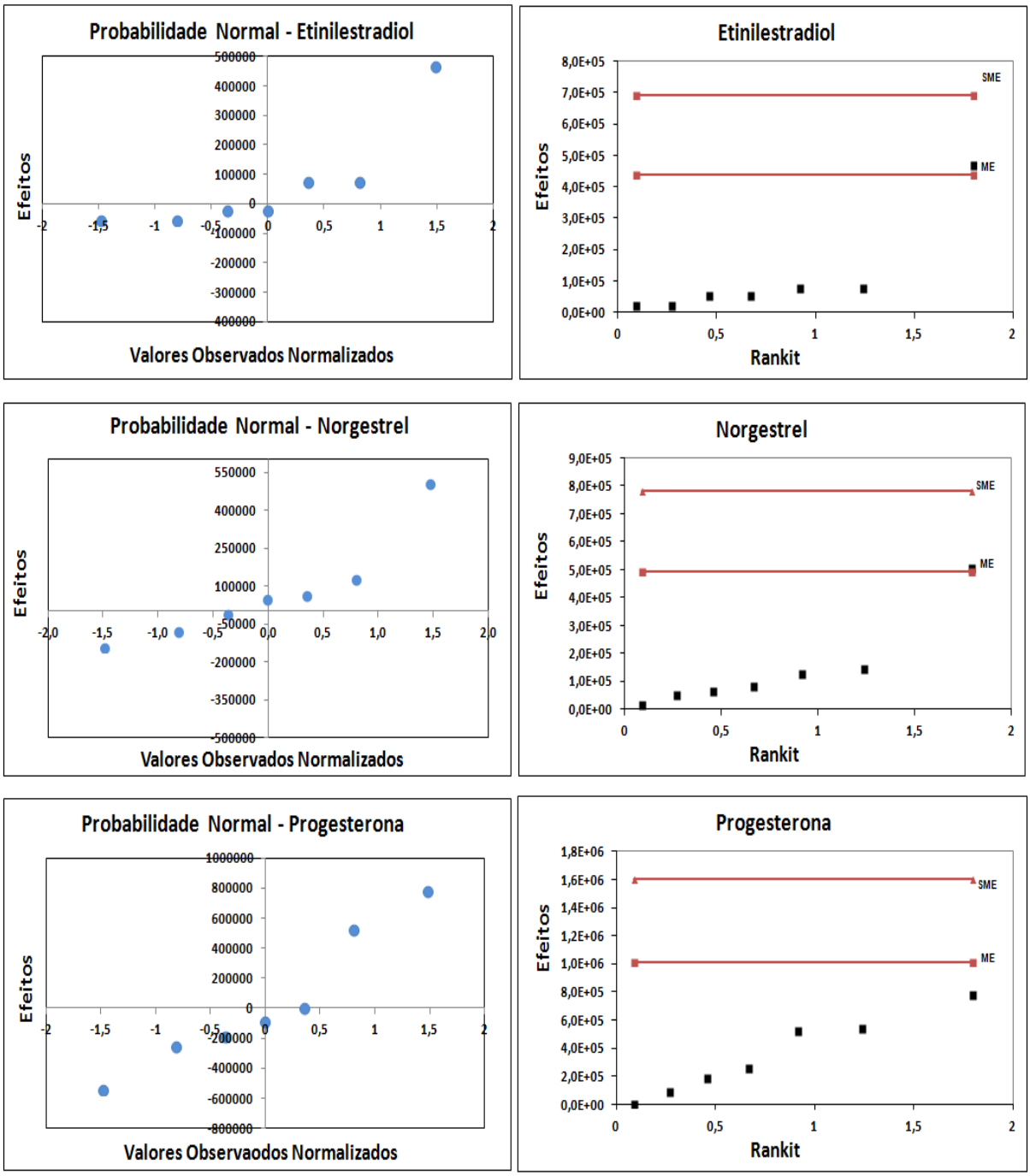

Figura 7.13: Gráficos de probabilidade normal e rankit para os compostos etinilestradiol, norgestrel e progesterona

Pode-se concluir também, que quanto maior for a área dos picos a metodologia desenvolvida será a mais favorável e quanto mais próximos os valores estiverem do eixo vertical tanto faz a metodologia adotada, isto é, com as variações ou sem as variações.

