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

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS, CONSIDERADOS DISRUPTORES
ENDÓCRINOS, NAS ÁGUAS DESTINADAS AO ABASTECIMENTO PÚBLICO
NA REGIÃO DO RIO PARAÍBA DO SUL, SP

#### **JULIANA IKEBE OTOMO**

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

Orientadora:

**Dra. Elâine Arantes Jardim Martins** 

São Paulo

2010

À mínha família sempre presente.

#### **AGRADECIMENTOS**

À minha família, principalmente aos meus pais que sempre me incentivaram, apoiaram e acreditaram na minha capacidade. Obrigada por tudo o que já fizeram e ainda fazem por mim.

À Dra Elâine Arantes Jardim Martins, pela valiosa orientação, paciência, amizade e carinho desde a iniciação científica, sendo de imensa contribuição para minha formação profissional e amadurecimento pessoal.

Ao Dr. Hélio Akira Furusawa, pela elaboração da planilha de validação e importantes contribuições e sugestões durante todo o período de desenvolvimento deste trabalho, e pela participação no seminário de área.

Ao Dr. Oscar Vegas, sempre disposto a ajudar quando precisei e pelas histórias da Espectrometria de massas. Ao Dr. Jorge Vaz, também sempre disposto a resolver os problemas do GC. Aos dois devo um muitíssimo obrigado por terem compartilhado suas experiências, que para mim foram enriquecedoras.

À Dra Maria Aparecida Faustino Pires e à Dra. Marycel E. B. Cotrim, pela confiança e apoio, disponibilizando os laboratórios e materiais para a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP e ao Centro de Química e Meio Ambiente, CQMA, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Eng<sup>a</sup> Martha Rosângela da Sabesp e aos funcionários da Divisão de Controle Sanitário-RVOC da SABESP de São José dos Campos, pelas coletas das amostras.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida e à CNPQ pelo apoio financeiro.

Agradeço à Renata Rodrigues, irmã de orientação, que teve participação fundamental durante todo o período de mestrado. Companheira de laboratório que reconhece o valor do trabalho em equipe, estando sempre disposta a ajudar.

Aos amigos, Danúbia Fernandes, Camila Lange, Tatiane de Araújo, Débora Alvim, Edison, Carlos F. Brito e Carina pela companhia do dia-a-dia, hora do café e almoço no bandejão, que fizeram dessa jornada mais prazerosa.

Aos funcionários do CQMA, Elias, Martinha, Cleide, Cris, Ricardinho, Wagner, Neusa, Avelina, Dona Severa, Izildinha e Maria Nogueira, que apesar de não estar mais no Ipen, compartilhou de sua grande experiência durante a IC. À todos um muito obrigada pela convivência e pela oportunidade de trabalhar com pessoas excelentes.

"Faça o melhor que puder. Seja o melhor que puder. O resultado vírá na mesma proporção de seu esforço".

Mahatma Gandhí.

#### **RESUMO**

# DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS, CONSIDERADOS DISRUPTORES ENDÓCRINOS, NAS ÁGUAS DESTINADAS AO ABASTECIMENTO PÚBLICO NA REGIÃO DO RIO PARAÍBA DO SUL, SP

#### **JULIANA IKEBE OTOMO**

Os disruptores endócrinos são substâncias químicas, sintéticas ou naturais, capazes de interferir no sistema endócrino de seres humanos e animais. Pertencem à classe dos micro poluentes, pois mesmo em concentrações de µg e ng.L<sup>-1</sup> causam efeitos adversos aos organismos a eles expostos. Os hormônios destacam-se dentre disruptores endócrinos por serem compostos os potencialmente ativos no sistema biológico e estão relacionados à origem de diversos tipos de cânceres. Esta dissertação teve por objetivo desenvolver e validar metodologia para determinar hormônios, considerados disruptores endócrinos, em amostras de água bruta e tratada da região da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul utilizando a técnica de cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas. A população atendida pelas unidades da SABESP dessa região é de aproximadamente 11 milhões de habitantes. Através do processo de validação, a metodologia desenvolvida pode ser considerada seletiva, robusta, exata, linear e precisa para a análise proposta. Aplicando o procedimento analítico validado nas amostras coletadas, alguns dos compostos estudados puderam ser detectados tanto em água bruta como em água tratada permanecendo abaixo do limite de quantificação, exceto a cafeína que apresentou concentração média de 0,45 µg.L<sup>-1</sup> em água bruta e 0,17 µg.L<sup>-1</sup> em água tratada, observando-se indícios de contaminação principalmente nas épocas secas. Este projeto de pesquisa está vinculado a uma parceria entre o Instituo de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e a Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP).

#### **ABSTRACT**

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY FOR ENDOCRINE DISRUPTORS HORMONES DETERMINATION IN WATER FOR PUBLIC SUPPLY AT REGION OF PARAÍBA DO SUL RIVER, SP

#### **JULIANA IKEBE OTOMO**

The endocrine disruptors are chemicals substances, synthetic or natural, which can interfere in endocrine system from humans and animals. They belong to the class of micro pollutants, because even at concentrations of µg e ng.L<sup>-1</sup> can cause adverse effects to organisms to them exposed. The hormones stand out as endocrine disruptors because they are potentially active compounds in biological systems and are related to the origin of several types of cancers. This work aimed to develop and validate analytical methodology to determine hormones, considered endocrine disruptors, in drinking water and raw water at region of Paraíba do Sul River, using gas chromatography with mass spectrometry detector. The population served by the units of SABESP is around 11 million inhabitants. By the validation process, the developed methodology can be considered selective, robust, accurate and linear for the proposed analysis. Applying the validated analytical procedure for the samples, some compounds could be detected at drinking water and raw water remaining below limit of quantization, except caffeine that was detected in mean concentration of 0,45 µg.L<sup>-1</sup> in raw water and 0,17 µg.L<sup>-1</sup> in drinking water, principally due to drought season. This Project is linked to a partnership between *Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares* (IPEN) and Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP).

#### **SUMÁRIO**

		Página
1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	7
2.1	Objetivo geral	7
2.2	Objetivos específicos	7
3	EMBASAMENTO TEÓRICO	8
3.1	Sistema Endócrino	8
3.2	Breve histórico dos disruptores endócrinos	11
3.3	Exposição aos disruptores endócrinos	15
3.4	Descrição dos compostos estudados	19
3.4.1	Estrutura química	19
3.4.2	Propriedades físico-químicas	23
3.4.3	Toxicidade	26
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
4.1	Metodologias usuais para determinação de DEs	29
4.2	Estudos de avaliação dos DEs em diversos países	31
5	CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	37
5.1	Caracterização geral dos municípios avaliados	42
6	TÉCNICA ANALÍTICA	44
6.1	Extração em Fase Sólida (SPE)	44
6.2	Cromatografia Gasosa	46
6.3	Espectrometria de massas	49
7	VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA	53
7.1	Seletividade/Especificidade	54
7.2	Linearidade e Faixa linear de trabalho	57
7.3	Limite de detecção e quantificação	60
7.4	Exatidão	61
7.5	Drogicão	60

7.6	Robustez	64
7.7	Recuperação	65
7.8	Incerteza da medição	66
7.8.1	Diagrama de Causa e Efeito (Espinha de Peixe ou Ishikawa)	68
8	PARTE EXPERIMENTAL	70
8.1	Equipamentos e Materiais	70
8.1.1	Outros equipamentos	71
8.1.2	Reagentes e Soluções	72
8.2	Amostragem	72
8.3	Metodologia desenvolvida	73
8.3.1	Estudos para definição da metodologia	74
8.3.2	Análise por GC/MS	78
8.4	Ensaios para validação da metodologia	80
8.4.1	Seletividade	81
8.4.2	Faixa de trabalho e Linearidade	82
8.4.3	Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)	82
8.4.4	Exatidão	83
8.4.5	Precisão	83
8.4.6	Robustez	83
8.4.7	Recuperação	84
8.4.8	Cálculo de incerteza	85
8.4.8.1	Incerteza associada à curva analítica	85
8.4.8.1.1	Incertezas associadas à solução padrão	85
8.4.8.1.2	Incertezas associadas à preparação das soluções de trabalho	86
8.4.8.1.3	Incertezas associadas à resposta do equipamento (área)	87
8.4.8.2	Incerteza associada à recuperação	87
8.4.8.3	Incerteza associada ao volume final	88
8.4.8.4	Incerteza combinada e expandida	89
8.5	Determinação de Carbono Orgânico Total	89
9	RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
9.1	Seletividade	91
9.2	Linearidade	100
9.3	Limites de Detecção e Quantificação	117
94	Exatidão	118

9.5	Precisão	119
9.6	Robustez	120
9.7	Recuperação	125
9.8	Cálculo de incertezas	127
9.9	Resultados da avaliação das amostras do rio Paraíba do Sul	130
9.9.1	Resultados da avaliação do Teor de Carbono Orgânico	135
10	CONCLUSÃO	136
11	CONSIDERAÇÕES FINAIS	138
11.1	Sugestões de trabalhos Futuros	138
ANEXC	0.1	139
RFFFR	ÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	170

#### LISTA DE TABELAS

TABELA 1:	Características Físico-Químicas dos compostos estudados 26
TABELA 2:	Planejamento fatorial saturado para avaliação da estimativa do erro da distribuição dos efeitos utilizando o algoritmo de Dong (pequenos experimentos)
TABELA 3:	Testes de extração realizados para a definição do procedimento final
TABELA 4:	Relação massa/carga dos 5 íons monitorados para cada composto
TABELA 5:	Concentrações das soluções de trabalho dos compostos estudados
TABELA 6:	Fatores selecionados para a avaliação da robustez 84
TABELA 7:	Concentrações do ensaio de recuperação 84
TABELA 8:	Dados para o teste de seletividade (teste F, n=7) dos hormônios estudados. Adição de padrão na matriz de água tratada (AT) e sem matriz. Tabela com os resultados dos valores calculados. Considerando $t_{tabelado} = 2,179$ e $F_{tabelado} = 4,28$
TABELA 9:	Dados para o teste de seletividade (teste F, n=7) dos hormônios estudados. Adição de padrão na matriz de água bruta (AB) e sem matriz. Tabela com os resultados dos valores calculados. Considerando $T_{tabelado} = 2,179$ e $F_{tabelado} = 4,28$
TABELA 10	EValores obtidos no ensaio com matriz de Água Tratada, para o Teste <i>t-Student</i> para a verificação da inclinação e paralelismo e do intercepto na análise de seletividade. O valor 2,179 é o valor crítico para 8 (n-1) graus de liberdade considerando os dois conjuntos (com e sem matriz) de dados com 95% de confianca 99

TABELA 11: Valores obtidos no ensaio com matriz de Agua Bruta, para o	
Teste t-Student para a verificação da inclinação e paralelismo e	
do intercepto na análise de seletividade. O valor 2,179 é o valor	
crítico para 8 (n-1) graus de liberdade considerando os dois	
conjuntos (com e sem matriz) de dados com 95% de confiança 10	0
TABELA 12: Valores obtidos no Teste t-Student para a verificação do desvio	
da linearidade de cada ponto da curva de cada composto em	
matriz de água tratada. O valor 2,365 é o valor crítico para	
8 (n-1) graus de liberdade com 95% de confiança 10	5
TABELA 13: Valores obtidos no Teste t-Student para a verificação do desvio	
da linearidade de cada ponto da curva de cada composto em	
matriz de água bruta. O valor 2,365 é o valor crítico para 8 (n-1)	
graus de liberdade com 95% de confiança 10	5
TABELA 14: Valores obtidos no Teste t-Student para a verificação do desvio	
da linearidade de cada ponto da curva de cada composto n	
ensaio sem matriz. O valor 2,365 é o valor crítico para 8 (n-1)	
graus de liberdade com 95% de confiança 10	6
TABELA 15:Resumo dos resultados da análise de variância (ANOVA) para	
os compostos estudados na matriz de água tratada11	3
TABELA 16:Resumo dos resultados da análise de variância (ANOVA) para	
os compostos estudados na matriz de água bruta 11	4
TABELA 17:Limites de quantificação e detecção do método de cada	
composto em matriz de água tratada11	7
TABELA 18:Limites de quantificação e detecção do método de cada	
composto em matriz de água bruta11	7
TABELA 19:Limites de quantificação e detecção do método de cada	
	Ω
composto no ensaio sem matriz11	0
TABELA 20:Resumo dos resultados do teste z score para os compostos	
estudados nas matrizes de água bruta (AB), tratada (AT) e no	
ensaio sem matriz 11	8

TABELA 21:R	esumo dos	resultados	do teste	de repetit	ividade p	ara c	os
Co	ompostos es	tudados na m	natriz de á	gua tratada	1		119
TABELA 22:R		resultados tudados na m		•	•		
TABELA 23:R		s testes de ro	-		_		
TABELA 24:R el		s testes de ro			-		
TABELA 25:R á		testes de re	-		-		
	natrizes de	os cálculos d água trata equivalentes	da, cons	iderando-se	e interva	los d	de
	natrizes de	os cálculos d água brut equivalentes	ta, consi	derando-se	interva	los d	de
e	e entrada no m matriz d	as contribuiç calculo do m e água trata equivalentes	nensurand ada, cons	o dos comp siderando-s	postos est se interva	tudado alos d	os de
e	e entrada no m matriz d	as contribuiç calculo do m le água bro equivalentes	nensurand uta, cons	o dos comp siderando-s	oostos est e interva	tudado ilos d	os de
de	mostras (1L) o Sul: Pinda	a análise da de água bru monhangaba	uta e trata a; Taubaté	da da regiã e; São Jose	ío do rio l é dos Ca	Paraíb mpos	e
TABELA 31:R		a análise da de água bru		•	•		

	o Sul: Pindamonhangaba; Taubaté; São José dos Campos e	132
TABELA 32: a d	Resultados da análise da 3ª coleta para os 7 compostos nas mostras (1L) de água bruta e tratada da região do rio Paraíba o Sul: Pindamonhangaba; Taubaté; São José dos Campos e Guararema	
a d	Resultados da análise da 4ª coleta para os 7 compostos nas mostras (1L) de água bruta e tratada da região do rio Paraíba o Sul: Pindamonhangaba; Taubaté; São José dos Campos e Guararema	134
TABELA 34:R	Resultados médios de Carbono Orgânico Total das análises de mostras de água bruta e tratada das cidades estudadas (em	135

#### **LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1:	Representação do Sistema Endócrino Humano (adaptado de Ghiselli, 2006)	9
FIGURA 2:	Modo de ação dos disruptores endócrinos (interferentes hormonais)	16
FIGURA 3:	Fórmula molecular da cafeína	20
FIGURA 4:	Fórmulas moleculares dos esteróides estrogênicos, progestagênicos e androgênicos: (a) androstano; (b) estrona; (c) estradiol; (d) etinilestradiol; (e) norgestrel e (f) progesterona	23
FIGURA 5:	Área de estudo – UGRHI 2: Bacia do rio Paraíba do Sul: rios de domínio da União e de domínio Estadual (adaptado de Gruben, 2002)	37
FIGURA 6:	Gráfico representativo da situação de sanemaento na região da Bacia do Rio Paraíba do Sul	41
FIGURA 7:	Desenho esquemático da extração em cartuchos SPE: (1) condicionamento; (2) percolação da amostra; (3) clean up; (4) eluição	46
FIGURA 8:	Esquema de um sistema GC composto por: 1) Gás de arraste, 2) Manômetro de gás, 3) Injetor, 4) Coluna cromatográfica, 5) Forno do GC, 6) Detector e 7) Registrador	47
FIGURA 9:	Diagrama de Causa e Efeito da metodologia analítica para determinação de hormônios, considerados disruptores endócrinos, em água	
FIGURA 10	:Cromatógrafo gasoso (esquerda) acoplado a um espectrômetro de massas (direita)	70

FIGURA 11:	:Material utilizado para sistema de filtração (a), sistema Sartórius montado (b), filtração de amostra de água bruta (c)	71
FIGURA 12:	:Sistema de extração em fase sólida	71
FIGURA 13	:1ª Coleta de amostras de água tratada (a) e bruta (b)	73
FIGURA 14	:Fluxograma do procedimento de preparação da amostra	74
FIGURA 15	:Programação da rampa de temperatura do GC	79
FIGURA 16	:Cromatograma de padrão misto de hormônios obtido em modo SCAN	91
FIGURA 17:	Representação gráfica da seletividade para matriz de água tratada e bruta e no ensaio sem matriz	98
FIGURA 18	:Representação gráfica da Faixa de trabalho e linearidade para os 7 compostos de estudo em matriz de água tratada	101
FIGURA 19	:Representação gráfica da Faixa de trabalho e linearidade para os 7 compostos de estudo em matriz de água bruta	102
FIGURA 20:	:Representação gráfica da Faixa de trabalho e linearidade para os 7 compostos de estudo no ensaio sem matriz	103
FIGURA 21:	:Gráficos de resíduo absoluto e normalizado para os compostos cafeína, androstano, estrona e estradiol em matriz de água tratada	107
FIGURA 22:	:Gráficos de resíduo absoluto e normalizado para os compostos etinilestradiol, norgestrel e progesterona em matriz de água tratada	108
FIGURA 23:	:Gráficos de resíduo absoluto e normalizado para os compostos cafeína, androstano, estrona e estradiol estudados em matriz de água bruta	109
FIGURA 24	:Gráficos de resíduo absoluto e normalizado para os compostos etinilestradiol, norgestrel e progesterona em matriz de água bruta	110
FIGURA 25	:Gráficos de resíduo absoluto e normalizado para os compostos cafeína, androstano, estrona e estradiol no ensajo sem matriz	111