Pelos gráficos de probabilidade normal observa-se que os valores não aparentaram se distanciar da distribuição normal estando os valores dentro da faixa de -2 a 2, que corresponde ao intervalo 2σ, isto é, intervalo de 97,5% de confiança. Já os gráficos de rankit que foram obtidos pelo designer de Plackett-Burman (N=8) e pelo algoritmo de Dong, o qual nos forneceu os valores da margem de erro (ME) e a margem de erro simultânea (SME), mostram que os efeitos estão abaixo das duas margens de erros para os compostos estrona, estradiol e progesterona e acima da margem de erro para os compostos etinilestradiol e norgestrel. Porém como esses valores não estão acima da margem de erro simultânea não há a necessidade de descartar esse efeito. Na prática a margem de erro (ME) é recomendada como o critério de decisão de todos os efeitos calculados no teste de robustez, embora haja uma probabilidade maior para as decisões de falsos positivos. Por isso, para reduzir essa probabilidade, faz-se o uso da margem de erro simultânea.

Assim conclui-se que as variações aplicadas não afetaram de forma significativa os resutados, sendo o método reprodutível, e não havendo a necessidade de alterações na metodologia.

7.2.8 Resultados da avaliação das amostras de água subterrânea

Os resultados obtidos nas análises da água subterrânea, estiveram abaixo dos limites de quantificação (LQ), não sendo detectado nenhum dos compostos de estudo nas amostras, conluindo-se que as amostras não estão contaminadas por hormônios sexuais femininos.

Capítulo 8

Conclusões

- No presente trabalho o principal objetivo foi avaliar a qualidade das águas dos poços do IPEN, com respeito a presença dos hormônios estrona, estradiol, etinilestradiol, norgestrel e progesterona, sendo comprovado ao final do desenvolvimento do trabalho que não houve a presença de nenhum desses compostos nas análises de águas subterrâneas nas condições estabelecidas.

- O método analítico adaptado de Otomo (2010), consistiu de extração em fase sólida utilizando os cartuchos Strata-X, os quais são cartuchos contendo adsorventes poliméricos diferentes dos cartuchos C18 que são comumente utilizados nos laboratórios do CQMA. Os índices de recuperações utilizando os cartuchos Strata-X estiveram entre 105% para todos os compostos, estando dentro da faixa recomendada pela literatura para matrizes ambientais. Estes resultados mostram que o cartucho C18 pode ser trocado pelo cartucho Strata-X para análise desses compostos.

- A otimização do trabalho foi realizada com respeito a quantidade de amostra utilizada na extração em fase sólida, onde o volume utilizado foi de 500 mL em vez de 1L de amostra, bem como minimizou-se a quantidade de solventes utilizados no desenvolvimento do trabalho. Com respeito ás condições cromatográficas, o que foi modificado foi a temperatura inicial da coluna, de 80°C para 100°C diminuindo

em 2 minutos o tempo de análise no CG/EM para ter uma maior quantidade de análises por dia. Os outros parâmetros foram mantidos os mesmos.

- Revisando a literatura percebeu-se que são poucos os trabalhos que explicam como são feitas as escolhas das ferramentas estatísticas para realizar a validação da metodologia e de como elas funcionam. Assim tivemos a pretenção de elucidar o uso destas ferramentas, através de um estudo detalhado da planilha eletrônica de Furusawa. Neste estudo foram avaliados cada um dos parâmetros em especial a seletividade onde foram utilizados os testes de hipotéses t e F e a linearidade, na qual a análise de regressão foi utilizada para avaliar a correlação linear entre as variáveis x e y do modelo adotado, para a quantificação das análises.

- Os resultados obtidos na validação do método estiveram dentro dos padrões estabelecidos em outras literaturas (Otomo, 2010). Todos os compostos apresentaram coeficientes de determinação superiores a 0,99. O modelo de regressão adotado satisfez os quatro pressupostos necessários para verificar a correlação linear. Os limites de detecção encontrados variaram de 0,062 a 0,498 $\mu g.L^{-1}$ e os limites de quantificação foram de 0,942 a 1,343 $\mu g.L^{-1}$.

- O método mostrou ser preciso com coeficientes de variação de 0,93 a 3,28 nas concentrações baixa, média e alta, estando todos os valores abaixo de 20% que são os valores aceitáveis pelo INMETRO. Os índices z score do método foram todos inferiores a 2 mostrando que o método analítico possui exatidão. Finalmente conlui-se que o método mostrou ser robusto.

Capítulo 9

Considerações finais

Como no Brasil e em outros países não há nenhuma legislação que define os parâmetros e as concentrações aceitvéis de interferentes endócrinos, dentre os quais estão incluidos os hormônios em águas, o presente trabalho demonstra a importância de serem realizadas leis que regulamentam a quantidade permitida desses compostos em águas e em outras matrizes ambientais, bem como novas técnicas de remoção e identificação.

9.1 Trabalhos futuros

Pretende-se dar continuidade aos estudos em um possível trabalho de doutorado, onde podem ser aprimorados os procedimentos para a extração e clean-up das amostras, utilizar outros tipos de fonte de ionização e avaliar outros compostos presentes em águas ou em outras matrizes.

Referências Bibliográficas

[1] AGÊNCIA BRASILEIRA DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS (ABAS). *Caderno Técnico,* **nº 5,** 2012.

[2] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RE nº899. (2003).

[3] ARAUJO, JULIANA C. Estudo da eficiência de tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara-SP na remoção de hormônios sexuais. *Dissertação de mestrado, USP São Carlos,* (2006).

[4] BABIC, S.; MUTAVDZIC, PAVLOVIC D.; ASPERGER, D.; PERISA, M.; ZRNCIC, M.; HORVAT, A.J.; KASTELAN-MACAN, M. Determination of multi-class pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* **398,** (2010), 1185-1194.

[5] BECK, JOSEFINE; TOTSCHE, KAI UWE; KOGEL-KNABNER, I. A rapid and efficient determination of natural estrogens in soils by pressurised liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere,* **71** (2008), 954-960.

[6] BECK,I.C.; BRUHN, R.; GANDRASS, J.; RUCK, W. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea. *Jounal of Chromatography,* **1090** (2005), 98-106.

[7] BEHERA, S.K.; KIM, H.W.; OH, JEONG-EUN; PARK, HUNG-SUCK. Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in

wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. *Science of the total environmental,* **409** (2011), 4351-4360.

[8] BELAND, P.; PEGUISE, S.; CIRARD, A.; LAGACEE, A.; MARTINEAU, D.; MICHAUP, R.; MUIR, D.; NORSTROM, R.; PELLETIER, E.; RAY, S.; SHUGART, L. Toxic compounds and health and reproductive effects in St Lawrence beluge whales. Apud COLBORN et al. O futuro roubado *Journal of Great Lakes Research,* **19 nº 4** (1997), 766-775.

[9] BELFROID, A. C.; VAN DER HORST, A.; VETHAAK, A. D. et al. Analysis and Occurrence of Estrogenic Hormones and their Glucuronides in Surface Water and Waste Water in The Netherlands. *The Science Total Environment ,* **225** (1999), 101-108.

[10] BENNETTS, H.; UNDERWOOD, E.; SHIER, F. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in western, Australian. O futuro roubado. *Veterinary Journal,* **22** (1997), 2-12.

[11] BERGERON, J. M., CREWS, P., McLACHLAN, J. A. PCBs as environmental estrogens: Turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination. *Environmental Health Perspectives,* **102** (1994), 780-781.

[12] BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process. *Lewis Publishers,* (2003).

[13] COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). Guia de coleta e preservação de amostras de água. **1ª ed., São Paulo** (1987), 155p.

[14] COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). Norma 6410 - Amostragem e monitoramento das águas subterrâneas. **São Paulo** (1988), 32p.

[15] CHERNICHARO, C.A. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Reatores Anaeróbios *Belo Horizonte, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental-UFMG,* 2007.