FIGURA 26: Gráficos de resíduo absoluto e normalizado para os compostos
etinilestradiol, norgestrel e progesterona no ensaio sem matriz 112
FIGURA 27: Gráficos de Faixa de Intervalo de confiança da faixa de trabalho para os 7 compostos estudados no ensaio sem matriz
para 65 7 66mpostos estadados no ensalo 36m matriz
FIGURA 28: Gráficos para Cafeína, Androstano, Estrona, Estradiol e
Etinilestradiol representando o teste de verificação de
significância dos efeitos121
FIGURA 29: Gráficos para Norgestrel e Progesterona representando o teste
de verificação de significância dos efeitos
FIGURA 30: Gráficos de probabilidade normal e rankit para os compostos
cafeína, androstano, estrona e estradiol123
FIGURA 31: Gráficos de probabilidade normal e rankit para todos os
compostos etinilestradiol, norgestrel e progesterona
FIGURA 32: Representação gráfica das incertezas envolvidas na
metodologia desenvolvida para determinação dos compostos
cafeína e estrona
FIGURA 33: Representação gráfica das incertezas envolvidas na
metodologia desenvolvida para determinação dos compostos
estradiol, etinilestradiol, norgestrel e progesterona

#### LISTA DE ABREVIATURAS

**ABNT** Associação Brasileira de Normas Técnicas

APA Área de Proteção Ambiental
ANA Agência Nacional de Águas

**ANOVA** Analysis of variance

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CAS Chemical Abstract Service

**CETESB** Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

**CG** Cromatografia gasosa

GC/MS Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrotômetro de massas

CEIVAP Comitê de Integração da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul

AGEVAP Associação Pró-Gestão da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do

Sul

CONAMA Conselho Nacional do Meio Ambiente

CQMA Centro de Química e Meio Ambiente

**DCM** Diclorometano

**DDT** Dicloro-Difenil-Tricloroetano

**DEs** Disruptores endócrinos

**DES** Dietiletilbestrol

**DNA** Ácido desoxirribonucléico

**EDSP** Endocrine disruptor/Screening Program

**EEA** European Environmental Agency

**ELISA** Enzyme-linked immunosorbent assays

**EPA** United States Environmental Protection Agency

Estação de Tratamento de Água

ETE Estação de Tratamento de Esgoto

**FAPESP** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FID Flame Ionization Detector

**FSH** Hormônio Folículo-Estimulante

**HILIC** Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography

**HPLC** High Performance Liquid Chromatography

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICH International Conference on Harmonization

INMETRO Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade

Industrial

IPEN Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

ISO International Organization for Standardization

IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry

JEA Agência Ambiental do Japão

**KH** Constante de Henry

**LC/MS** Liquid Chromatography/Mass Spectromeetry

LD Limite de Detecção

**LH** Hormônio Luteinizante

**LOEL** Lowest observable effect level

LQ Limite de Quantificação

ME Margin of error

MeOH Metanol

MSD Mass Spectroscopy Detector

NBR Normas Brasileiras

OASIS® HLB Hydrophilic-Lipophilic Balanced Copolymer

ONU Organização das Nações Unidas

**OSPAR** Comissão de Paris e Oslo

**PBDEs** Polybrominated Diphenyl Ethers

POPs Poluentes Orgânicos Persistentes

**SABESP** Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo

**SDME** Single-drop microextraction

**SME** Simultaneous Margin of Error

**SNC** Sistema Nervoso Central

**SPE** Solid Phase Extraction

**SPME** Solid-Phase-Micrextraction

**TBT** Tributilestanho

**TOF** Time-of-Flight

**TOC** Total Organic Carbon

**UGRHI** Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos

**UKEA** Agência Ambiental do Reino Unido

**UPLC** Ultraperformance liquid chromatography

**USEPA** United States Environmental Protection Agency

VMP Valor Máximo Permitido

**WWF** World Wild Foundation

#### 1 INTRODUÇÃO

A água é um elemento essencial para a manutenção da vida de todos os seres vivos, encontra-se disponível em diversas formas sendo uma das substâncias mais abundantes na natureza. Como um recurso natural, a água se renova por meio do ciclo hidrológico. A dependência do ser humano pela água data de muitos anos, principalmente quando houve a substituição da atividade da caça pela agricultura como principal fonte de subsistência. Desse modo o nomadismo cedeu lugar à formação de povoados que começava a se desenvolver em torno dos cursos d'água, surgindo as cidades (Libânio, 2008).

O planeta é constituído por 265.400 trilhões de toneladas de água, porém somente 0,003% dessa massa representa a porção explorável, estando distribuída em rios, lagos e aquíferos. Para o desenvolvimento das diversas atividades realizadas pelo homem se faz múltiplos usos da água, como abastecimento público, industrial, agrícola e geração de energia. Visando atender a essas necessidades de forma segura aos seus usuários é fundamental que os recursos hídricos apresentem condições físicas e químicas adequadas, assim como também é necessário que haja em quantidade suficiente e qualidade satisfatória (Braga, 2002; Ghiselli, 2007).

Ao mesmo tempo em que um corpo d'água é utilizado para abastecimento, é também um corpo receptor de efluentes urbanos e industriais. Com o consumo crescente de produtos industrializados e o crescimento populacional, a atividade antrópica passou a representar uma das principais fontes de alteração da qualidade e disponibilidade das águas superficiais. A geração de esgoto doméstico e industrial tem sido apontada como principal fator na formação desse cenário de degradação, devido a deficiência no sistema de tratamento desses efluentes, principalmente em regiões em desenvolvimento onde dificilmente a coleta do esgoto gerado atinge 100% e apenas uma pequena

porcentagem desse esgoto coletado chega a receber tratamento antes de ser lançado nos corpos hídricos (Libânio, 2008; Silva, 2008).

Existem outras formas de intervenção que contribuem negativamente para a alteração na disponibilidade de água, tais como alteração do vapor atmosférico pela presença de reservatórios e pela modificação da cobertura vegetal, alterações climáticas causadas por gases de efeito estufa, diminuição da evapotranspiração causada pelo desmatamento e urbanização que também causam diminuição de infiltração da água no solo e erosão aumentando o escoamento superficial durante períodos chuvosos o que causa inundações (Braga, 2002).

Em atendimento às necessidades da vida moderna, desde a revolução industrial, houve um rápido e intenso crescimento na produção e geração de novos produtos químicos. Em países mais industrializados, o número de agentes químicos produzidos chega a 85.000 unidades, sendo que 2.800 são produzidos em quantidades por volta de 500.000 kg.ano<sup>-1</sup>, outro agravante é que menos de 45% são submetidos a testes toxicológicos básicos (Mello-da-Silva, 2005; Sodré, 2007). Essas substâncias geralmente são empregadas como pesticida, que teve seu uso intensificado para manter alta a produção de alimentos, produtos químicos utilizados em domicílios (inseticidas, remédios, produtos de higiene pessoal), comércios e indústrias.

Devido a esse cenário, a preocupação com a caracterização das águas quanto a sua qualidade e composição cresceu nas últimas décadas, principalmente no que se refere à avaliação de esgoto (bruto e tratado), e das águas destinadas ao abastecimento público e industrial, pois algumas substâncias, mesmo em concentrações em níveis de µg.L<sup>-1</sup> e ng.L<sup>-1</sup>, são potencialmente prejudiciais ao ambiente e aos seres vivos. Essas substâncias são denominadas micropoluentes, e abrangem os disruptores endócrinos e os poluentes orgânicos persistentes (POPs). Em especial, no grupo dos disruptores endócrinos estão presentes os estrógenos, hormônios femininos sintéticos e naturais, substâncias naturais e uma grande quantidade de substâncias sintéticas (produtos farmacêuticos, produtos de higiene pessoal, agrotóxicos, antioxidantes, plásticos, produtos industrializados, tensoativos entre outros) os quais são

amplamente utilizados pela sociedade nos dias de hoje (Reis Filho, 2006; Ghiselli, 2006; Bila, 2007; Girotto, 2007).

Os disruptores endócrinos são produtos químicos sintetizados ou naturais que atuam sobre o sistema endócrino humano e dos animais, mimetizando, bloqueando e/ou interferindo, de alguma maneira, com as instruções naturais dos hormônios às células (Goettlich, 2006; Kavlock et al., 1996). A definição de disruptor endócrino mais amplamente utilizada pelos cientistas foi publicada pela USEPA ("United States Environmental Protection Agency"), sendo "disruptores endócrinos são agentes exógenos que interferem na síntese, secreção, transporte, recepção, ação, ou eliminação dos hormônios naturais do corpo, os quais são responsáveis pela manutenção da homeostase (preservação do equilíbrio interno), reprodução, desenvolvimento e comportamento" (USEPA, 1998; Reis Filho, 2006; Ghiselli, 2007).

O sistema endócrino é responsável pelo controle do metabolismo, crescimento e reprodução do ser humano, fazendo esse controle através de glândulas, hormônios e células. As glândulas secretam apenas a quantidade necessária requerida de hormônio e em momentos específicos, que geralmente é muito pequena, o que faz do sistema endócrino bastante preciso e sensível. Uma das principais atuações dos hormônios é sobre o desenvolvimento do sistema nervoso e imunológico na fase embrionária. Qualquer alteração aos estímulos enviados à produção de hormônios nessa fase pode provocar um desequilíbrio no volume produzido ou recebido e no tempo de resposta do hormônio produzido, causando graves consequências a esse indivíduo (USEPA, 1997; ISTAS, 2002; Reis Filho, 2006).

As substâncias alvo deste trabalho são a cafeína (fármaco), androstano (hormônio masculino), estrona, estradiol e progesterona (hormônios naturais femininos), etinilestradiol e norgestrel (hormônios sintéticos). Dentre estes 7 compostos 3 (estrona, estradiol e etinilestradiol) foram considerados prioritários para a condução de estudos mais detalhados, juntamente com outros 9 compostos segundo relatório elaborado pela União Européia (Girotto, 2007; Ghiselli, 2007).

A cafeína, embora não seja classificada como um disruptor endócrino, é uma das substâncias mais consumidas no mundo, presente em bebidas, alimentos e remédios não prescritos (como analgésicos). Os disruptores endócrinos são compostos potencialmente ativos no sistema biológico e estão relacionados à origem de diversos tipos de cânceres. A detecção dessas substâncias em efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) e em águas superficiais é um forte indício de ocupação urbana e ineficiência do tratamento oferecido, tanto em ETE's como em ETA's (estações de tratamento de água), além de serem constantemente introduzidas no ambiente (Reis Filho, 2006; Girotto, 2007; Ghiselli, 2007; Bila, 2007; Verenitch, 2008).

A Região do Vale do Paraíba representa a área de estudo escolhida para a realização deste trabalho, mais especificamente os municípios de São José dos Campos, Taubaté, Pindamonhangaba e Guararema que estão situados na parte paulista da bacia. Essa região passou a ser densamente ocupada por indústrias e cidades, restringindo a Mata Atlântica original a parques e unidades de conservação, predominando as áreas devastadas que são ocupadas pela pecuária (Gruben, 2002; COPPETEC, 2006). Essa rápida expansão na bacia proporcionou a degradação da qualidade da água e a redução de sua disponibilidade hídrica. Por um lado, preocupou-se com a necessidade de aumentar os serviços de abastecimento da população, porém não houve a mesma preocupação com relação à coleta e tratamento do esgoto. Por esta razão a poluição proveniente de esgoto doméstico é a mais crítica na região. Os dados que representam a situação de saneamento básico são: São Paulo com índice de atendimento em abastecimento de água de 94,6% e de esgotamento sanitário de 89,9%, onde 32,3% recebem tratamento; Rio de Janeiro com 88% de abastecimento de água e 69,6% de esgotamento sanitário, onde 7,6% é tratado; e Minas Gerais tem 95% de sua população atendida com abastecimento de água e 93,1% atendida com esgotamento sanitário, sendo que apenas 12% recebe tratamento (COPPETEC, 2006; Paixão, 2009). Além disso, este projeto é uma importante parceria IPEN-SABESP, sendo o estudo de grande interesse da empresa parceira.

O desenvolvimento de metodologia analítica para uso em prol do meio ambiente é o mais importante enfoque neste projeto de pesquisa. A presença destes compostos na água pode ser prejudicial aos organismos e para um monitoramento adequado é necessário desenvolver métodos seletivos e sensíveis, com limites de detecção em nível de µg.L<sup>-1</sup> e ng.L<sup>-1</sup> (níveis traços). A técnica de cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas (GC/MS) oferece elevada seletividade combinada com boa capacidade de identificação em níveis de traço (Richardson, 2009; Streck, 2009). Devido às baixas concentrações em matrizes ambientais, é necessário realizar um tratamento prévio à análise propriamente dita, que se baseia na extração, isolamento e concentração dos compostos de interesse. Um dos procedimentos mais empregados é a extração em fase sólida, mais conhecida como SPE (solid phase extraction). Metodologias que utilizam a técnica de cromatografia gasosa com detector por espectrometria de massa e prévia extração SPE, são comumente aceitas como técnicas que obtêm melhor separação, identificação e quantificação de compostos orgânicos como os disruptores endócrinos e pesticidas (Mansilha et al., 2010).

Para atender à necessidade de garantir resultados de forma segura e confiável, a validação de métodos analíticos representa uma etapa imprescindível no processo de desenvolvimento de metodologia, além de garantir que o método atenda corretamente aos objetivos a que está sendo proposto. Apesar de não existir uma norma específica estabelecida nacional e internacionalmente, órgãos como IUPAC, ISO, ANVISA, INMETRO e ICH fornecem diretrizes e recomendações para a execução do procedimento de validação, requisitos fundamentais para o processo de demonstração de competência técnica (Ribani et al., 2004; Bueno, 2007).

Para garantir a reprodutibilidade do método analítico alguns parâmetros são considerados essenciais, como especificidade e seletividade, linearidade, faixa de trabalho, limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD), precisão, exatidão, recuperação, robustez e análise de incerteza (Mansilha et al., 2010).

Nesse contexto, a proposta deste trabalho foi desenvolver e validar metodologia para a determinação de alguns hormônios considerados disruptores

endócrinos, utilizando a técnica de GC/MS, a fim de realizar o diagnóstico ambiental, contribuindo assim com o plano de gestão de recursos hídricos da região estudada, subsidiando ações para melhorar seu gerenciamento.

#### 2 OBJETIVOS

#### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo principal desenvolver e validar uma metodologia analítica para determinar alguns compostos classificados como disruptores endócrinos em amostras de água coletadas na Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul, utilizando um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas.

#### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenvolver, adaptar e otimizar metodologia analítica para a extração, concentração e quantificação de 7 compostos orgânicos considerados disruptores endócrinos, utilizando extração em fase sólida (SPE), seguida de determinação por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC/MS). Os compostos selecionados foram a cafeína (estimulante), androstano (hormônio androgênico), estrona, estradiol, progesterona (hormônios naturais femininos), etinilestradiol e norgestrel (hormônios sintéticos).
- b) Demonstrar estatisticamente a qualidade dos dados gerados no processo analítico.
- c) Aplicar a metodologia para analisar amostras de água bruta e tratada de ETA's identificando e quantificando as substâncias presentes, aplicando controle de qualidade analítico adequado para validação dos resultados.

#### 3 EMBASAMENTO TEÓRICO

#### 3.1 SISTEMA ENDÓCRINO

A capacidade dos seres humanos e animais em manter as funções essenciais para a vida, bem como reagir adequadamente às mudanças do ambiente e do próprio organismo são controladas pela ação conjunta dos sistemas nervoso e endócrino. O sistema nervoso é responsável pela interpretação dos estímulos internos e externos recebidos pelo hipotálamo, que por sua vez estimula a hipófise a liberar ou inibir a liberação de hormônios que controlam as várias glândulas que constituem o sistema endócrino, responsável pelo controle do metabolismo, crescimento e reprodução do ser humano. Quando o nível de hormônio necessário é atingido, o hipotálamo recebe novamente uma informação para cessar o estímulo inicial. A taxa de hormônios no organismo é fundamental para prevenir desordens funcionais, o que o torna um sistema complexo e muito sensível a influências perturbadoras que podem ser prejudiciais a esse funcionamento (Amabis e Martho, 2002; Lintelmann, 2003; Guimarães, 2008).

Os hormônios são produzidos e excretados pelas glândulas endócrinas e transportados através da corrente sanguínea. Esses hormônios estão presentes no sangue na forma livre ou conjugados a proteínas, ligando-se a receptores específicos e modificando seu funcionamento. Os receptores desencadeiam uma resposta que pode ser a produção de proteínas ou de outros hormônios, que irão atuar nesses mesmos órgãos ou em outros, conforme a necessidade. Deste modo, os hormônios controlam principalmente as atividades de órgãos completos, níveis de composição no sangue, uso e armazenamento de energia, o crescimento e o desenvolvimento, reprodução, características sexuais, entre outras (Ankley et al., 1998; Istas, 2002; Birkett e Lester., 2003; Lintelmann, 2003).

As glândulas endócrinas encontram-se distribuídas em diferentes áreas do corpo (FIG. 1). Cada hormônio possui um efeito regulador sobre órgãos localizados próximos ou distantes de onde ocorreu sua produção.

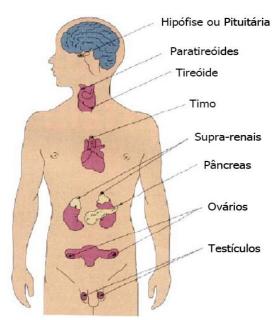


FIGURA 1 - Representação do Sistema Endócrino Humano (adaptado de Ghiselli, 2006)

Nos seres humanos existem 50 tipos de hormônios que se diferenciam pelas suas estruturas, no modo de ação e resposta que desencadeiam. As glândulas secretam somente a quantidade necessária de hormônio, que geralmente é muito pequena e em momentos específicos, o que faz do sistema endócrino muito preciso e sensível. Esses hormônios possuem papel importante sobre o desenvolvimento do sistema nervoso e imunológico na fase embrionária. Qualquer transtorno provocado aos estímulos enviados à produção de hormônios nessa fase pode provocar um desequilíbrio no volume produzido ou recebido e no tempo de resposta do hormônio produzido, causando graves consequências a esse individuo (Usepa, 1997; Istas, 2002; Lintelmann, 2003; Reis Filho, 2006).

O hipotálamo é uma região do encéfalo que produz hormônios os quais serão armazenados e liberados pela hipófise, ou irão controlar a produção e liberação de outros hormônios pela mesma. Portanto, a hipófise é a principal glândula do sistema endócrino, e se divide em duas partes com diferentes funções. A neuroipófise que armazena e libera os hormônios produzidos pelo hipotálamo e a adenoipófise que produz e libera hormônios que irão estimular e

controlar o funcionamento de outras glândulas endócrinas, como a tireóide, as supra-renais e as gônadas (Amabis e Martho, 2002).

A tireóide se encontra localizada na região do pescoço, produz hormônios que controlam o metabolismo, estimula a deposição de cálcio nos ossos e diminui sua concentração no sangue. Ao contrário da tireóide, as paratireóides secretam o hormônio responsável pela liberação de cálcio depositado nos ossos e aumenta sua concentração no sangue, a atuação em conjunto na secreção de hormônios dessas glândulas mantém o nível normal de cálcio no organismo. O timo é a glândula associada ao sistema linfático, que é responsável, entre outras funções, pela distribuição de nutrientes e pelo transporte dos glóbulos brancos (leucócitos) (Ankley et al., 1998; Shimada et al., 2001; Amabis e Martho, 2002; Lintelmann et al., 2003).

As supra-renais ou adrenais, localizadas uma sobre cada rim, são divididas em medula (parte interna) e córtex (parte externa). A medula é responsável por secretar os hormônios adrenalina, que prepara o corpo para a ação em uma situação de perigo ou estresse, e a noradrenalina, que mantém a pressão sanguínea em níveis normais. O córtex é o responsável pela produção de hormônios corticóides como a aldosterona, que mantém o equilíbrio de água e sais nos rins (íons K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup>), e os glicocorticóides, que aceleram o metabolismo e atuam no armazenamento dos açúcares, proteínas e gorduras, e também auxilia a produção de hormônios sexuais (Shimada et al., 2001; Amabis e Martho, 2002).

O pâncreas atua tanto como uma glândula exócrina quanto endócrina. Como glândula exócrina produz vários sucos digestivos, ricos em enzimas, que atuam na digestão dos alimentos. Como glândula endócrina, o pâncreas é constituído por centenas de aglomerados celulares denominados ilhotas de Langerhans, onde são produzidos os hormônios insulina e glucagon, que controlam o nível de glicose no sangue (Shimada et al., 2001; Amabis e Martho, 2002).

As gônadas são as glândulas responsáveis pela produção dos hormônios sexuais masculinos e femininos que afetam o crescimento e o

desenvolvimento do corpo, além de controlarem o ciclo reprodutivo e o comportamento sexual.

Os testículos são as gônadas masculinas responsáveis pela produção de espermatozóides e dos hormônios sexuais masculinos (androgênios). Os hormônios folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) são produzidos pela hipófise e responsáveis pelas mudanças psíquicas e fisiológicas na puberdade, além de estimularem a produção de testosterona pelas gônadas. Por sua vez, esses três hormônios controlam a produção de espermatozóides, que são produzidos durante toda a vida e, quando não são liberados, morrem e são reabsorvidos pelo organismo. Os principais andrógenos são a testosterona e a diidrotestosterona, que promovem o desenvolvimento e a diferenciação dos órgãos reprodutores masculinos antes e depois do nascimento, determinam as características sexuais secundárias, além de aumentar a síntese de proteínas, especialmente nos músculos, e contribuir com as funções anabólicas. Na fase adulta, a testosterona é essencial na produção de esperma (Ankley et al., 1998; Shimada et al., 2001; Amabis e Martho, 2002; Lintelmann et al., 2003).

Os ovários são as gônadas femininas responsáveis por produzir e expelir o óvulo, após o seu amadurecimento. Produzem os hormônios sexuais que regulam a ovulação e o ciclo mesntrual, garantem a manutenção da gravidez e são os responsáveis pelo desenvolvimento das características femininas, influenciando no crescimento dos órgãos reprodutivos. O ciclo menstrual é controlado por quatro hormônios: o hormônio folículo-estimulante (FSH), o hormônio luteinizante (LH), os estrogênios e a progesterona, essencial para o desenvolvimento do embrião (Ankley et al., 1998; Shimada et al., 2001; Lintelmann et al., 2003).

#### 3.2 Breve histórico dos disruptores endócrinos

Um importante marco no estudo dos disruptores endócrinos foi o lançamento do livro "Futuro Roubado" de Colborn em 1996, o qual reúne estudos realizados em campo e laboratório que relatam os efeitos adversos de substâncias químicas sobre o sistema endócrino de seres humanos e animais. Publicação semelhante que antecedeu Colborn foi a obra "Primavera Silenciosa"

de Rachel Carson em 1962, onde a autora faz um alerta quanto a utilização intensiva de DDT e seus efeitos sobre os animais como anomalias em órgãos sexuais, problemas de reprodução de algumas espécies que geralmente estão relacionadas a exposição de pesticidas como o DDT que foi largamente utilizado no passado.

Os relatos contidos no livro de Colborn ocorreram anos antes da publicação de sua obra, como o caso da utilização do hormônio sintético dietilestilbestrol (DES) por mulheres grávidas durante os anos de 1948 a 1971. A função desse hormônio era manter a gravidez de mulheres com histórico de abortos espontâneos e outras complicações. Anos mais tarde foram observados os efeitos da administração deste composto e muitas das filhas dessas mulheres são hoje estéreis. Além disso, uma minoria tem desenvolvido um tipo raro de câncer vaginal. Os filhos adultos mostram maior incidência de anormalidades em seus órgãos sexuais, apresentam contagem média de espermatozóides menor que o normal, além de terem uma maior probabilidade de futuramente desenvolver câncer de testículos (Birkett e Lester, 2003; Reis Filho, 2006; Ghiselli, 2007).

Ensaios de laboratório realizados em ratos confirmaram os efeitos causados pela exposição pré-natal ao DES. Observou-se também que outros estrógenos, como estradiol e etinilestradiol provocam mudanças similares no desenvolvimento de órgãos reprodutivos das fêmeas, confirmando que modelos laboratoriais com rato são capazes de detectar efeitos estrogênicos no desenvolvimento desses animais, estabelecendo uma síndrome de efeitos esperados após a exposição de um estrogênio potente (Daston et al., 1997; Goettlich, 2006; Kavlock et al., 1996).

No ano de 1975, na Dinamarca, trabalhadores do sexo masculino de uma indústria de pesticidas, ficaram expostos a clordecona, um inseticida organoclorado, devido a práticas inadequadas de proteção e higiene durante sua produção. Mais da metade dos 133 trabalhadores desenvolveram sintomas clínicos significativos como desordens neurológicas e esterilidade. A clordecona é uma substância neurotóxica e apresenta atividade estrogênica. Efeitos

semelhantes foram observados em testes realizados com animais para essa substância (Taylor, 1978; Daston et al., 1997).

Outra ocorrência histórica bastante estudada, está relacionada a avaliação de concentração de DDT e seus metabólitos em populações de jacarés do lago Apopka, e outros lagos da Flórida de conhecido grau de contaminação. Estudos sobre este tema datam desde 1984 (Heinz, 1991). Um dos estudos que se destacam é o de Guillette e colaboradores (1999), onde o autor faz uma avaliação sobre jacarés machos provenientes de sete lagos da Flórida, de conhecida situação de poluição por atividades antrópicas. O alvo principal do estudo foi o Lago Apopka, por ter sido cenário do maior derramamento de DDT ocorrido nos anos 80. Os jacarés provenientes desse lago apresentaram baixa concentração de testosterona no sangue e tamanho reduzido do órgão reprodutor quando comparados aos animais do Lago Woodruff, considerado grupo controle. Para reforçar essa hipótese, foram avaliados jacarés machos de outros lagos da Flórida que recebiam descargas de efluentes urbanos, industriais e agrícolas. Nesta população, as concentrações de testosterona também eram mais baixas como a observada nos jacarés de Apopka. Em contrapartida, os jacarés provenientes do Lago Woodruff, apresentaram baixa concentração de pesticidas no plasma e a concentração de testosterona chegava a ser duas vezes maior que a encontrada em jacarés de lagos contaminados (Daston, 1997; Guillete et al., 1999).

O estudo que demonstra uma relação mais confiável entre disruptores endócrinos e seus efeitos adversos se refere ao tributilestanho (TBT) e seu impacto sobre invertebrados marinhos (moluscos). O TBT é o principal ingrediente presente nas tintas anti-encrustação. Existem muitos estudos que relatam imposex (desenvolvimento de características masculinas, como pênis e canal deferente, em fêmeas) de moluscos devido a concentrações em ng.L<sup>-1</sup> de TBT em águas marinhas próximas de portos (Gibbs, 1986; IPCS, 1990).

Estudo realizado em rios do Reino Unido avaliou a descarga de efluentes de ETEs e sua influência sobre a população de peixes daquele corpo receptor. Os estudos detectaram a produção de vitelogenina em peixes machos, uma vez que essa proteína é produzida somente por fêmeas. Pela análise desses

efluentes chegaram a conclusão que a causa desse fenômeno era devido a presença de estrógenos naturais e sintéticos nessas descargas (Wester e Canton, 1986; CSTEE, 1999).

Baseados em diversos casos semelhantes, em 1991, uma conferência ocorrida em Wingspread (EUA) utilizou pela primeira vez o termo disruptor endócrino, entretanto nessa ocasião houve controvérsias sobre a definição do termo. Nesse encontro cientistas apresentaram os resultados de seus trabalhos de ensaios *in vitro* e também evidências dos efeitos em seres humanos. Alguns anos depois, no Workshop Europeu sobre "Impacto dos disruptores endócrinos na saúde humana e de animais" (UK - 1996) uma definição foi aceita pela maioria dos pesquisadores da área, sendo a seguinte: "Um disruptor endócrino é uma substância exógena que causa efeitos adversos à saúde de organismos intactos, ou em sua progênie, e alterações secundárias em funções endócrinas" (Hentz, 2007).

A USEPA ("United States Environmental Protection Agency") publicou uma definição que atualmente é amplamente utilizada pelos cientistas. É uma definição mais específica e objetiva, sendo "disruptores endócrinos são agentes exógenos que interferem na síntese, secreção, transporte, recepção, ação, ou eliminação dos hormônios naturais do corpo, os quais são responsáveis pela manutenção da homeostase (preservação do equilíbrio interno), reprodução, desenvolvimento e comportamento" (USEPA, 1998; Istas, 2002; Reis Filho, 2006; Ghiselli, 2007).

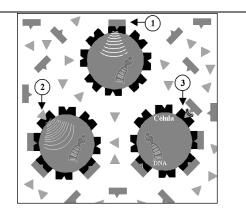
Organizações mundiais de vários países (UKEA - Agência Ambiental do Reino Unido; USEPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos; OSPAR - Comissão de Paris e Oslo; JEA - Agência Ambiental do Japão; WWF - Organização não Governamental) têm classificado diversas substâncias químicas como interferentes endócrinos. A União Européia elaborou um relatório contendo uma vasta lista de substâncias suspeitas de interferir no sistema endócrino, tanto de seres humanos como de diferentes espécies animais, e identificaram 118 substâncias, dentre estas, 12 foram designadas prioritárias para a condução de estudos mais detalhados, que são dissulfeto de carbono, orto-fenilfenol, difenil éter tetrabromado, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol, resorcinol, 4-nitrotolueno,

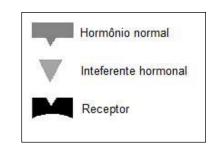
4-octilfenol, estrona, estradiol, etinilestradiol e 2,2'-bis(4-(2,3-epoxipropoxi)fenil)propano3 (Girotto, 2007; Ghiselli, 2007).

#### 3.3 EXPOSIÇÃO AOS DISRUPTORES ENDÓCRINOS

Os disruptores endócrinos são substâncias químicas sintéticas ou naturais, que possuem a capacidade de agir sobre o sistema endócrino de seres humanos e animais causando alterações. Essas substâncias podem se ligar a receptores específicos através da mimetização de um hormônio natural, estimulando respostas imprevistas ou anormais, pelo bloqueio dos receptores nas células impedindo a produção de respostas corretas, estimulando a produção de quantidades maiores que a necessária ou pela inibição da produção de hormônios naturais causando deficiência destes. O comportamento de tais substâncias afeta a síntese, o transporte, o metabolismo e a excreção dos hormônios naturais no organismo (Usepa, 1997; Istas, 2002; Lintelmann et al., 2003; Birkett e Lester, 2003; Zagatto e Bertoletti, 2006; Ghiselli e Jardim, 2007).

Na FIG. 2 pode-se observar uma representação da ação dos disruptores endócrinos sobre os receptores.





- Os hormônios encaixam-se perfeitamente nos Receptores e transmitem os sinais indispensáveis às células;
- 2. Os interferentes hormonais ocupam o lugar dos Hormônios encaixando-se perfeitamente nos receptores, e enviam sinais diferentes e fora de tempo às células:
- 3. E por fim, os mesmos interferentes atuam como bloqueadores dos sinais normais dos Hormônios que seriam enviados às células.

Fonte: modificado de Bila (2003)

FIGURA 2 – Modo de ação dos disruptores endócrinos (interferentes hormonais)

Uma grande quantidade de substâncias químicas mostrou possuir atividade estrogênica. Alguns dos DEs (disruptores endócrinos) podem ser liberados no ambiente de forma intencional, como os pesticidas, ou de forma não intencional, o que ocorre na maioria dos casos. Pode ocorrer pela degradação de substâncias químicas com conseqüente formação de subprodutos ou durante sua produção. Existem também as fontes naturais que são os alimentos e os próprios seres vivos, que dispõe essas substâncias através da urina e fezes, esse modo de exposição depende da idade, da saúde, da dieta ou do estado de gestação dos indivíduos. A exposição aos DEs naturais varia conforme a espécie e região (Damstra, 2002; Sodré, 2007).

Outra fonte de grande importância são os efluentes domésticos e industriais. A falta de infra-estrutura das estações de tratamento, tanto de água como de esgoto, que após coleta e tratamento deficiente são lançados nos corpos hídricos tornando-se um agravante para a qualidade da água. Além disso, existem municípios que não oferecem tratamento de esgoto, ou a coleta não cobre 100%

das residências ou ainda nem todo o esgoto coletado é tratado. Estudos indicam que os estrógenos são liberados por mamíferos na forma de conjugados (na forma não metabolizada) glicuronídeo ou sulfato na urina e fezes, entretanto eles são rapidamente transformados e voltam a sua forma livre, biologicamente ativa, nos sistemas de tratamento (Orme et al., 1983; Baronti, 2000; Servos et al., 2005)

A remoção destes compostos do esgoto bruto depende tanto dos processos empregados nas estações de tratamento, quanto das características inerentes de cada composto (Ghiselli, 2006; Reis Filho, 2006; Bila, 2007; Girotto, 2007; Sodré, 2007).

No grupo dos disruptores endócrinos estão presentes os estrógenos (hormônios femininos sintéticos e naturais), esteróides de animais e plantas, substâncias naturais e uma grande quantidade de substâncias sintéticas (produtos farmacêuticos – antibióticos, remédios prescritos e não prescritos, produtos de higiene pessoal, agrotóxicos, antioxidantes, plásticos, produtos industrializados, tensoativos, metabólitos de detergentes, retardantes de chama, produtos de óleo e combustão) que são amplamente utilizados pela sociedade moderna. Muitas dessas substâncias são também consideradas poluentes emergentes, pela grande quantidade que é produzida, como poluentes orgânicos persistentes (POPs) e como micro poluentes. Por definição os micro poluentes são substâncias que mesmo em concentrações muito baixas (μg ou ng.L<sup>-1</sup>) são prejudiciais aos organismos por elas expostos.

As diferentes características físico químicas dos DEs indicam que essas substâncias possuem, também, forma de degradação e comportamento no ambiente de forma distinta. Os principais fatores abióticos que influenciam o processo de degradação são a temperatura, aumento da radiação solar e condições anaeróbicas, portanto é provável que a velocidade de degradação seja mais rápida sob essas condições. Outros processos de transformação de substâncias químicas no ambiente são hidrólise, oxidação e reações fotoquímicas. Em contraste, substâncias classificadas como poluentes orgânicos persistentes (POPs) e que estão sob suspeita de terem atividade desreguladora podem se acumular em alguns compartimentos, como sedimento, ou ser transportados por longas distâncias sem sofrer degradação (Damstra, 2002).

A exposição aos DEs pode ocorrer pela atmosfera, água, solo, sedimento, alimento e produtos consumíveis. As substâncias entram no organismo através da ingestão, inalação ou pelo contato com a pele. A exposição pelo ar de qualquer substância é dependente de sua volatilidade e de sua interação no meio líquido, vegetação, solo e das condições meteorológicas. Os DEs de baixa massa molecular, como os compostos halogenados persistentes, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, fenóis e ésteres ftalatos possuem maior potencial para exposição via aérea (Damstra, 2002, Lintelmann, 2003; Manning, 2005). Além disso, alguns DEs estão presentes no ambiente em concentrações muito baixas que podem ser medidas em ng.L<sup>-1</sup> ou μg.L<sup>-1</sup>, e podem ser mais persistentes que outras substâncias, possuir baixa mobilidade na água e ainda se ligarem rapidamente ao sedimento (Ying et al 2003). Por isso, o risco de DEs a animais e humanos é dependente da concentração, destino e comportamento destas substâncias no ambiente, bem como a maneira com que os seres vivos estão expostos a eles (Goonan, 2008).