[16] CHIU, S. H.; BARROS, C. B.; SILVA, T.D. Parâmetros r e R obtidos de programa interlaboratorial - como usá-los. *Química Nova,* **vol. 32** (2009), 2209-2213.

[17] CHIU, T. Y.; KOH, Y. K. K.; PATERAKIS, N.; BOOBIS, A. R.; CARTMELL, E.; RICHARDS, K. H.; LESTER, J. N.; SCRIMSHAW, M. D. The significance of sample mass in the analysis of steroid estrogens in sewage sludges and the derivation of partition coefficients in wastewaters. *Journal of Chromatography A,* **1216** (2009), 4923-4926.

[18] COLBORN, T.; VOM SAAL, F. S.; SOTO, A. M. Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans. *Environmental Health Perspectives,* **101 nº 5** (1998), 378-384.

[19] COLLINS, CAROL H., BRAGA, GILBERTO B., BONATO, PIERINA S. Fundamentos de cromatografia. *Editora da Unicamp* (2009), 203-270.

[20] COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS. Estratégia comunitária em matéria de desreguladores endócrinos - substâncias suspeitas de interferir com os sistemas hormonais dos seres humanos e dos animais. *COM,* **706** (1999).

[21] CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Resolução n. 357,* 2005.

[22] CORDEITO, DANIELA. Uso de bioindicador de efeito endócrino e validação do método para determinação de hormônios na água da Represa Municipal de São José do Rio Preto. *Dissertação de mestrado - USP São Carlos,* (2009).

[23] DORABAWILA, N.; GUPTA, G. Endocrine disrupter estradiol in Chesapeake Bay tributaries. *Journal of Hazardous Materials,* **A 120** (2005), 67-71.

[24] EKAMN, R.; SILBERRING, J.; WESTMAN-BRINKMALM, A.M.; KRAJ, A. Mass spectrometry, instrumentation, interpretation and applications. *Wiley, USA,* 2008.

[25] ESTATÍSTICA III - notas de aula. *Departamento de estatística, UFPR,* (2009).

[26] ESPERANZA, MAR; SUIDAN, M. T.; MARFIL-VEGA, RUTH; GONZALEZ, CRISTINA; SORIAL, G. A; McCAULEY, PAUL; BRENNER, RICHARD. Fate of sex hormones in two pilot-scale municipal wastewater treatment plants: Conventional treatment. *Chemosphere,* **66** (2007), 1535-1544.

[27] FERNANDES, R. Estudos de remoção de 17 α-etinilestradiol de águas para abastecimento, utilizando dióxido de cloro, hipoclorito de sódio, carvão ativado em pó e tratamento fisico-químico. *Dissertaç ão de mestrado em Engenharia Civil, Unicamp,* 2007.

[28] FOLMAR, L.C.; HEMMER, M.; BOWMAN, C.; DESBROW, N.D. Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol and deithylestilestrol in an in vivo male sheepshead minnow (Cyprinodon variegates), vitellogenin biossay. *Aquat. Toxicology,* **49** (2000), 77-88.

[29] FOSTER, S.; HIRATA, R..; GOMES, D.; DÈLIA, M.; PARIS, M. Protección de la Calidad del Agua Subterránea: guia para empresas de agua, autoridades municipales y agencias ambientales. *Mundi-Prensa Libros,* 2002.

[30] FURUSAWA, H. A. Validação de Ensaios Químicos. IPEN-CNEN-SP, (adaptação eletrônica baseada no documento DOQ-CGCRE-008 de 01/03/2003 do INMETRO). *São Paulo,* 2007.

[31] GABET, V.G.; MIEGE, C.; HERBRETEAU, B.; HERNANDEZ, G.R.; COQUERY, M. Development and validation of an analytical method by LC-MS/MS

for the quantification of estrogens in sewage sludge. *Anal. Bioanal. Chem.,* **396** (2010), 1841-1851.

[32] GEROLIN, ELEONILCE, R.R. Ocorrência e remoção de disruptores endócrinos em águas utilizadas para abastecimento público de Campinas e Sumaré. *Tese de doutorado, UNICAMP,* 2008.