O ambiente aquático por ser fonte essencial de consumo para os seres humanos e de outras espécies terrestres e por ser o habitat de diversas espécies aquáticas, torna-se uma potencial fonte de exposição à DEs para essas espécies. Uma variedade de pesticidas, produtos industriais e hormônios naturais têm sido detectados em águas superficiais, essas substâncias químicas podem estar dissolvidas ou ligadas ao material particulado em suspensão. Nas espécies aquáticas, a absorção ocorre pelas brânquias ou pela alimentação (Damstra, 2002; Manning, 2005).

Potenciais DEs foram detectados em solos e lodo de efluente em diferentes partes do mundo. Para determinadas espécies que vivem em contato com solo, esta é a principal rota de exposição. De forma indireta, expõe os seres humanos por meio da cadeia alimentar, como por exemplo, criação de gado que se alimenta do pasto estão expostos ao solo contaminado, tornando-se também um meio de exposição aos seres humanos que se alimentam destes (Alcock, 1999; Damstra, 2002; Manning, 2005; Richardson, 2009; Streck, 2009).

A ingestão de DEs e potenciais DEs pela alimentação ou medicamentos é considerada outra principal fonte de exposição para humanos e

animais, podendo levar a bioacumulação e biomagnificação desses compostos. A contribuição dessa exposição varia em função da dieta adotada, posição do consumidor na cadeia alimentar, das espécies e quantidades consumidas. Poluentes orgânicos lipofílicos e persistentes bioacumulam em espécies que estão no topo da cadeia alimentar. Aves piscívoras (que se alimentam de peixe) e mamíferos marinhos mostraram ter concentrações de POPs muitas vezes maior que a encontrada em peixes dos quais elas se alimentam. Nesses animais foram observados efeitos como incapacidade reprodutiva, efeitos teratogênicos e afinamento da casca do ovo (Damstra, 2002).

Outra importante fonte de hormônios esteróides são os resíduos da pecuária, como as excretas de cabras, gado, porcos e aves. Estudos apontam que resíduos da criação desses animais contêm concentrações na faixa de 44ng.g<sup>-1</sup> de estradiol (Ying, 2002; Streck, 2009).

O sedimento é uma fonte de exposição para espécies animais que vivem ou em alguma fase de sua vida estiveram em contato com este. Algumas substâncias irão se ligar ao material particulado suspenso na água, que se deposita e acumula no sedimento.

Outra via de exposição aos DEs é pelo consumo de produtos de limpeza, produtos de higiene pessoal, cosméticos e inseticidas. Pode ser através da inalação, ingestão e contato com a pele. Em particular, a principal preocupação é o potencial de exposição aos ésteres ftalatos nos brinquedos infantis, onde as crianças têm contato direto com a boca.

## 3.4 DESCRIÇÃO DOS COMPOSTOS ESTUDADOS

### 3.4.1 Estrutura química

O estudo realizado nesta dissertação focou sete compostos, dentre eles, alguns considerados disruptores endócrinos, cujas características e propriedades físico químicas estão descritas nesse item e nos subsequentes.

A cafeína (FIG. 3) é um alcalóide pertencente ao grupo das xantinas, que são substâncias capazes de estimular o sistema nervoso central (SNC), pois produzem um estado de alerta de curta duração. A cafeína é mundialmente

utilizada como ingrediente de analgésicos, estimulantes e bebidas a base de cola, energéticos e naturalmente presente em mais de 60 espécies de plantas, como no guaraná, no mate e no cacau (Monteiro, 2005; De Maria e Moreira, 2007; Verenitch, 2008).

A concentração de cafeína em cada um desses produtos é bastante variável. O café por exemplo, contém em média de 40 a 180 mg de cafeína em doses de 150 mL, para chás em quantidades de 150mL há uma média de 24 a 50 mg, em bebidas a base de cola a cada 180 mL possuem de 50 a 150 mg, bebidas energéticas (250 mL) possuem 80 mg de cafeína, em fármacos analgésicos a concentração é de 32 a 65 mg por comprimido. O consumo médio global da cafeína é de 70-76 mg.pessoa<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>, mas dependendo do país essa média pode chegar a 238 mg.pessoa<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> (EUA e Canadá) e 400 mg.pessoa<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> (Suécia e Finlândia) (Buerge, 2003; Fredholm, 2005; Vivavoz, 2007; Verenitch, 2008).

A cafeína age no organismo através do bloqueio da ação da adenosina endógena e por conseqüência, há grande ativação dos neurotransmissores. Grande parte da cafeína é metabolizada pelo fígado e apenas 10% é excretada de forma inalterada através da urina (Buerge, 2003, Monteiro, 2005).

FIGURA.3 - Fórmula molecular da cafeína

Em formulações farmacêuticas, a cafeína tem importante papel, pois intensifica o efeito de analgésicos para gripe, resfriado e cefaléia. Também é usada como estimulante cardíaco, cerebral e respiratório e como diurético (Buerge, 2003).

A cafeína, embora não seja um disruptor endócrino, é uma das substâncias mais consumidas no mundo, portanto sua presença em efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) e em águas superficiais é um forte indício de ocupação urbana e ineficiência do tratamento oferecido, tanto em ETEs como em ETAs. A cafeína foi incluída na lista da U.S.EPA dos produtos de maior volume de produção, entretanto, o destino da cafeína em águas residuárias é ainda pouco investigada (Burge, 2003; Verenitch, 2008).

Os hormônios fazem parte da classe dos esteróides, que formam um grande grupo de compostos lipossolúveis (solúveis em gordura) e possuem uma estrutura básica de 17 átomos de carbono dispostos em quatro anéis ligados entre si, cuja estrutura básica é formada pelo ciclo[a]fenantreno. Nessa estrutura podem existir ligações duplas, metilas, carbonilas e hidroxilas, dando origem a uma série de hormônios esteroidais (Ying, 2002; Tapiero et al. 2002, IUPAC; Sodré, 2007).

Os estrogênios naturais fazem parte desse grupo de hormônios esteroidais lipossolúveis e são originados a partir do colesterol ou da acetil coenzima-A, que são responsáveis pelas características secundárias femininas relacionadas ao crescimento, desenvolvimento e ao metabolismo. O estrogênio mais potente produzido pelos seres humanos é o estradiol, seguido pela estrona e estriol. Os progestagênios (progesterona) e os androgênios (testosterona) também fazem parte desse grupo de hormônios (Ying, 2002; Tapiero et al., 2002; URASE, 2005; Sodré, 2007).

Além dos hormônios naturais, muitos fármacos possuem em sua formulação os esteróides sintéticos, que inclui principalmente o etinilestradiol e os derivados do norgestrel. Estes compostos sintéticos são empregados mundialmente como contraceptivos e como agentes terapêuticos de reposição hormonal (Sonnenschein e Soto, 1998; Sodré, 2007).

O estradiol tem a contribuição mais significativa como potencial DE no esgoto tratado, enquanto a estrona é um composto intermediário produzido pela degradação do estradiol, como é desmonstrado no estudo de Ternes e colaboradores (Ternes *et al*, 1999; Urase, 2005; Barel-Cohen, 2006).

A progesterona é o único progestógeno de ocorrência natural, secretado pelo corpo lúteo no ovário e também pela placenta durante a gravidez. Progestógenos sintéticos são utilizados sozinhos ou em combinação com estrógenos para tratamento de desordens no ciclo menstrual, infertilidade e endometriose, sua dose excede a do etinilestradiol (Streck, 2009)

Os andrógenos são esteróides de 19 carbonos que estimulam e controlam o desenvolvimento de características masculinas e possuem um importante papel na regeneração dos tecidos, especialmente da pele, ossos e músculos. Tanto os andrógenos naturais como os sintéticos, têm sido utilizado como promotores de crescimento ou em medicamentos veterinários. Além disso, a degradação microbiológica dos fitoesteróides em progestógenos e posteriormente em andrógenos tem sido proposta como fonte natural de esteróides androgênicos, o que poderia explicar elevadas concentrações de atividade androgênica nas descargas de efluentes de indústrias de papel e celulose.

A presença de esteróides androgênicos em ambientes aquáticos se deve ao tratamento ineficiente das ETEs, efluentes de indústrias de papel e celulose e da criação de gado. Os esteróides mais comumente identificados em efluentes de ETEs são a testosterona e seus metabólitos ou precursores de hormônios masculinos e femininos, como o androstenedione (Ying, 2002; Reddy, 2005; Streck, 2009). Na FIG. 4 podem ser observadas as fórmulas moleculares dos esteróides estudados neste trabalho.

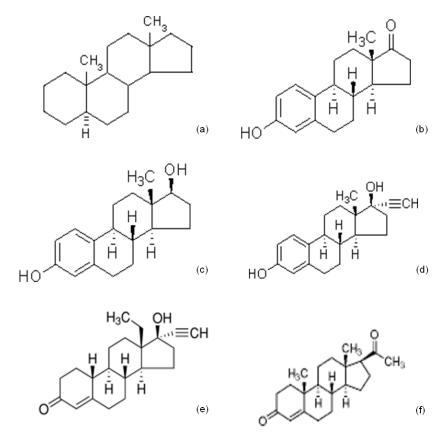


FIGURA 4 - Fórmulas moleculares dos esteróides estrogênicos, progestagênicos e androgênicos: (a) androstano; (b) estrona; (c) estradiol; (d) etinilestradiol; (e) norgestrel e (f) progesterona

# 3.4.2 Propriedades físico-químicas

Pouco se sabe sobre a potencial ocorrência no ambiente, transporte e destino final de muitos compostos orgânicos sintéticos após seu uso, principalmente as substâncias hormonalmente ativas, produtos de higiene pessoal e fármacos que são desenvolvidos para estimular respostas fisiológicas em seres humanos, plantas e animais (Kolpin, 2002).

O estudo das propriedades químicas e físicas dos hormônios é necessário para obter conhecimento do comportamento desses compostos, e realizar previsões acerca de onde poderão ocorrer maiores concentrações desses contaminantes orgânicos. Esse conhecimento, aliado a dados de teste ecotoxicológicos, é importante também para compreender qual a causa das concentrações encontradas em diferentes compartimentos do ecossistema (Zagatto e Bertoletti, 2006).

Além disso, o conhecimento das propriedades físico-químicas desses compostos auxilia na escolha do processo mais adequado para remoção nos tratamentos. O parâmetro correspondente ao coeficiente de partição entre a fase aquosa e o lodo (k<sub>p</sub>), está fortemente relacionado às propriedades físico-químicas da substância.

Os esteróides estrogênicos naturais como a estrona e estradiol, possuem solubilidade de aproximadamente 13 mg.L<sup>-1</sup>, enquanto que o estrogênio sintético etinilestradiol possui solubilidade de 4,8 mg.L<sup>-1</sup>. Esses esteróides têm capacidade moderada de se ligarem ao sedimento e estudos relatam uma rápida degradação no solo e na água (Ying, 2002).

A natureza hidrofóbica de alguns DEs, estimada com base nos coeficientes de partição entre octanol água, favorece a ocorrência de reações de adsorção dos DEs no material particulado em suspensão. Muitos DEs podem apresentar características físico-químicas que favorecem sua permanência no efluente final de estações de tratamento de água e esgoto (Sodré, 2007). Embora o estradiol e a estrona sejam relativamente solúveis em água, uma fração significativa pode estar associada com partículas orgânicas ou colóides nos sistemas de tratamento, que influenciam sua degradação e destino final (Huang and Sedlak, 2001).

Baixos valores de pressão de vapor indicam a baixa volatilidade desses compostos. Pelas propriedades físico-químicas desses esteróides, pode ser observado que esses estrógenos são compostos hidrofóbicos de baixa volatilidade. Portanto, é esperado que a sorção no solo ou sedimento será um fator significante na redução da concentração em fase aquosa (Ying, 2002).

Lai *e* colaboradores (2000) mediram o coeficiente de sorção da estrona, estradiol e etinilestradiol no sedimento e o valor de log K<sub>f</sub> encontrados foram 1,71, 1,56 e 1,72, respectivamente (Ying, 2002).

Nos seres humanos e animais, os estrógenos passam por várias transformações, principalmente no fígado. Frequentemente são oxidados, hidrolizados, desoxigenados e metilados antes da conjugação final com

glicuronídeo e sulfato. O estradiol é rapidamente oxidado a estrona, que pode ser convertido em estriol, que é o maior produto de excreção. Muitos outros metabólitos polares são formados e podem estar presentes na urina e nas fezes. etinilestradiol principalmente eliminado como conjugado, transformações metabólicas ocorrem, mas em menor relevância. Portanto, estrógenos são excretados principalmente como conjugados inativos de ácidos sulfúrico e glucurônico. Embora os esteróides conjugados não possuam uma atividade biológica direta, eles podem agir como hormônios precursores capazes de voltarem à forma de esteróides livres por bactérias no ambiente (Ternes et al., 1999; Baronti et al., 2000). Devido à presença de microrganismos em esgoto bruto e em ETEs, esses conjugados inativos de esteróides estrogênicos são clivados, disponibilizando no ambiente esteróides estrogênicos ativos (Ternes et al., 1999a; Baronti et al., 2000; Ying, 2002; Laudicéia, 2010)

Estudos de laboratório e de campo, com água de rios relataram uma redução de meia vida dos estrógenos entre 2 e 6 dias, enquanto a meia vida do etinilestradiol foi de no mínimo 46 dias. Entretanto, a mineralização destes hormônios estrogênicos no solo podem levar vários anos (Colucci et al., 2001; Barel-Cohen, 2006).

Neste item, tentou-se reunir alguns parâmetros físico-químicos como solubilidade, pressão de vapor, volatilidade, coeficiente de sorção, entretanto as poucas informações referentes a essas características dificultaram a confecção de uma tabela completa. Na TAB. 1 estão as apresentadas as informações coletadas em diversas literaturas.

Composto	Solubilidade (mg.L <sup>-1</sup> à 20°C)	Log K <sub>ow</sub> <sup>1</sup>	$K_{f}$	Log K <sub>OC</sub> <sup>2</sup>	Pressão de vapor <sup>3</sup>
Cafeína	21.600	-0,07	-	-	-
Estrona	13 <sup>3</sup>	$3,43^{3}$	-	$3,47^3$	$2,3x10^{-10}$
Estradiol	13 <sup>5</sup>	3,94 <sup>5</sup>	21,8 <sup>4</sup>	$3,57^3$	$2,3x10^{-10}$
Etinilestradiol	4,8 <sup>5</sup>	4,15 <sup>5</sup>	24,2 <sup>4</sup>	$3,74^{3}$	4,5x10 <sup>-11</sup>
Norgestrel	2,1 <sup>6</sup>	-	-	-	-
Progesterona	8,8 <sup>6</sup>	3,87	-	-	-

TABELA 1 - Características Físico-Químicas dos compostos estudados

Fonte: <sup>3</sup> (Ying, 2009); <sup>4</sup> (Ying, 2003); <sup>5</sup> (Lai, 2000); <sup>6</sup> (Sodré, 2007)

#### 3.4.3 Toxicidade

Poluentes orgânicos geralmente produzem efeito tóxico sobre os indivíduos a eles expostos e para medir o nível de toxicidade das substâncias são utilizados métodos *in vivo* e *in vitro*, que podem fornecer informações seguras de indicadores qualitativos e quantitativos sobre a interação de dado composto com o sistema biológico. Entretanto, o estudo da atividade toxicológica de certos compostos é dispendiosa, de elevado custo, o que pode ser uma explicação para a falta de indicadores disponíveis para muitos compostos (Sam, 2010).

Em 2009, o CAS (*Chemical Abstracts Service*) chegou à marca de 50 milhões de substâncias registradas, sendo que 9 meses antes havia chegado nos 40 milhões. Em contrapartida foram necessários 33 anos para atingir a marca dos primeiros 10 milhões de registro, o que aconteceu em 1990, indicando o grande avanço das indústrias no desenvolvimento de novas substâncias químicas. Em países industrializados, como EUA e Japão, cerca de 100.000 compostos são produzidos deliberadamente e utilizados para diversos fins, dos quais, aproximadamente 3% são produzidos em grandes volumes, atingindo quantidades de 500.000 kg.ano<sup>-1</sup>. Destes, menos de 45% são submetidos a algum tipo de ensaio toxicológico básico e menos de 10% são estudados quanto aos efeitos tóxicos sobre organismos em desenvolvimento (Mello-da-Silva e Fruchtengarten, 2005; CAS, 2010).

<sup>1 (</sup>coeficiente octanol-água);

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> (coeficiente de sorção de carbono orgânico);

Uma revisão de trabalhos publicados por mais de 500 pesquisadores, de vários países, sobre estudos de toxicologia, mecanismos de ação, avaliação de risco, desenvolvimento e validação de métodos para testes dos DEs, concluiu que não existem evidências suficientes que concretizem os efeitos adversos dessas substâncias aos seres humanos. Acrescentaram ainda que, as evidências apresentadas nesses estudos mostraram que algumas populações têm sido afetadas em áreas de maior contaminação e exposição, entretanto, não pode ser estabelecido um consenso sobre os efeitos biológicos específicos destas substâncias, e se outras espécies são susceptíveis aos efeitos dos DEs como as espécies comprovadamente afetadas (Sodré, 2007, Hentz e Lamb, 2007).

Como pode ser notado, ainda não existe um consenso sobre os efeitos biológicos específicos destas substâncias. Ensaios envolvendo a atividade estrógena de muitos compostos orgânicos em função de alguns parâmetros ainda são necessários para conhecer suas verdadeiras potencialidades em alterar o funcionamento do sistema endócrino de organismos vivos em condições naturais. Diversos compostos naturais e sintéticos, de origem endógena ou exógena, têm sido avaliados em função de suas capacidades em induzir respostar similares às respostas hormonais (Giesy et al., 2002; Sodré, 2007).

Dentre as substâncias consideradas DEs, existe uma diferença no potencial de atividade estrogênica entre elas, que tem sido avaliada por meio da estrogenicidade relativa medida através do efeito causado por um DE frente ao estradiol. Através dessa avaliação, pode-se considerar que os estrogênios sintéticos possuem atividade estrogênica superior em comparação aos estrogênios naturais, podendo deduzir também que esses compostos sejam mais tóxicos (Sodré, 2007).

Estudos indicaram que concentrações baixas como 1 ng.L<sup>-1</sup> de estradiol levam à indução de vitelogenina em trutas macho (Purdom et al., 1994; Hansen et al., 1998).

Os efeitos causados por substâncias consideradas disruptoras endócrinas dependem de vários fatores como, o tempo de exposição, concentração, faixa etária e espécie do indivíduo exposto. Essas variáveis

somadas a falta de informações sobre como exatamente cada substância ou mistura de substâncias agem sobre o indivíduo alvo, tornam praticamente impossível definir quais testes são mais adequados para se obter uma resposta confiável. A exposição contínua tende a ser o cenário mais realístico envolvendo os efeitos dos DEs, para isso, os testes de toxicidade mais indicados para a avaliação de seus efeitos são baseados na medida do EC<sub>50</sub> - concentração mínima capaz de provocar algum efeito em 50% dos organismos em estudo; e não do LC<sub>50</sub> - concentração mínima capaz de provocar a morte de 50% dos organismos (Sodré, 2007).

Esforços de conceituadas entidades governamentais de proteção ambiental como a U.S. EPA (United States Environmental Protection Agency) e a OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) tem trabalhado continuamente no desenvolvimento e validação de métodos para avaliação de toxicidade e dos efeitos dos DEs sobre os seres humanos e animais. Em particular a EPA, que em 1998 criou o Programa de triagem de disruptores endócrinos (EDSP - Endocrine disruptor/Screening Program) com foco nos estrógenos, andrógenos e hormônios da tireóide. O EDSP é dividido em duas etapas, primeiro é feito uma triagem das substâncias com potencial de interagir com um ou mais componentes do sistema endócrino (incluindo métodos in vitro e in vivo), porém essa etapa não fornece informações sobre o efeito biológico causado, pois nesses ensaios não é possível conhecer a complexidade biológica do sistema endócrino. Os testes realizados na segunda etapa são os testes in vivo de longo prazo (estudos de reprodução de multi geração) que identificam os efeitos adversos e caracterizam dose-resposta. Através desses testes, resultados de testes definitivos substituem os resultados de ensaios de triagem na orientação de políticas e gerenciamento. Mas ainda muito trabalho necessita ser realizado, pois o modo de ação dos DEs e dos próprios mecanismos de funcionamento do sistema endócrino não são totalmente conhecidos devido à complexidade desse sistema. No ano de 2009 o programa de testes da primeira etapa publicou a lista final, com as substâncias que foram selecionadas e que serão submetidas aos testes da segunda etapa do programa. Essa lista é composta predominantemente por ingredientes ativos de pesticidas e outros ingredientes de grande volume de produção.

# 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 4.1 METODOLOGIAS USUAIS PARA DETERMINAÇÃO DE DES

Richardson (2009) fez uma revisão avaliando as tendências em técnicas analíticas, e destaca a cromatografia líquida acoplada ao detector por espectrometria de massas (LC-MS) como a mais amplamente utilizada para análises ambientais, que costumam exigir uma alta resolução e seletividade. Outros autores também enfatizam a utilização da LC-MS, além do acoplamento (gas chromatography) е **HPLC** (High performance chromatography), como técnica mais adotada nos últimos anos, principalmente para identificação de esteróides no ambiente (Streck, 2009). O aperfeiçoamento das técnicas já utilizadas como o LC-MS/MS, permitem aos pesquisadores quantificar níveis traços (ng.L<sup>-1</sup> e pc.L<sup>-1</sup>) de esteróides devido ao baixo limite de detecção que este equipamento consegue atingir, sendo de suma importância para compostos que permanecem ativos biologicamente em baixas concentrações como o estradiol (Streck, 2009).

Dentre os detectores por espectrometria de massa, vários tipos de ionização e filtros de massa têm sido explorados pela comunidade científica, como, por exemplo, a fotoionização em pressão atmosférica com LC/MS, que promove uma melhor ionização para compostos não polares como os nanomateriais e difenílicos polibromados (PBDEs - polybrominated diphenyl ethers). Outro exemplo é o uso do MS com filtro de massa do tipo TOF (time-of-flight), que possui a vantagem de identificar, além dos analitos de interesse, analitos não alvos altamente polares, não voláteis ou de alta massa molecular em uma única análise sem perda de sensibilidade, o que não seria possível com a utilização de um GC. O uso de padrões isotópicos para permitir maior precisão nas quantificações em matrizes variadas, também pode ser citado como uma grande tendência nas metodologias desenvolvidas recentemente, especialmente

para amostras de águas residuais, onde o efeito matriz e a supressão de íons podem ser substanciais (Richardson, 2009).

Merece destaque também, os avanços da técnica cromatográfica como desenvolvimento da UPLC (*Ultraperformance liquid chromatography*) cromatografia líquida de ultra performance, que se difere da LC por usar partículas de menor diâmetro na fase estacionária além de colunas menores, o que reduz drasticamente o tempo de análise, permite maior pressão e picos mais estreitos/definidos. Outra significante tendência em cromatografia inclui o uso bidimensional de GC (GC-GC) e cromatografia de interação hidrofílica (HILIC -Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography). A GC-GC possibilita melhores separações de misturas complexas e permite que séries homólogas de compostos sejam facilmente identificadas. Essa técnica também possibilita a detecção de contaminantes que não podem ser identificados com o tradicional GC. O TOF-MS é frequentemente utilizado como detector para GC-GC devido à sua capacidade de rápida aquisição. A HILIC é uma nova técnica de LC que fornece melhor separação e detecção de compostos altamente polares, pois no final da fase estacionária possui um grupo polar (como grupo amino), e a retenção é baseada na afinidade dos analitos polares pelas cargas desse grupo no final da coluna (Richarson, 2009)

A GC/MS oferece elevada seletividade combinado com boa capacidade de identificação. Procedimentos pré-análise, como os processos de derivatização e sililação podem ser empregados para obter melhor separação cromatográfica e melhor fragmentação das moléculas alvo (Streck, 2009).

Comparado aos métodos com GC, os métodos de LC têm a vantagem de dispensar a derivatização antes das análises, eliminando assim uma potencial fonte de erros analíticos. Em relação aos limites de detecção, métodos de GC/MS são geralmente um pouco menos sensíveis do que as técnicas de LC-MS/MS, ainda assim continua sendo uma técnica competitiva à LC (Streck, 2009).

Os métodos de pré-concentração de amostras mais utilizados permanecem sendo os cartuchos de extração em fase sólida, podendo ser aplicado para a maioria dos contaminantes emergentes, o aperfeiçoamento desta

técnica está no desenvolvimento de novos sorventes, oferecendo melhores recuperações para analitos, meio com duas fases (*dual-phase*) tem sido utilizado para reter analitos de classes diferentes em uma única extração. E ainda, técnicas de extração sem uso de solvente, como a microextração em fase sólida (SPME-*solid-phase-micrextraction*), microextração com uma única gota (SDME - *single-drop microextraction*), extração em barra de agitação e microextração com membrana de fibra oca (hollow-fiber membrane microextraction), continuam sendo utilizadas em muitos trabalhos. Amostras aquosas são normalmente tratadas por extração em fase sólida após remoção de partículas por filtração em membranas em tamanho de poros de 0,45 µm ou 1,2 µm. Para extração de esteróides, os cartuchos OASIS® HLB (*hydrophilic-lipophilic balanced copolymer*) são os mais utilizados, entretanto, muitos estudos são realizados com a utilização dos tradicionais cartuchos que possuem recheio C<sub>18</sub> e constataram que ambos são adequados para os mesmos analitos (Richardson, 2009; Streck, 2009).

# 4.2 ESTUDOS DE AVALIAÇÃO DOS DES EM DIVERSOS PAÍSES

A maioria dos estudos encontrados na literatura avalia os estrogênios naturais estrona, estradiol e estriol e o sintético etinilestradiol, pois como já foi mencionado no item 3.2, a estrona, estradiol e etinilestradiol são os estrogênios de maior preocupação com relação aos efeitos adversos que causam sobre os seres humanos e animais. Esses esteróides têm sido detectados em esgoto bruto e tratado de estações de tratamento de esgoto, em águas superficiais e em menor número, em sedimento por pesquisadores de vários países (tanto países desenvolvidos como os em desenvolvimento). Eles são excretados principalmente na forma de conjugados que não são ativos biologicamente, entretanto eles podem voltar a sua forma livre, na qual são ativos, quando presentes no esgoto. Além disso, eles exercem seus efeitos fisiológicos a concentrações mais baixas que os outros esteróides e podem ser encontrados no ambiente em concentrações superiores ao respectivo LOEL (Lowest observable effect level limite de efeito observado) que para peixes e plantas é de 10 ng.L<sup>-1</sup>. Estudos realizados em rios britânicos demonstraram que esses hormônios, ainda, são suspeitos de induzir a produção de vitelogenina em peixes machos, uma vez que essa proteína é produzida somente pelas fêmeas. Em contrapartida, são poucos os estudos sobre androgênios e progestagênios (Routledge et al., 1998; Ying, 2002; Barel-Cohen, 2006; Streck, 2009).

Ternes e colaboradores (1999) realizaram um estudo que avaliou esgoto bruto e tratado de ETEs no Rio de Janeiro (Brasil) e em Frankfurt (Alemanha), ainda avaliaram amostras de água superficial e esgoto tratado de 16 ETEs alemãs e 10 ETEs canadenses. As amostras foram pré concentradas através de extração em fase sólida com cartuchos recheados com C<sub>18</sub> seguidas de análise por GC-MS/MS. Em amostras de esgoto bruto de ETEs no RJ, os esteróides estrogênicos estradiol e estrona foram detectados em concentração média de 21 e 40 ng.L<sup>-1</sup>, e para as amostras da ETE municipal em Frankfurt, foram detectadas concentrações de 15 ng.L<sup>-1</sup> e 27 ng.L<sup>-1</sup> para estradiol e estrona, respectivamente (com taxa de remoção na estação de 68 e 64% respectivamente). Em amostras de rios na Alemanha foi detectado somente a estrona em concentrações entre 0,7 e 1,6 ng.L<sup>-1</sup>. Outras amostras de esgoto tratado na Alemanha, apresentaram contaminação de estrona (9 ng.L<sup>-1</sup> com máximo de 70 ng.L<sup>-1</sup>) e etinilestradiol (1 ng.L<sup>-1</sup> com máximo de 15 ng.L<sup>-1</sup>), e no Canadá, apresentaram contaminação média de 3 ng.L<sup>-1</sup> para estrona (máximo de 0,48 ng.L<sup>-1</sup>), 6 ng.L<sup>-1</sup> para estradiol (máximo de 64 ng.L<sup>-1</sup>) e 9 ng.L<sup>-1</sup> para etinilestradiol (máximo de 42 ng.L<sup>-1</sup>).

O estudo realizado por Belfroid e colaboradores (1999), teve como foco o desenvolvimento de metodologia para análise de estrona, estradiol e etinilestradiol em amostra de esgoto tratado e de águas superficiais na Holanda, utilizando extração em fase sólida com cartuchos C<sub>18</sub>. Os analitos foram separados pela técnica de HPLC e em seguida foram sililados e então analisados por GC-MS/MS. Os resultados encontrados para amostras de esgoto tratado foram de no máximo 47 ng.L<sup>-1</sup> para estrona, o estradiol esteve na faixa de 1 a 12 ng.L<sup>-1</sup> e para etinilestradiol, a concentração mais alta encontrada foi de 7,5 ng.L<sup>-1</sup>. Para as amostras de água superficial, todos os compostos permaneceram abaixo de seus limites de detecção (0,2 ng.L<sup>-1</sup> – estrona, 0,3 ng.L<sup>-1</sup> – estradiol e 0,1 ng.L<sup>-1</sup> – etinilestradiol).

Baronti e colaboradores (2000) analisaram esgoto bruto e tratado coletados de seis ETEs na Itália e em amostras de água superficial. Essas

amostras foram pré-concentradas com cartuchos de extração em fase sólida do tipo *Carbograph* 4 (utiliza carvão ativado como material de preenchimento) seguidas de análise pela técnica de LC-MS/MS. As concentrações detectadas nas amostras de água superficial foram de 0,11 ng.L<sup>-1</sup> de estradiol, 1,5 ng.L<sup>-1</sup> de estrona e 0,04 ng.L<sup>-1</sup> de etinilestradiol. As amostras de esgoto bruto apresentaram contaminação por estradiol em concentração de 4 a 25 ng.L<sup>-1</sup> no afluente, de 25 a 132 ng.L<sup>-1</sup> para estrona e de 0,40 a 13 ng.L<sup>-1</sup> para etinilestradiol. Já para as amostras de esgoto tratado, as concentrações foram significativamente menores, demonstrando uma boa eficiência na remoção do estradiol (0,35 a 3,5 ng.L<sup>-1</sup>), estrona (2,5 a 82,1 ng.L<sup>-1</sup>) e etinilestradiol (0,30 a 1,7 ng.L<sup>-1</sup>).

Kuch e Ballschmiter (2001) avaliaram amostras de esgoto tratado de ETEs na Alemanha, que foram extraídas por fase sólida e derivatizadas, para determinação por GC-MS. As concentrações médias encontradas nas amostras de esgoto tratado para estrona foi de 1,5 ng.L<sup>-1</sup> (máxima de 18 ng.L<sup>-1</sup>), para estradiol 0,4 ng.L<sup>-1</sup> (máxima de 5,2 ng.L<sup>-1</sup>) e etinilestradiol 0,7 ng.L<sup>-1</sup> (máxima de 8,9 ng.L<sup>-1</sup>). Para amostras de água superficial foram encontradas concentrações médias de 0,4 ng.L<sup>-1</sup> para estrona (máxima de 4,1 ng.L<sup>-1</sup>), para estradiol 0,3 ng.L<sup>-1</sup> (máxima de 3,6 ng.L<sup>-1</sup>) e etinilestradiol 0,4 ng.L<sup>-1</sup> (máxima de 5,1 ng.L<sup>-1</sup>).

Tabata et al. (2001) conduziu um extenso estudo de esteróides estrogênicos em 109 rios japoneses e detectou estradiol em 87% das amostras coletadas no verão, em concentração média de 2,1 ng.L<sup>-1</sup>, e em 72% das amostras coletadas no outono, foi detectada concentração média de 1,8 ng.L<sup>-1</sup>.

Kolpin e colaboradores (2002) realizaram uma pesquisa em 139 córregos e rios poluídos dos EUA, os esteróides foram extraídos pela técnica de extração contínua líquido-líquido, derivatizados e então analisados por GC-MS. Como resultado foram encontradas concentrações médias de 160 ng.L<sup>-1</sup> para estradiol, 27 ng.L<sup>-1</sup> de estrona e 73 ng.L<sup>-1</sup> de etinilestradiol.

A adequação da cafeína como marcador químico de poluição de águas superficiais por esgoto doméstico foi avaliada por um estudo realizado por Burge e colaboradores (2003) em ETEs da Suíça. Concentrações de cafeína em esgoto bruto e tratado de estações de tratamento de esgoto (7 a 73 µg.L<sup>-1</sup> e 0.03 a

9.5 μg.L<sup>-1</sup>, respectivamente) indicam uma eficiência de eliminação de 81 a 99.9%. Apesar da eficiente remoção na maioria das ETEs, a cafeína é constantemente encontrada em lagos e rios da Suíça (6 a 250 ng.L<sup>-1</sup>), exceto em lugares onde não há ação antrópica significante, como nas montanhas (<2 ng.L<sup>-1</sup>). Concentrações de cafeína em lagos correlacionada com cargas antropogênicas de esgoto doméstico, demonstraram a adequação da cafeína como marcador (Burge, 2003).

Servos (2005) avaliou amostras de esgoto bruto e tratado de 18 estações do Canadá, determinando concentrações de estrona e estradiol pela técnica de GC/MS, avaliando a eficiência de remoção dos tratamentos empregados nessas estações. Em sistemas convencionais como o de lodos ativado e sistema de lagoas, a concentração média de estradiol e estrona em esgoto bruto foi de 15,6 ng.L<sup>-1</sup> (faixa de 2,4 a 26 ng.L<sup>-1</sup>) e 49 ng.L<sup>-1</sup> (19 a 78 ng.L<sup>-1</sup>). Em amostras de esgoto tratado, a concentração média de ambos foi de 1.8ng.L-1 (0.2 a 14.7 ng.L<sup>-1</sup>) e 17 ng.L<sup>-1</sup> (1 a 96 ng.L<sup>-1</sup>), respectivamente.

Em estudo realizado por Barel-Cohen (2006) no rio da Jordânia, foi possível detectar, nas amostras coletadas, o esteróide sintético etinilestradiol à concentração média de 1,2 ng.L<sup>-1</sup> e os estrógenos naturais (estrona e estradiol) em concentração média de 1,0 ng.L<sup>-1</sup>.

Zhao, 2009 analisou amostras de três rios no sul da China, que são fontes de água potável para a cidade de Guangzhou, dentre os compostos estudados por este autor estão estrona e estradiol, esses compostos foram detectados em níveis traços utilizando GC–MS, com amostras derivatizadas. As concentrações mais altas foram encontradas no rio Shijing em concentrações de 79 ng.L<sup>-1</sup> para estrona e 7,7 ng.L<sup>-1</sup> para estradiol.