[33] GHISELLI, GISLAINE. Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos e produtos de higiene. *Tese de doutorado, Campinas,* (2006).

[34] GINEYS, N.; GIROUD, B; VULLIET, E. Analytical method for the determination of trace levels of steroid hormones and corticosteroids in soil, based on PLE/SPE/LC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.,* **397** (2010), 2295-2302.

[35] GUIA EURACHEM. Determinando a incerteza na medição analítica. *2ed. versão brasileira,* (2002).

[36] GUILLETTE, L.; GROSS, T.; MASSON, G. R.; MATTER, J. M.; PERCIVAL, H. F.; WOODWARD, A. R. Development abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environmental Health Perspective,* **102** (1994), 680-688.

[37] Google Earth, visualizado em 01/03/2013.

[38] GROSS, J. H. Mass spectrometry: a textbook. *Springer Verlag,* (2004), 518p.

[39] GUZELIAN P. Fourteen workers exposed to pesticide kepon are probably sterile, researchers report. O futuro roubado *Occupational Health and Letters,* **6 nº 2** (1997).

[40] HARRIS, D.C. Quantitative Chemical Analysis. *W. H. Freeman and Company,* **7ª ed.** (2007).

[41] HARRIS, J.E; SHECHAN, D.Q.; JOBLING, S.; MATHIESSEN, P.; NEALL, P.; ROUTLEDGE, E.J.; RYCROFT, R.; SUMPTER, Y.P.; TYLOR, T.A. A survey of estrogenic activity in United Kingdom island waters. *Enviromental Toxicology and Chemistry,* **15 nº 11** (1996), 1993-2002.

[42] HERBST, A.; ULFELDER, H.; POSKANZER Adenocarcinoma of the vagina: association of maternal estilbestrol therapy with tumor appearance in young women. New England of Medicine. O futuro roubado. *RSL and PM,***284** (1997), 878-881.

[43] HILTON, M.J. et. al. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance líquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A,* **1015** (2003), 129-141.

[44] HU, JIANYING; ZHANG, H.; CHANG, H. Improved method for analysing estrogens in water by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A,* **1070** (2005), 221-224.

[45] HYLLAND, K.; HAUX, C. Effects of environmental estrogens on marine fish species. *Trends in Analytical Chemistry,* **16 nº 10** (1997).

[46] INGRAND, VALERIE; HERRY, G.; BEAUSSE, J.; de ROUBIN, MARIE-RENEE. Analysis of steroid hormones in effluents of wastewater treatment plants by liquid chromatoraphy-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A,* **1020** (2003), 99-104.

[47] INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZACAO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos, DOQ-CGCRE-008. **Revisão 04** (2011).

[48] INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS). Global Assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors.**Report 2002** (2002).

[49] ISOBE,T.; SHIRAISHIA,H.; YASUDAB, M.; SHINODAB, A. Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A,* **984** (2003), 195-202.

[50] JOBLING, S.; NOLAN, M.; TYLER, C. R.; BRIGHTY, G.; SUMPTER, J. P. Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. *Environmental Science Technology,* **32** (1998), 2498-2506.

[51] JOHNSON, A.C.; SUMPTER, J.P. Removal of Endocrine-Disrupting Chemicals in Activated Sludge Treatment Works *Environmental Science Technology,* **vol.35** (2001), 4697-4703.

[52] JOHNSON, A.C.; BELFROID, A.; DI CORCIA, A. Estimating steroid estrogen input into activated sludge treatment works and observation on their removal from the effluent. *Science of the Total Environment,* **256** (2000), 163-173.

[53] JONES, A.J.; LESTER, J.N.; VOULVOULIS, N. *Trends Biotechnology,* **23** (2005), 163-167.

[54] KASSAB, N. Determinação de hormônios esteróides em contraceptivos orais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). *Dissertação de mestrado em toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP,* (2001).

[55] KHANAL, S.K.; XIE, B.;THOMPSON, M.L.; SUNG, S.; ONG, S.K.;LEEUWEN, V. Fate, Transport, and Biodegradation of Natural Estrogens in the Environment and Engineered Systems. *Environmental Science e Tecnology,* **v.40 n. 21,** 2006, 6547-6556.