O estudo de Ying (2009) avaliou amostras de efluentes de cinco ETE e de água dos corpos receptores, no sudeste de Queensland (Austrália). As amostras foram pré-concentradas por extração em fase sólida com cartuchos Oasis<sup>®</sup> HLB e analisadas pelo método ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assays*). Este ensaio é baseado em uma reação de competição onde uma enzima marcada padrão de estrógeno compete com o estrógeno livre presente na amostra pela ligação ao anticorpo específico monoclonal imobilizado na superfície

da microplaca. A quantidade do estrógeno padrão ligado ao prato é determinada pela adição de um substrato incolor que se torna colorido com a reação. A intensidade da cor é medida a 450nm e é inversamente proporcional a quantidade de estrógeno na amostra, com essa técnica foi possível obter limites de detecção de 0,05 ng.L<sup>-1</sup>. As concentrações detectadas no efluente foram de 22,82 ng.L<sup>-1</sup> para estrona, de 3,2 ng.L<sup>-1</sup> para estradiol e de 0,56 ng.L<sup>-1</sup> para etinilestradiol (Ying, 2009).

Chen e colaboradores (2009) avaliaram amostras de esgoto bruto e tratado de uma ETE em Taiwan utilizando a técnica de LC-MS/MS. As amostras foram extraídas com cartuchos Oasis HLB<sup>®</sup>. Somente a estrona foi detectada no esgoto bruto a concentração de 230 ng.L<sup>-1</sup>, os outros compostos permaneceram abaixo do limite de quantificação (60 ng.L<sup>-1</sup> e 25 ng.L<sup>-1</sup> para estradiol e etinilestradiol, respectivamente) ou não foram detectados.

Em estudo realizado por Kuster e colaboradores (2009) no Rio Paraíba do Sul (parte pertencente ao RJ) onde foram estudados os compostos estrona, estradiol, etinilestradiol e progesterona, foi possível detectar progesterona a concentração de 47 ng.L<sup>-1</sup> em amostra de água superficial. Os principais estrógenos, estrona, estradiol e etinilestradiol, não foram detectados, entretanto seus derivados conjugados foram detectados em concentração média abaixo de 7 ng.L<sup>-1</sup>. Os conjugados analisados foram os derivados de sulfato e de glicuronídeo da estrona, estradiol e estriol, totalizando 6 derivados. Neste trabalho também foi avaliada a utilização do cartucho C<sub>18</sub> para a extração em fase sólida, que apresentou melhor performance em relação ao cartucho OASIS<sup>®</sup> HLB para os compostos analisados. A técnica utilizada para determinação dos compostos foi a LC-MS/MS.

Estudos realizados por Reis Filho (2005), em amostras de água superficial do rio Monjolinho (São Carlos – SP), pré concentradas por extração em fase sólida (C<sub>18</sub>) e seguidas de determinação por HPLC, apresentaram resultados de contaminação das amostras por estradiol à concentração de 27,5 ng.L<sup>-1</sup> e etinilestradiol em concentração média de 16,8 ng.L<sup>-1</sup>.

Gerolin (2008) avaliou amostras de água bruta e tratada de ETAs que abastecem os municípios de Campinas e Sumaré (SP), as amostras passaram por extração em fase sólida e determinação por HPLC-MS/MS. As concentrações médias obtidas foram de 0,10 e 0,08 ng.L<sup>-1</sup> para estrona, 0,92 e 1,30 ng.L<sup>-1</sup> para estradiol e 275 e 472 ng.L<sup>-1</sup> para etinilestradiol.

Laudicéia (2010) realizou um estudo no município de Jaboticabal (SP) onde avaliou a contaminação de efluentes de ETEs e águas superficiais por estradiol e estrona. As amostras foram pré concentradas por extração em fase sólida com cartuchos C<sub>18</sub> e analisados por cromatografia líquida. Os limites de detecção obtidos foram de 3,7 ng.L<sup>-1</sup> para estradiol e 300 ng.L<sup>-1</sup> para estrona. Os resultados obtidos neste estudo apontaram a detecção de estrona em uma única amostra dos 4 pontos coletados e 9 períodos diferentes, enquanto que o estradiol foi detectado em apenas 6 amostras das 36 coletadas para o estudo.

Muitos estudos em diferentes países reportaram a presença de esteróides estrogênicos em estações de tratamento de esgoto, na faixa de 70 ng.L<sup>-1</sup> para estrona, 64 ng.L<sup>-1</sup> para estradiol e 42 ng.L<sup>-1</sup> para etinilestradiol. Embora os hormônios esteróides tenham sido detectados em diversas fontes, atualmente, existem poucos dados sobre o comportamento ambiental e destino desses hormônios nos diferentes meios. Consequentemente, a exposição e o risco associado a essas substâncias não estão adequadamente esclarecidas (Ying, 2009, Kookana e Ru, 2002).

A agência ambiental do Reino Unido revisou os dados disponíveis e propôs valores de concentrações para substâncias individuais que não causem efeito sobre a vida de água doce e marinha para os hormônios 1 ng.L<sup>-1</sup> para 17β –estradiol, 3 a 5 ng.L<sup>-1</sup> para estrona e 0,1 ng.L<sup>-1</sup> para etinilestradiol (Young *et al,* 2002). Na falta de alternativas apropriadas, estes valores podem ser usados como níveis limites para identificar áreas de risco a concentrações elevadas dessas substâncias industriais no ambiente.

# 5 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

No Brasil, o gerenciamento dos recursos hídricos é de responsabilidade da Política Nacional de Recursos Hídricos. Para uma administração mais efetiva, o país foi dividido em bacias hidrográficas, que também são denominadas Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI) e são administradas pelos Comitês de bacia, que tem como finalidade o planejamento da mesma, por meio dos Planos de Bacia (Ceivap e Agevap, 2009).

O planejamento e a gestão da Bacia do Paraíba do Sul estão sob a responsabilidade do Comitê de Integração da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul (CEIVAP) e da Associação Pró-Gestão da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul (AGEVAP).



FIGURA 5 - Área de estudo – UGRHI 2: Bacia do rio Paraíba do Sul: rios de domínio da União e de domínio Estadual (adaptado de Gruben, 2002)

A Bacia do Rio Paraíba do Sul ou UGRHI 2 (FIG. 5) está localizada no sudeste brasileiro compreendendo três importantes estados de grande

importância econômica, São Paulo na região conhecida como Vale do Paraíba Paulista (13.900 km²), Rio de Janeiro (20.900 km²) e Minas Gerais, denominada Zona da Mata Mineira (20.700 km²), totalizando uma área de 55.000 km² o que corresponde a 0,7% da área do país e 6% da região sudeste do Brasil. Em toda sua extensão há atualmente 180 municípios (88 em Minas Gerais, 53 no Estado do Rio e 39 no estado de São Paulo), sendo 36 parcialmente inseridos na bacia. O Rio Paraíba é formado pelo encontro dos rios Paraibuna e Paraitinga, na Serra da Bocaina (MG) percorrendo 1.150 km, e desembocando no mar em São João da Barra (RJ) (Gruben, 2002; COPPETEC, 2006; Paraiba do Sul, 2008; Ceivap e Agevap, 2009; FCR, 2009).

O vale do rio Paraíba do Sul distribui-se na direção leste-oeste, situando-se em uma das poucas regiões do país de relevo muito acidentado, com colinas e montanhas de mais 2.000 metros nos pontos mais elevados e poucas áreas planas, o ponto culminante é o Pico das Agulhas Negras com 2.787 metros. A bacia do Rio Paraíba do Sul é limitada ao Norte pelas bacias dos rios Grande e Doce e pelas serras da Mantiqueira, Caparaó e Santo Eduardo. À Nordeste, a bacia do rio Itabapoana estabelece o limite da bacia. Ao Sul, o limite é formado pela Serra dos Órgãos e pelos trechos paulista e fluminense da Serra do Mar. A Oeste, pela bacia do rio Tietê, da qual é separada por meio de diversas ramificações dos maciços da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira (Gruben, 2002; FCR, 2009).

A região do rio Paraíba do Sul é caracterizada por um clima predominantemente tropical quente e úmido. Os maiores índices pluviométricos ocorrem no trecho paulista da serra do Mar, nas regiões do maciço do Itatiaia e seus contrafortes e na serra dos Órgãos, trecho da serra do Mar que acompanha a Região Serrana do Estado do Rio de Janeiro, onde a precipitação anual chega a ultrapassar 2.000 mm. Nessas três regiões de altitudes elevadas, a média das temperaturas mínimas chega a menos de 10°C (Paraíba do Sul, 2008; COPPETEC, 2006).

A Bacia situa-se na região da Mata Atlântica, que se estendia, originariamente, por toda a costa brasileira (do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul) numa faixa de 300 km. Atualmente a área remanescente está

restrita a parques e reservas florestais. Cerca de 50% das florestas existentes na bacia do rio Paraíba do Sul encontra-se em Unidades de Conservação, algumas de grande destaque nacional e internacional, como o Parque Nacional de Itatiaia (primeiro Parque Nacional criado no Brasil), o Parque Nacional da Serra dos Órgãos e a Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. Unindo os três estados da bacia, destaca-se a Área de Proteção Ambiental (APA) Federal da Serra da Mantiqueira. O próprio rio Paraíba do Sul tem seu curso marcado por sucessivas represas, destinadas à provisão de água e eletricidade para as populações da bacia e também da Região Metropolitana do Rio de Janeiro. Em razão disso, o rio encontra-se hoje em estado ecológico crítico, com margens assoreadas e 40% da sua vazão desviada para o Rio Guandu. Suas águas também são utilizadas para abastecimento industrial, preservação da flora e fauna e disposição final de esgotos (COPPETEC, 2006; Gruben, 2002). Com relação à cobertura vegetal e uso do solo, 70% de sua área é formada por pastagem; 27% por culturas, reflorestamento e outros; e apenas 11% por florestas nativas (Mata Atlântica) (COPPETEC, 2006; CEIVAP e AGEVAP, 2009).

Com base nestes dados, a região estudada pode ser considerada um território praticamente antrópico. A população urbana total da Bacia, segundo o Censo IBGE de 2005, é de cerca de 5,3 milhões de habitantes, sendo que 2,3 milhões desses vivem no Estado do Rio de Janeiro, 1,2 milhões em Minas Gerais e 1,8 em São Paulo. Além desta população, cerca de 11 milhões de habitantes da Região Metropolitana do Rio de Janeiro é abastecida pelas águas dessa Bacia e que são transpostas pelo Sistema Guandu. Outro fator preocupante se refere a taxa de crescimento populacional da UGRHI, de aproximadamente 1,0% ao ano, o que pode ser considerado um índice elevado, pressionando os recursos naturais dessa área, no que se refere ao consumo e descarte de resíduos e efluentes (CEIVAP e AGEVAP, 2009; FCR, 2009).

Aproximadamente um bilhão de litros de esgotos domésticos, praticamente sem tratamento, são despejados diariamente, contribuindo para a situação de degradação da Bacia. A carga poluidora total da Bacia, de origem orgânica, corresponde a cerca de 280 toneladas de DBO por dia, 86% dos quais derivam de efluentes domésticos, e 14% industriais (CEIVAP e AGEVAP, 2009).

As principais atividades econômicas da região são a industrial e a agropecuária. A pecuária é a atividade mais representativa do meio rural, podendo-se encontrar áreas de pasto distribuídas por toda a bacia, embora boa parte do que se classifica como campo/pastagem seja de terras degradadas, com pouca ou nenhuma atividade agropecuária. A criação de gado leiteiro em regime extensivo é a atividade de maior importância econômica na região (Paraíba do Sul, 2008). Entretanto, em termos de uso da água, o maior consumidor em volume é a agricultura devido à irrigação, seguido do setor de abastecimento público, o industrial e a pecuária (COPPETEC, 2006; Paixão, 2009).

Essa área possui um parque industrial bastante diversificado, de indústrias químicas a metalúrgicas e produtoras de papel e celulose, que possuem elevado potencial poluidor, razões pelas quais dá-se grande importância e atenção ao monitoramento local.

O número de empresas de grande porte e alto potencial poluente na região é expressivo. Segundo Gruben (2002), no trecho paulista existem 2.500 empresas registradas na CETESB, entre as quais as de maior destaque são: 19 empresas químicas, 26 empresas metalúrgicas e siderúrgicas, 4 empresas de material elétrico e eletrônico, uma empresa petroquímica, 3 empresas de papel e celulose, localizadas nos seguintes municípios: São José dos Campos, Jacareí, Pindamonhangaba, Taubaté, Guaratinguetá, Caçapava, Aparecida e Cruzeiro (Gruben, 2002; COPPETEC, 2006).

Fato semelhante ocorre nos trechos fluminense e mineiro, com empresas metalúrgicas, têxteis, alimentícias e de papel e celulose, que são as grandes responsáveis pela carga poluente despejada na região do médio Paraíba (RJ) e na sub-bacia do rio Paraibuna (MG). O Programa Estadual de Investimento (Projeto Qualidade das Águas e Controle da Poluição Hídrica/Rio de Janeiro – PQA/RJ), após diagnóstico de poluição industrial, identificou 44 empresas como responsáveis por mais de 80% da poluição total no trecho fluminense da bacia, onde a Companhia Siderúrgica Nacional (CSN) se destaca pela maior contribuição (Gruben, 2002; COPPETEC, 2006).

A rápida expansão urbana e o desenvolvimento industrial na bacia proporcionaram a degradação da qualidade da água e a redução de sua disponibilidade hídrica. Ao longo do Rio Paraíba e de seus principais afluentes, indústrias se instalaram e as cidades cresceram lançando efluentes em suas águas, na maioria das vezes sem qualquer tipo de tratamento, além do aumento pela demanda de energia e água para abastecimento da crescente população e das indústrias. Das localidades pertencentes à bacia hidrográfica do Rio Paraíba do Sul com populações superiores a 15.000 habitantes, aproximadamente 82,02% da população urbanaé atendida com rede coletora de esgotos e apenas 17,6% contam com o tratamento de seus efluentes domésticos, o abastecimento de água atende 91,9% da população, refletindo de maneira inequívoca, o grau de exposição aos agentes de doenças infecto-contagiosas de veiculação hídrica a que seus habitantes estão sujeitos (Gruben, 2002; COPPETEC, 2006, Paixão, 2009).

Houve uma grande preocupação com a necessidade de aumentar os serviços de abastecimento da população, porém não houve a mesma preocupação com relação à coleta e tratamento do esgoto. Observando a FIG. 6, é possível concluir que a poluição proveniente de esgoto doméstico é uma das mais críticas na região, devido às baixas porcentagens de tratamento de esgoto coletado (COPPETEC, 2006; Paixão, 2009).

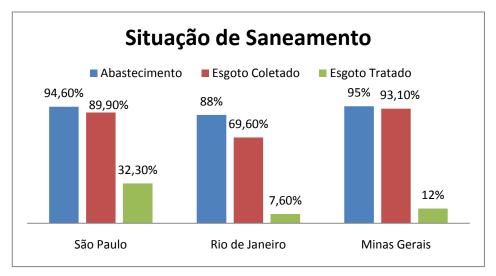


FIGURA 6 – Gráfico representativo da situação de sanemaento na região da Bacia do Rio Paraíba do Sul

## 5.1 CARACTERIZAÇÃO GERAL DOS MUNICÍPIOS AVALIADOS

## São José dos Campos

Situado a nordeste do Estado de São Paulo no Vale do Rio Paraíba, às margens da Rodovia Presidente Dutra, além de estar entre as cidades do Rio de Janeiro e São Paulo, os dois maiores centros produtivos e de consumo do país, fica também próxima ao Litoral Norte e a Serra da Mantiqueira. A cidade possui um grande centro tecnológico, com expressivas empresas estrategicamente localizadas entre a serra e o mar. Possui área de aproximadamente 1.100km², população de 615.871 de habitantes, clima tropical com temperatura média anual de 20°C e topografia bem distribuída. Ao Norte (45% do território) é constituída por montanhas, serras e picos, oscilando entre 900 e 2.082 metros de altitude, predominando a pecuária. Na parte Sul (55% do território) o relevo é suave, formado por imenso planalto e uma série de pequenos vales. Ressaltam-se as extensas planícies marginais ao Rio Paraíba do Sul e a outros cursos menores, prevalecendo às terras agricultáveis. A rede hidrográfica é riquíssima e de grande importância econômica pelo atendimento à pecuária. Representada por mais de 300 mananciais e vertentes, que compõe rios, riachos, ribeirões, córregos, regatos, arroios e aguadas de cabeceiras. Entre os rios destacam-se: Rio Paraíba do Sul, Jaguari do Peixe, Buquira, Turvo e Comprido; aproximadamente 50 ribeirões e córregos, e o restante para cursos menores (SEADE, 2008; Vale, 2008; IBGE, 2010).

### **Taubaté**

Localizado entre as Serras da Mantiqueira e Serra do Mar, no eixo de circulação dos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais. Com uma extensão territorial de 626 km², altitude de 575 m, e clima tropical de inverno seco onde a temperatura média anual é de 23°C com índice de 1.300 mm de média pluviométrica anual. A população da cidade é de aproximadamente 273.426 de habitantes (IBGE, 2010).

O perímetro urbano encontra-se em sua maior extensão em região plana com alguns bairros em colinas e a maior Zona Rural com regiões

montanhosas de baixo relevo diferenciado. Às margens do Rio Paraíba do Sul, tem como principais rios o Itaim e o Una que recebe suas águas de diversos afluentes (SEADE, 2008; Vale, 2008).

### **Guararema**

Pequena cidade localizada a leste da cidade de São Paulo, com área de 271 km², e uma população de 26.974 de habitantes. Possui clima temperado com média anual de 27°C. O principal rio que atravessa a cidade é o rio Paraíba do Sul. Talvez pelo número de empresas instaladas ou por sua proximidade com a capital deveria ser a mais impactada das quatro áreas de estudo. Porém, na prática, não é isso que ocorre. Guararema é o ponto mais limpo das quatro estações de coleta e sua água possui maior quantidade de ácidos orgânicos naturais, provenientes da decomposição de vegetação (Guararema, 2008; IBGE, 2010).

# **Pindamonhangaba**

O município de Pindamonhangaba localizado a margem da Rodovia Presidente Dutra, possui área de 730km² e população de 144.513 de habitantes. O clima característico é o subtropical quente, com temperatura média anual de 20°C. A hidrografia é composta pelo Rio Paraíba do Sul como o principal rio, e seus afluentes: Rio Piracuama, Rio Uma, Ribeirão do Curtume, Ribeirão dos Surdos e Ribeirão Grande (Pindamonhangaba, 2008; SEADE, 2008).

Nos anos de 1840 a 1860, o município foi considerado o maior produtor de café da região. Entretanto com o empobrecimento das terras de plantações de café, Pindamonhangaba passa por um período de dificuldades entre 1870 a 1920 quando inicia a criação de gado leiteiro. A partir de 1950 começa a se desenvolver o setor industrial, chegando novamente no auge econômico em 1970. Atualmente continua crescendo o setor industrial (Pindamonhangaba, 2010a; 2010b).

## 6 TÉCNICA ANALÍTICA

A química analítica empregada na avaliação ambiental está sujeita a dificuldades inerentes à complexidade da amostra e baixas concentrações das substâncias que se deseja avaliar. A determinação de compostos orgânicos em amostras ambientais está fortemente ligada a técnicas cromatográficas juntamente com sistemas de detecção específicos. Entretanto, se faz necessário a preparação dessas amostras antes da análise propriamente dita (Mas, 2010).

Uma das etapas mais críticas que envolvem a determinação dos compostos orgânicos em geral, é o pré-tratamento das amostras que incluem processos de extração, isolamento e concentração do analito. Um dos procedimentos mais empregados para esse objetivo é a extração em fase sólida, mais conhecida como SPE (solid phase extraction). Metodologias que utilizam a técnica de cromatografia gasosa com detector por espectrometria de massa e prévia extração SPE, é comumente aceita como uma das técnicas que obtém melhor separação, identificação e quantificação de compostos orgânicos como os disruptores endócrinos e pesticidas (Mansilha et al., 2010).

# 6.1 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

Amostras ambientais são complexas devido a sua composição, pois além do composto que se quer analisar, geralmente possuem outros elementos que não são de interesse para o analista. Portanto deve ser feita a preparação da amostra utilizando técnicas de isolamento dos compostos desejados (Araújo, 2006; Mansilha et al., 2010).

A SPE é uma das técnicas mais utilizadas para extração e concentração de amostras. Nesta técnica, os analitos contidos em uma matriz aquosa são extraídos, juntamente com os compostos interferentes, após passarem por um cartucho contendo material sorvente. Um solvente seletivo, normalmente orgânico, é utilizado para fazer o *clean up*, ou seja, a remoção de

interferentes e então, outro solvente é usado para eluir os analitos de interesse do material adsorvente do cartucho de extração. Apesar de a SPE apresentar vantagens com relação aos métodos tradicionais de extração líquido-líquido, tais como praticidade e maior sensibilidade, esta técnica tem algumas limitações. Uma delas refere-se à etapa de eluição do analito aprisionado no cartucho de SPE que requer geralmente, o uso de solventes tóxicos (Araújo, 2006; Mansilha et al., 2010).

O princípio da extração em fase sólida se baseia nos mesmo princípios da cromatografia líquida, onde se utiliza uma coluna com o objetivo de reter os analitos de interesse. Geralmente o material empregado nessas colunas de extração, (SPE), também chamado de cartuchos, são de materiais adsorventes de grupos funcionais orgânicos hidrofóbicos quimicamente ligados a uma superfície sólida como a sílica. A ligação do grupo C<sub>18</sub> com a sílica é o material mais utilizado como preenchimento desses cartuchos, esse material interage com os compostos orgânicos hidrofóbicos pela ação das forças de Van der Waals, e dessa forma são extraídos da fase aquosa (Araújo, 2006).

A FIG. 7 esquematiza as etapas que constituem o processo de extração em fase sólida, onde em: (1) representa o condicionamento do cartucho, que deve ser feito para ativação do material adsorvente, em seguida; (2) faz-se a percolação da amostra, onde os compostos que possuem afinidade com o material adsorvente ficará retido; (3) são removidos possíveis interferentes que tenham ficado retidos junto com os compostos de interesse e por fim, em (4) conclui o processo de extração fazendo; (4) a eluição dos analitos por meio de solvente adequado conclui o processo de extração.

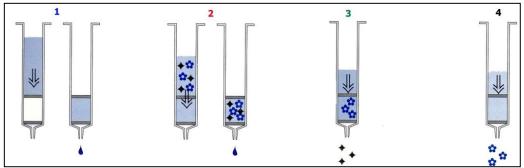


FIGURA 7 - Desenho esquemático da extração em cartuchos SPE: (1) condicionamento; (2) percolação da amostra; (3) clean up; (4) eluição

#### 6.2 CROMATOGRAFIA GASOSA

O objetivo da Cromatografia é a separação e identificação de compostos existentes em uma mistura. Esta separação depende da diferença de comportamento dos analitos que se equilibram entre a fase móvel e a fase estacionária. A cromatografia gasosa recebe este nome, pois sua fase móvel é um gás, e as soluções que são introduzidas nesse sistema, também devem estar na fase gasosa. O desenvolvimento da técnica de cromatografia gasosa foi acelerado com a introdução da cromatografia gás-líquido em 1952, por *James e Martin*. O interesse pela cromatografia gasosa fez com que houvesse um grande desenvolvimento de equipamentos e métodos, tornando-se uma técnica muito comum até os dias de hoje, estando presente na maioria dos laboratórios que realizam análises químicas (Bonato, 1995; Mansilha et al., 2010).

Na FIG. 8 é apresentado o esquema de um sistema de cromatografia gasosa.

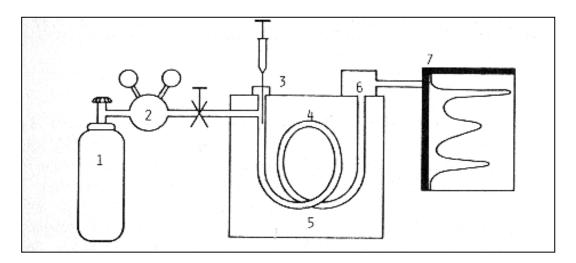


FIGURA 8 - Esquema de um sistema GC composto por: 1) Gás de arraste, 2)
Manômetro de gás, 3) Injetor, 4) Coluna cromatográfica, 5) Forno do GC,
6) Detector e 7) Registrador. Fonte: Chemkey (2010)

A fase móvel consiste em um gás inerte de elevada pureza, que carrega a amostra vaporizada pela fase estacionária. A fase estacionária pode ser constituída por um sólido ou líquido. Na forma sólida, o mecanismo de separação ocorre por adsorção da amostra sobre o material granulado que constitui a coluna. Este tipo de fase estacionária é utilizada na separação de substâncias apolares de baixa massa molecular e gases permanentes. As colunas com material de preenchimento na forma líquida são as mais utilizadas, o mecanismo de separação ocorre por partição das substâncias entre a fase líquida e a gasosa. Como exemplo de colunas com fase estacionária líquida, pode se citar os recheios de silicone que são mais comumente utilizados, pois cobrem ampla faixa de polaridade, propriedades físico-químicas variadas e possuem alta estabilidade térmica (Ciola, 1985; Bonato, 1995; Chemkey, 2010).

As colunas podem ser do tipo empacotada ou capilar, a primeira possui diâmetro interno maior (3-6 mm) em relação às colunas capilares (0,1-0,5 mm), se diferenciam também pelo comprimento. As empacotadas variam de 0,5 a 5 m de comprimento enquanto as capilares chegam até 100 m. Tanto as características referentes ao diâmetro interno quanto do comprimento da coluna, estão diretamente relacionados com a eficiência de separação (Ciola, 1985).

A interação dos componentes da mistura é influenciada por diferentes fatores físicos e químicos. O uso de temperaturas adequadas possibilita a

vaporização dos componentes que, de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária (coluna), são retidos por tempos determinados e chegam à saída da coluna em instantes diferentes, definido como tempo de retenção. Basicamente a amostra é vaporizada no injetor que permanece a elevada temperatura e carregada pelo gás de arraste, que atua como a fase móvel, através da coluna (fase estacionária). Durante a análise, a temperatura da coluna pode permanecer constante ou pode sofrer uma variação linear ou não (Ciola, 1985; Bonato, 1995).

A programação da temperatura (rampa de temperatura) é significativamente importante em cromatografia gasosa, pois facilita a separação e otimiza o tempo de análise. Inicia-se com a coluna em temperatura mais baixa, para que solutos de baixo ponto de ebulição possam eluir como picos separados e, no decorrer da análise, a temperatura da coluna aumenta com a finalidade de se diminuir a retenção de substâncias de maior ponto de ebulição (Bonato, 1995).

A cromatografia gasosa é uma técnica com ótimo poder de resolução que possibilita a análise simultânea de diversas substâncias em uma mesma amostra. A principal restrição dessa técnica, é que os compostos de interesse a serem analisados devam ser voláteis e termicamente estáveis. Quando essa condição não for possível, empregam-se tratamentos prévios da amostra como a derivatização. A grande desvantagem neste procedimento é a redução da recuperação do analito além dos erros adicionais que cada etapa de manipulação de uma amostra insere no resultado final (Bonato, 1995; Araújo, 2006).

Os principais fatores que influenciam na eficiência de uma coluna cromatográfica são: comprimento, diâmetro interno, temperatura, vazão da fase móvel, volume da amostra, técnica de injeção, características das substâncias entre outros. De modo geral, quanto maior o comprimento da coluna e menor seu diâmetro interno melhor sua eficiência, por outro lado, quanto mais espesso o filme de preenchimento da coluna menor será sua eficiência.

A fase móvel deve atender algumas exigências tais como, não interagir com o material de preenchimento da coluna, ter grande disponibilidade, ser compatível com o detector utilizado e apresentar alta pureza, para que não interfira no sinal de resposta do detector (Bonato, 1995).

O sistema de injeção consiste de um compartimento submetido a elevada temperatura, suficiente para vaporizar totalmente a amostra líquida inserida por meio de uma microseringa (10µL). O volume de amostra que passa através da coluna também influência sobre a eficiência da análise, quanto maior o volume mais largos serão os picos formados.

A cromatografia gasosa sozinha não é uma técnica qualitativa eficiente, necessitando muitas vezes, de técnicas auxiliares para a identificação segura das substâncias presentes na amostra (Bonato, 1995; Chemkey, 2010).

Os detectores mais amplamente utilizados em cromatografia gasosa são: Detector por condutividade térmica (TCD), Detector por ionização de chama (FID), Detector por captura de elétrons (ECD) e Detector por espectrometria de massas (MS).

#### 6.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas 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. Os primeiros espectrômetros de massa foram desenvolvidos com base nas pesquisas pioneiras de *J.J. Thomson* em 1912 e *F.W. Aston* em 1919 (Vega-Bustillos, 2001).

A base da espectrometria de massas é a ionização de átomos e moléculas por meio de impacto de elétrons, que são gerados pelo aquecimento de um filamento. O produto dessa interação elétron/molécula gera um íon positivo, em um estado eletrônico e/ou vibracional excitado, que são facilmente controlados por campos magnéticos e elétricos.

O espectrômetro de massas consiste em 3 partes essenciais: a fonte de íons, o analisador de massas ou filtro de massas, o coletor de íons e um

sistema de aquisição de dados que registra os sinais da abundância relativa ou intensidade de cada uma das espécies iônicas presentes.

As técnicas de ionização existentes são descritas a seguir:

- Fotoionização à pressão atmosférica (APPI) utilizado para ionização de amostras no estado líquido, por isso é frequentemente utilizado com cromatografia líquida e abrangem moléculas de difícil ionização;
- Electrospray (ESI) também faz acoplamento com cromatografia líquida por ionizar substâncias no estado líquido, e sua ionização branda possibilita a análise de macromoléculas como as proteínas;
- lonização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) a ionização é branda, realizada através de laser, o que possibilita a determinação de íons-moléculas praticamente intactos de compostos de alta massa molecular;
- lonização química à pressão atmosférica (APCI) a ionização do analito é feita por reação íon-molécula, aplicável a compostos polares e de baixa polaridade;
- lonização por impacto de elétrons é considerada a mais confiável dentre todas as fontes mencionadas, pois tem baixo espalhamento de energia e o feixe de ionização é bastante estável, alem de ser compatível com qualquer tipo de analisador de massa (McCaster, 1998; Eberlin, 2010).

Para a ionização por impacto de elétrons, a amostra deve estar na forma gasosa ao entrar na fonte de íons onde será bombardeada por um feixe de elétrons, gerando fragmentos iônicos. O feixe de elétrons, produzido pelo aquecimento de um filamento, é direcionado em uma linha reta e perpendicular à passagem da amostra, que por sua vez é direcionada à saída para o analisador de massas. Esse feixe de elétrons irá se chocar com as moléculas da amostra gerando os íons. Todo o sistema é submetido à um alto vácuo para garantir um campo limpo que não haja desvios e interação entre os íons formados. Entre a entrada e a saída da câmara de ionização, é mantido um campo elétrico de baixa

intensidade de modo que os íons formados são impulsionados para a saída, em direção ao analisador de massa. Nesta saída, existem duas lentes iônicas que formam uma alta diferença de potencial acelerando os íons para dentro do analisador de massa (Eberlin, 2010).

Assim como as diversas fontes de íons existentes, também estão disponíveis diversos tipos de analisadores de massa, como o TOF (*time-of-flight*), onde os íons viajam através de um tubo com velocidades diferentes que irá depender da relação m/z do íon, assim essa relação será deduzida de acordo com o tempo que eles levam para chegar ao coletor de íons. Com essa técnica é possível analisar desde compostos de baixa massa molecular até as macromoléculas. Os analisadores de massa por setor magnético definem o raio da trajetória dos íons de acordo com a relação m/z, variando esse campo magnético é possível controlar a chegada do íon de determinada m/z ao coletor. Esse tipo de analisador de massa é utilizado para medições de razão isotópica, massa exata e análises orgânicas (McMaster, 1998; Eberlin, 2010).

Outro tipo de analisador de massa são os quadrupolar, que podem ser de dois tipos, a armadilha de íons (Ion-trap) e o analisador de massa quadrupolo. O ion trap se assemelha a um tubo de ensaio elétrico, onde as moléculas da amostra que saem do GC colidem entre si, e os fragmentos resultantes ficam ali armazenados. Com o aumento da voltagem neste "tubo de ensaio", os fragmentos de íons formados são expulsos e caem no coletor de íons, obedecendo a uma ordem crescente de suas m/z (McMaster, 1998; Eberlin, 2010).

O analisador de massa quadrupolo é o mais utilizado em espectrometria de massas, consiste de quatro varetas dispostas paralelamente em pares, no centro deste arranjo é mantido um campo elétrico por onde os íons irão passar até atingirem o coletor de íons. Definindo a intensidade do campo elétrico é possível selecionar os íons de m/z desejados a passarem ao longo dessas varetas atingindo o coletor de íons (McMaster, 1998; Eberlin, 2010).

Ao saírem do analisador de massas, os íons que foram selecionados são coletados e convertidos em sinal elétrico, interpretados por um sistema de aquisição de dados, em forma de cromatogramas e espectrogramas. Existem duas formas de coletar íons que são através do copo de Faraday (CF) ou pelo multiplicador de elétrons (ME). O CF possui uma superfície metálica, os íons saem do analisador e ao atingirem essa superfície absorvem um elétron. Essa perda de elétron do CF é medida através de um amperímetro e essa corrente será transmitida ao sistema de aquisição de dados, a intensidade da corrente irá depender da massa do íon. Uma limitação do CF é o fato de não operar sob vácuo. Em contrapartida, o ME possui boa precisão a baixas pressões (> 10<sup>-9</sup> Torr). O ME tem formato de um cone, onde na entrada possui carga fortemente negativa em relação ao fim do cone, para que os íons positivos sejam acelerados à outra extremidade. Durante a trajetória desses íons, eles se chocam com a superfície do cone, gerando elétrons que consequentemente também irão se chocar com essa superfície, gerando uma cascata de elétrons. Na saída do ME, esses elétrons são medidos na forma de sinal elétrico pelo sistema de aquisição de dados, e interpretados em espectrogramas e cromatogramas (Veja-Bustillos, 2001).

O modo de aquisição de dados em espectrometria de massas pode ser por seleção de íons específicos (SIM) ou por varredura de uma faixa determinada de íons (SCAN). O modo SIM é empregado quando se conhece a espécie que está sendo a analisada e se deseja obter alta sensibilidade, como em análise de traços. O modo SCAN deve ser utilizado pelo menos na primeira corrida de misturas complexas ou desconhecidas (McMaster, 1998).

# 7 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

A validação é uma etapa imprescindível no processo de desenvolvimento de metodologia analítica, a fim de garantir que o método atenda corretamente aos objetivos a que está sendo proposto. É também necessária para transmitir os resultados de forma segura e confiável.

Apesar de não existir uma norma específica estabelecida nacional e internacionalmente, órgãos como IUPAC, ISO, ANVISA, INMETRO e ICH (International Conference on Harmonization) fornecem diretrizes e recomendações para a execução do procedimento de validação, requisitos fundamentais para o processo de demonstração de competência técnica (Ribani et al., 2004; Bueno, 2007).