[56] KOH, Y.K.K.; CHIU, T.Y.; BOBBIS, A.; CARTMELL, E.; LESTER, J.N.; SCIMSHAWC, M.D. Determination of steroid estrogens in wastewater by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A,* **1173** (2007), 81-87.

[57] KUMMERER, K. *Environm. Manag.,* **90** (2009), 2354-2366.

[58] KUSTER, M.; AZEVEDO, D.A.; DE ALDA, LÓPEZ; NETO, AQUINO; BARCELÓ, D. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogns in environmental waters from Rio de Janeiro (Brasil). *Environmental International,* **35** (2009), 997-1003.

[59] KUSTER, M.; DE ALDA, M. L.; HERNANDO, M. D.; PETROVIC, M.; MARTÍN-ALONSO, J.; BARCELÓ, D. , Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *Journal of Hydrology,* **358** (2008), 112-123.

[60] LABADIE, P.; BUDZINSKI, H. Determination of steroid hormone profiles along the Jalle d Eysines River. *Environmental Science e Technology,* **39 n° 14** (2005).

[61] LACEY, C. et. al. An LC-MS method for the determination of pharmaceuticals compounds in wastewater treatment plant influent an efluent samples. *Talanta,* **75,** (2008), 1089-1097.

[62] LANCAS, FERNANDO M. Extração em fase sólida. *RiMa,* (2004), 96p.

[63] LEVINE, D.M.; STEPHAN, D.F.; KREHBIEL, T.C.; BERENSON, M.L. Estatística - Teoria e aplicações usando o microsoft excell em português. *Editora LTC,* **5 ed.,** (2008).

[64] LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N. et al. Endocrine Disruptors in the Environment (Iupac Technical Report). *Pure and Applied Chemistry,***75 nº 5** (2003), 631-681.

[65] LIU, SHAN; YING, GUANGGUO; ZHAO, Z.; CHEN, F.; YANG, B.; ZHOU, L.; LAI, H. Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A,* **1218** (2011), 1367-1378.

[66] LOOS, R.; GAWLIK, B.M.; LOCORO, G.; RIM AVICIUTE, E.; CONTINI, S.; BIDOGLIO, G. *Environm. Pollut* **157** (2009), 561-568.

[67] LOPES, EDUARDO LUZ. Estudo e determinação das condições experimentais da reação de sililação utilizada na análise multirresíduo de anti-inflamatórios não-esteroidais em matrizes aquosas ambientais por cromatografia a gás acoplada a espcetrometria de massas. *Dissertação de mestrado, UFRG,* (2011).

[68] LOPEZ DE ALDA, M. L.; DÍAZ-CRUZ, S.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *Journal of Chromatography A,* **1000** (2003), 503-526.

[69] LOPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELO, D. Determination of Steroid Sex Hormones and Related Synthetic Compounds Considered as Endocrine Disrupters in Water By Fully Automated on-Line Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Diode Array Detection. *Journal Chromatography A,* **91** (2001), 203-210.

[70] LOPEZ DE ALDA, M.J.L.; BARCELO, D. Use of solid-phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water. *Journal of Chromatography A,* **938** (2001), 145-153.

[71] LOPES, L. Estudo sobre a ocorrência de estrogênios em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal-SP. *Tese de doutorado, Instituto de química-UNESP Araraquara,* (2007).

[72] MACHADO, Karina S. Determinação de hormônios sexuais femininos na bacia do Alto Iguaçu região metropolitana de Curitiba-PR. *Dissertação de mestrado, UFPR,* (2010).

[73] McLACHLAN, J.; NEWBOLD, R.; BULLOCK, B. Reproductive tract lesion in male nice exposed prenatally to diethylstilbestrol. *Science,* **vol.190** (1975), 991-992.

[74] MARTINEAU, D.; BELAND, R.; DEJARDINS, C.; LAGACEE, A. Levels of Organo Chorene Chemical in tissue of beluga whales (Delpinapterus leucas) from the St. Lawrence Estuary, Quebec, Canada. Apud COLBORN et al. O futuro roubado *Actives of Environmental Contamination and Toxicology,* **vol.16** (1997), 137-147.

[75] MASON, C.; FORD, T.; LASTI, N. Organochlorine residues in British Otters Bulletin of environmental contamination and toxicology. O futuro roubado, **vol.36** (1997), 656-661.

[76] MATHIESSEN, PETER. Historical perspective on endocrine disrupter in wildlife. *Pure and Applied Chemistry,* **vol. 75** (2003), 2197-2206.

[77] MELLO, C.A.S.; FRUCHTENGARTEN, L. Riscos químicos ambientais à saúde da criança. *Jornal de Pediatria,* **81** (2005), 205-211.

[78] MORETTIN, P.A.; BUSSAB, W. de O. Estatística Básica. *Ed. Saraiva,* **5ª ed.** (2002), 526p.

[79] NEWBOLD, R.; McLACHLAN, J. Vaginal Adenosi and adenocarcinoma in nice exposed prenatally Neonatally to diethystilbestrol. O futuro roubado. *Cancer Research,* **vol.22** (1997), 2003-2011.

[80] NIE, Y. F., QIANG, Z. M., ZHANG, H. Q., ADAMS, C., Determination of endocrine-disrupting chemicals in the liquid and solid phases of activated sludge by solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A,* **1216** (2009), 7071-7080.

[81] NIETO, A.; BORRULL, F.; POCURULL, E.; MARCÉ, ROSA M. Determination of natural and synthetic estrogens and their conjugates in sewage sludge by pres-

surized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A,* **1213** (2008), 224-230.

[82] NOGUEIRA, J. M. F. Desreguladores Endócrinos: Efeitos adversos e estratégias para monitorização dos sistemas aquáticos. *Química Nova,* **88** (2003), 65-71.

[83] NOPPE, HERLINDE; VERSLYCKE, TIM, Y; De WULF, ERIC; VERHEYDEN, KAROLIEN; MONTEYNE, ELS; VAN CAETER, PETER; JANSSEN, COLIN R.; De BRABANDER, HUBERT F. Occurrence of estrogens in the Scheldt estuary: A 2-year survey. *Ecotoxicology and Environmental Safety,* **66** (2007), 1-8.

[84] OTOMO, J. I. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de hormônios considerados disruptores endócrinos nas águas destinadas ao abastecimento público na região do Rio Parnaíba do Sul. *Dissertação de mestrado, IPEN,* (2010).

[85] PAILLER, J.-Y.; KREIN, A.; PISTER, L.; HOFFMANN, L.; GUIGNARD, C. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg. *Science of the total environmental,* **407** (2009), 4736-4743.

[86] Página visualizada em 01/03/2013 *http://pt.wikipedia.org/wiki/Ciclo-hidrologico.*

[87] PETERSON, E. W.; DAVIS, R. K.; ORNDORFF, H. A. 17β-Estradiol as an Indicator of Animal Waste Contamination in Mantled Karst Aquifers. Journal of Environmental Quality, **29** (2000), 826-834.

[88] PURDON, C.E; HARDIMAN, P.A.; BYE, V.J.; ENO,N.C.; TYLER, C. Estrogenic effects of efluent from sewage treatment works. *J.P. Chem. Ecology,* **vol. 8** (1994), 275-285.

[89] QUEIROZ, FERNANDA B. de. Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de fármacos e perturbadores endócrinos em amostras de esgoto uti-

lizando extração em fase sólida e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, *Dissertação de mestrado, UFOP,* (2011).

[90] RAIMUNDO, C.C.M. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia. *Dissertação de mestrado, Unicamp,* (2007).

[91] RAMAN D.R.; WILLIAMS E.; LAYTON A.C.; BURNS R.; EASTER J.P.; DAUGHERTY A.; MULLEN M.; SAYLER G. Estrogen Content of Dairy and Swine Wastes. *Environmental Science Technology,* vol. 38 (2004), 3567-3573.

[92] RIBANI,M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova,* **27 nº 5** (2004), 771-780.

[93] ROUTLEDGE, E. J.; SHEAHAN, D.; DESBROW, C. et al.. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach. *Enviromental Science Technology,* **32 nº 11** (1998), 1559-1565.

[94] SECRETARIA DE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL (SEMADS). Bacias hidrográficas e recursos hídricos da macrorregiã, Bacia da Baía de Sepetiba. *Cooperaoção técnica Brasil-Alemanha, projeto PLANÁGUA-SEMADS-GTZ,* **Rio de janeiro,** (2001).

[95] SNYDER, S.A. Endocrine disruptors and pharmaceutically active compounds U.S. regulations and research. *International Water Association,* (2002).

[96] SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Occurrence of Emerging Contaminants in Brazilian Drinking Waters: A Sewage-To-Tap Issue. *Water, Air and Soil Pollution,* **206** (2010), 57-67.

[97] SOLÉ, M;, RALDUA, D.; BARCELÓ, D.; PORTE, C. Long-term Exposure Effects in Vitellogenin, Sex Hormones, and Biotransformation Enzymes in Female

Carp in Relation to a Sewage Treatment Works. *Ecotoxicology and Environmental Safety,* **56** (2003), 373-380.

[98] SOUZA, R. R. de. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de disruptores endócrinos resultantes de atividades antrópicas nas águas da região do Rio Parnaíba do Sul. *Dissertação de mestrado, IPEN,* (2011).

[99] SUCHARA, E.A. Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de fármacos em fluídos biológicos e amostras ambientais através de cromatografia líquida e gasosa. *Tese de doutorado, UFSC,* (2007).

[100] TERNES, T.A.; ANDERSEN, H.; GILBERG, D.; BONERZT, M. Determination of Estrogens in Sludge and Sediments by Liquid Extraction and GC/MS/MS. *Anal. Chem.,* **74** (2002), 3498-3504.

[101] TERNES, T. A.; KRECKEL, P.; MUELLER, J. Behavior and Occurrence of Estrogens in Municipal Sewage Treatement Plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *The Science Total Environment,* **225** (1999), 91-99.

[102] THORPE, K. L.; CUMMINGS, R. I.; HUTCHINSON, M. S.; SCHOLZE, M.; BRIGHTY,G.; SUMPTER, J. P.; TYLER ,C.R. Relative potencies and combination effects of estrogens in fish. *Environmental Science and Technology,* **37 n° 2** (2003), 1142-1149.

[103] TYLER, C.R.; ROUTLEDGE, E.J. Estrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure and Applied Chemistry,* **vol.70** (1998), 1795-1804.

[104] UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA) Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analisys. *Environmental Protection Agency,* **Report No. EPA/630/R-96/01229** (1997).

[105] VEGA-BUSTILLOS, O.; SASSINE, A.; MARCH, R. A espectrometria de massas quadrupolar. *São Paulo,* (2001).

[106] VON BRANDIS, H.J. Anatomia e fisiologia para profissionais da equipe de saúde. *Editora Pedagógica e Universitária LTDA,* **vol. 3** (1997), 95-105.

[107] VON SPERLING, M.V. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. *Belo Horizonte, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental-UFMG,* 2005.

[108] VULLIET, E.; WIEST, L.; BAUDOT, R.; GRENIER-LOUSTALOT, M.F. Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromat. A,* **1210** (2008), 84-91.

[109] WALKER, B.S, JANNEY, J.C. Endocrinology. *apud International Water Association: workshop on endocrine disruptors,* **vol. 14** (1930), 389-392.

[110] WARING, R. H.; HARRIS, R. M. Endocrine disrupters: A human risk? *Molecular and Cellular Endocrinology,* **244** (2005), 2-9.

[111] WILLE, K. et. al. Validation and application of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in sewater. *Anal. Bioanal. Chem.,* **597** (2010), 1797-1808.

[112] ZHENG, M.; WANG, L.; BI, Y.; LIU, F. Improved method for analysing the degradation of estrogens in water by solid-phase extraction coupled with ultra performance liquid chromatography-eltraviolet detection. *Journal of Environmental Sciences,* **23 n° 4** (2011), 693-698.

[113] ZORITA, S.; MARTENSSON, L.; MATHIASSON, L. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. *Science of the total environmental,* **407** (2009), 2760-2770.