Indiretamente, a validação de ensaio químico tornou-se uma exigência para os laboratórios, pois para demonstrarem sua competência técnica ou mesmo para acompanhar as exigências do mercado internacional e nacional, muitos se submetem ao credenciamento junto às agências competentes. No Brasil os órgãos responsáveis pela acreditação de laboratórios são a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) (Ribani et al. 2004; Inmetro, 2003; Mansilha et al., 2010)

Para garantir a reprodutibilidade do método analítico alguns parâmetros são considerados essenciais, como especificidade e seletividade, linearidade e faia de trabalho, limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD), precisão, exatidão recuperação e robustez (Mansilha et al., 2010). Na validação deste trabalho foi utilizada uma ferramenta desenvolvida por Furusawa (2007) para os cálculos estatísticos que avaliam os parâmetros de validação. Essa planilha denominada "Ensaio de Validação Química" foi baseada no documento guia do INMETRO (DOQ-CGCRE-008 de março de 2003). A validação de métodos pode ser um processo extenso e trabalhoso, mas a qualidade dos resultados gerados

está diretamente relacionada com a qualidade deste processo.

### 7.1 SELETIVIDADE/ESPECIFICIDADE

A seletividade é o parâmetro que avalia a capacidade do método em distinguir de forma inequívoca uma ou mais substâncias de interesse de outros componentes presentes na solução analisada. Amostras ambientais complexas que podem conter interferentes como, por exemplo, produtos de degradação e outros compostos de propriedades similares às do analito de interesse, que interferem na sua determinação, aumentando ou diminuindo o sinal medido pelo equipamento. A seletividade deve garantir que determinado pico represente exclusivamente o composto de estudo. Neste caso, a seletividade é também a especificidade, pois se refere a um composto especificamente (Ribani et al., 2004; Leite, 2008; INMETRO, 2010).

Outros parâmetros do processo de validação estão diretamente relacionados a seletividade, ou seja, se a seletividade não for assegurada, parâmetros como linearidade, exatidão e precisão estarão seriamente comprometidos. Portanto, a seletividade pode ser considerada o primeiro parâmetro a ser avaliado na validação de um método analítico (Ribani et al., 2004; INMETRO, 2010).

O procedimento mais utilizado para essa avaliação é por comparação da matriz isenta do composto com matriz fortificada com o padrão do analito de interesse. Muitas vezes não é possível obter uma matriz isenta do analito, nesses casos é preparada uma curva analítica com a matriz fortificada e outra curva analítica com o padrão do analito de interesse sem a matriz, utilizando solvente por exemplo. O método é considerado seletivo se as retas das duas curvas analíticas forem paralelas, mesmo que haja interferência da matriz na determinação do analito (Brito, 2009; INMETRO, 2003).

A análise da seletividade do método desenvolvido pode ser realizada de duas formas, visual e cálculos estatísticos. A primeira consiste na observação do cromatograma gerado pela injeção da solução padrão e pela sobreposição das retas obtidas nas curvas analíticas com e sem matriz. E a segunda consiste em

cálculos estatísticos como o teste de homogeneidade das variâncias (teste *F-Snedecor*), teste de significância da diferença das médias (teste t–*Student*), pelo teste de inclinação e paralelismo e teste de ajuste (ambos pelo cálculo de t–*Student*).

O teste F é calculado de acordo com a equação 1. O valor resultante é denominado F<sub>calculado</sub> e então comparado com o valor de F<sub>tabelado</sub>, que é um valor de referência que considera (n-1) grau de liberdade e a porcentagem de confiança, que usualmente é de 95%.

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} \tag{1}$$

Onde:

S1 = variância das áreas obtidas pela injeção em setuplica de uma concentração no ensaio "com matriz";

S2 = variância das áreas obtidas pela injeção em setuplica da concentração correspondente no ensaio "sem matriz".

Sendo S calculado de acordo com a equação 2.

$$S^{2} = \frac{(n_{1} - 1)S_{1}^{2} + (n_{2} - 1)S_{2}^{2}}{(n_{1} + n_{2} - 2)}$$
(2)

Onde:

S<sup>2</sup> = desvio padrão dos valores dos dois grupos

 $n_1 = tamanho da amostra do grupo 1;$ 

 $n_2 = tamanho da amostra do grupo 2;$ 

O teste t é calculado pela equação 3 e denominado t<sub>calculado</sub>. Assim como no teste F, o resultado é comparado com um valor de t<sub>tabelado</sub>, porém para definir o grau de liberdade têm-se duas situações que dependem do resultado

obtido no teste F. Caso se obtenha  $F_{calculado}$  <  $F_{tabelado}$ , o grau de liberdade é obtido 68

pela tabela de distribuição de *Student* considerando ( $n_1+n_2-2$ ) graus de liberdade e a confiança desejada (normalmente 95%), e se  $F_{calculado} > F_{tabelado}$  calcula-se o grau de liberdade pela equação 4.

$$t_{calculado} = \frac{|\overline{X}_1 - \overline{X}_2|}{\sqrt{S^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}$$
(3)

Onde:

 $|\overline{x_1}$ -  $\overline{x_2}|$  = diferença da média das 7 injeções de uma concentração no ensaio COM matriz pela média das 7 injeções da concentração correspondente no ensaio SEM matriz;

$$v = \frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{S_1^2}{n_1}\right)^2 + \left(\frac{S_2^2}{n_2}\right)^2} - 2$$

$$\frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 + 1} + \frac{\left(\frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 + 1}$$
(4)

Para a avaliação da seletividade pelos testes de Inclinação e Paralelismo e para o teste de Intercepto, são utilizadas as equações 5 e 6, respectivamente.

$$t = \frac{b1 - b2}{\overline{S}_{xy} \sqrt{\frac{1}{\sum (X_{1i} - \overline{x})^2} + \frac{1}{\sum (X_{2i} - \overline{x})^2}}}$$
(5)

Onde:

b1 = b da equação da reta do ensaio com matriz;

b2 = b da equação da reta do ensaio sem matriz;

$$t = \frac{a1 - a2}{\overline{S}_{xy} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{\overline{x}_1^2}{\sum (X_{1i} - \overline{x}_1)^2} + \frac{1}{n_1} + \frac{\overline{x}_2^2}{\sum (X_{2i} - \overline{x}_2)^2}}}$$
(6)

Onde:

a1 = a da equação da reta do ensaio com matriz;

a2 = a da equação da reta do ensaio sem matriz;

Para ambas as equações (5 e 6), considerar a equação 7:

$$\overline{S}_{xy} = \sqrt{\frac{(n_1 - 2)S_{y1x1}^2 + (n_2 - 2)S_{y2x2}^2}{n_1 + n_2 - 4}}$$
 (7)

#### 7.2 LINEARIDADE E FAIXA LINEAR DE TRABALHO

A linearidade corresponde à correlação entre uma determinada concentração do analito e o sinal correspondente medido através de um método analítico. Através dessa correlação é possível mensurar o analito em uma matriz cuja concentração é desconhecida. Na química analítica, essa relação matemática é denominada curva analítica é expressa na forma de gráfico onde nos eixos x e y têm-se as concentrações e a resposta medida, a equação da reta é obtida de acordo com a equação 8.

$$y = ax + b \tag{8}$$

Onde:

y = resposta medida ou sinal analíticos, variável dependente;

x = concentração do analito, variável independente;

a = coeficiente angular, expressa a inclinação da curva analítica;

b = coeficiente linear, expressa a interseção da curva aos eixos.

A qualidade de uma curva analítica pode ser verificada pelo coeficiente de determinação (r²) obtido pelo quadrado do valor do coeficiente de correlação

(r). É uma medida da proporção da variabilidade em uma variável que é explicada pela variabilidade da outra. Em outras palavras pode-se dizer que é a medida de quão bem os dados se ajustam à reta de regressão e o quanto as variáveis envolvidas no modelo são realmente significativas. É pouco comum que se tenha uma correlação perfeita (r²=1) na prática, pois existem diversos fatores que determinam as relações entre variáveis nessas situações.

Coeficiente de correlação de Pearson (r), ou simplesmente Coeficiente de correlação, mede o grau da correlação entre duas variáveis de escala métrica. Este coeficiente, assume valores entre -1 e 1, onde:

- r = 1 Significa uma correlação perfeita positiva entre as duas variáveis.
- r = -1 Significa uma correlação negativa perfeita entre as duas variáveis, isto é, quando uma aumenta, a outra sempre diminui.
- r = 0 Significa que as duas variáveis não dependem linearmente uma da outra, podendo existir uma dependência não linear.
   Neste caso deve ser investigado por outros meios.

O chamado coeficiente de determinação (r²) é o quadrado do coeficiente de correlação de Pearson, que varia entre zero e um, onde "um" representa uma correlação perfeita (100%) enquanto zero, teoricamente representa nenhuma correlação entre as variáveis em questão. Se um modelo de regressão apresenta r² = 0,90, temos o nosso modelo com coeficiente de determinação igual a 90%. Assim, quanto mais próximo de 1 estiver, maior o ajuste do modelo.

O valor de r<sup>2</sup> deve estar o mais próximo de 1 para que a dispersão do conjunto de pontos experimentais e a incerteza dos coeficientes de regressão estimados sejam pequenas. O INMETRO recomenda que esse valor seja superior a 0,90 para que a curva analítica seja utilizada para quantificação.

Para a verificação dos desvios da linearidade entre os pontos da curva analítica aplica-se a análise de resíduos através do teste t (*Student*), calculado com a equação 9, além dos gráficos de resíduos e probabilidade normalizada.

$$t_{calculado} = \frac{resíduo}{\frac{S_r}{\sqrt{n}}}$$
 (9)

Onde:

Resíduo =  $|X_{\text{medido}} - X_{\text{calculado}}|$ ;

 $S_r$  = desvio padrão dos resíduos;

N = número de pontos.

O valor de  $t_{calculado}$  obtido é comparado ao valor de  $t_{tabelado}$ , caso o  $t_{calculado}$  seja menor ou igual ao  $t_{tabelado}$ , esse ponto será considerado como pertencente à curva e a faixa de trabalho que o envolve será linear. Deve-se considerar (n-1) graus de liberdade e definir a confiança desejada, normalmente 95%.

Outra forma de verificar a linearidade é pela realização da análise de variância (ANOVA) que faz uma análise estatística pelos testes F de regressão e ajuste. O teste F de regressão tem a finalidade de verificar a adequação do modelo de regressão adotado aos dados obtidos, considerando 95% de confiança. Enquanto que o teste F de ajuste verifica o quanto esse modelo se ajusta ao conjunto de dados obtidos, também com 95% de confiança. Além dos testes F, a ANOVA faz uma avaliação da porcentagem de variação explicada e da porcentagem máxima de variação explicável, ou seja, o quanto de variação pode ser explicada dentro da porcentagem explicável pelo ajuste aplicado ao método.

A faixa de trabalho corresponde ao intervalo entre o valor superior e inferior que se pode quantificar a substância de interesse com margem segurança nos resultados aceitável. Dentro desta faixa de trabalho deve estar situada a concentração esperada da amostra a ser quantificada. Os métodos utilizados para quantificação em um processo de validação compreendem padronização externa ou interna, superposição de matrizes e adição padrão. Nos quatro métodos é

construída uma curva analítica, se diferenciando apenas no modo como é feita. Por exemplo, na padronização externa, obtêm-se a curva analítica por meio de injeções de soluções do padrão da substância de interesse em diferentes concentrações. Por este método ser muito sensível a erros de preparação e injeção da amostra e dos padrões, a curva deve ser feita a cada análise ou conjunto de análises.

Pelo método de padronização interna, a solução padrão é preparada nas diferentes concentrações e para cada nível de concentração é adicionado uma quantidade da solução do padrão interno, de modo que sua concentração seja a mesma em todos os níveis. A curva analítica apresentará a razão da área da substância de interesse pela área do padrão interno. Para a quantificação, é necessário que se adicione a mesma quantidade de padrão interno nas amostras. A padronização interna é menos susceptível a erros como interferentes da amostra, injeção e variações do equipamento.

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.

O método de adição padrão é bastante similar ao método de superposição de matrizes, porém utiliza a própria amostra para construção da curva analítica. Geralmente se faz uso deste método em situações onde há o efeito da matriz e não é possível obter uma matriz de referência ou o padrão interno adequado.

De modo geral, o mais importante é que o método de quantificação selecionado forneça melhor exatidão e um alto nível de precisão.

### 7.3 LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectado em determinado método analítico com certo limite de confiabilidade. A determinação do LD tem como base a curva analítica preparada

com a matriz em estudo. Assim, o cálculo pode ser realizado pela multiplicação do desvio padrão das 7 replicatas de menor concentração da curva analítica.pela abscissa t (*Student*) para (n-1) graus de liberdade com 95% de confiança, como mostra a equação 10 (Bueno, 2007; INMETRO, 2003; 2010).

$$LD = t_{(n-1,1-\alpha)} \cdot (S) \tag{10}$$

Onde:

S = desvio padrão das 7 replicatas da menor concentração

t = valor da abscissa t (*Student*) para (1 - α) x 100% nível de confiança e (n-1) graus de liberdade.

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito que pode ser quantificada com segurança. O LQ pode ser obtido pela média de 7 replicatas do primeiro ponto da curva analítica mais cinco, seis ou dez vezes o desvio padrão obtido das mesmas, como na equação 11. Para o LQ, também é utilizada a curva analítica preparada com a matriz em estudo (Bueno, 2007; INMETRO, 2003; 2010).

$$LQ = \overline{X} + (5,6 \text{ ou } 10) \cdot S \tag{11}$$

Onde:

- X = média das 7 replicatas da concentração do menor ponto da curva analítica:
- S = desvio padrão das 7 replicatas da concentração do menor ponto da curva analítica.

#### 7.4 EXATIDÃO

O parâmetro exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um ensaio definido e o valor de referência aceito como verdadeiro. Um processo de validação tem como um dos principais objetivos obter a exatidão. Os métodos mais utilizados para a avaliação da

exatidão consistem na utilização de material de referência certificado, comparação de métodos, ensaios de recuperação (INMETRO, 2003; Bueno, 2007).

A exatidão pode ser avaliada pelo índice z (z Score) como mostra a equação 12 (INMETRO, 2010).

$$z = \frac{(X_{laboratório} - X_{verdadeiro})}{S}$$
 (12)

Onde:

X<sub>laboratório</sub> = valor obtido pelo laboratório;

X<sub>verdadeiro</sub> = valor aceito como verdadeiro (valor do MRC, valor médio de um programa de comparação interlaboratorial, valor de concenso de um de proficiência, por exemplo);

s= desvio padrão do conjunto de valores do ensaio de proficiência.

O valor de z obtido segue o seguinte critério.

 $|z| \le 2$ , o resultado está satisfatório;

2 < |z| < 3, o resultado é questionável;

|z| > 3, o resultado é insatisfatório.

### 7.5 PRECISÃO

A precisão é definida como a concordância dos resultados de medições obtidos entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições determinadas. Para verificar a precisão de um método, usualmente são realizadas repetições de análises e reprodução da análise em situações adversas (INMETRO, 2003) Pode ser avaliada em termos de desvio—padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV). Quando se estuda precisão, na verdade se está avaliando a dispersão dos valores em amostras medidas em replicatas. É necessário também que se verifique a existência de valores discrepantes. Nos processos de validação de métodos analíticos de

resíduos e impurezas a taxa aceitável de desvio padrão relativo (DPR) (equação 13) é de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (Ribani et al., 2004).

DPR(%) ou CV(%) = 
$$\frac{S}{X} \times 100$$
 (13)

Onde:

s: desvio padrão;

X: concentração média determinada.

A avaliação dos resultados dos estudos de repetitividade pode ser feita utilizando o cálculo do limite de repetitividade, *r*, de acordo com a equação 14.

$$r = t_{(n-1,1-\alpha)}.\sqrt{2}.S (14)$$

Onde,

 $t_{(n-1,1-\alpha)}$  = valor da estatística t de *Student* para n-1 graus de liberdade no intervalode confiança estabelecido

s = desvio padrão para as n replicatas executadas.

Caso a diferença entre os valores das replicatas seja maior do que *r*, algum valor deverá ser descartado. Os valores de exatidão podem ser obtidos pelos métodos: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (Pires e Furusawa, 2010).

O descarte de um valor deverá ser substituído por outro (mais uma replicata). Caso este passe no teste, pode-se calcular a média aritmética do conjunto, senão, calcula-se a mediana do conjunto com o valor discrepante. A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas realizadas em um curto espaço de tempo, utilizando um mesmo método, sem que haja mudanças nas condições de medição, no procedimento, no analista, e no instrumento utilizado (INMETRO 2003; Ribani et al., 2004; Bueno,

2007). O objetivo é verificar se os resultados se repetem ou se distribuem aleatoriamente mesmo repetindo-se as condições mencionadas (Pires e Furusawa, 2010).

O objetivo da Precisão intermediária é avaliar as variações do laboratório por meio de medições em diferentes dias, ou por diferentes analistas ou em diferentes equipamentos. Este método é considerado o mais representativo e com ele o laboratório garante que um mesmo método irá fornecer os mesmos resultados (INMETRO 2003; Ribani et al., 2004; Bueno, 2007).

A Reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas em outro laboratório, por outro equipamento e por outro analista, como em ensaios de proficiência. Embora não seja um parâmetro de validação de um único laboratório, ensaios de proficiência são de suma importância para avaliar o desempenho dos métodos desenvolvidos naquele laboratório (INMETRO 2003; Ribani et al., 2004; Bueno, 2007).

### 7.6 ROBUSTEZ

A robustez mede o quanto um método pode ser considerado sensível frente a pequenas e deliberadas variações. Assim, um método é considerado robusto quando ele não é afetado por essas variações, que por sua vez devem representar alterações esperadas quando esse método é transferido para outros laboratórios, realizado por outro analista ou equipamento (INMETRO, 2003; Ribani et al., 2004; Bueno, 2007).

Na avaliação devem ser consideradas as variáveis do método que mais influenciem o resultado. Podem ser avaliados, por exemplo, a composição da fase extratora, colunas de diferentes fabricantes, alteração de temperatura, parâmetros do equipamento, entre outros. Assim como os demais parâmetros, a robustez deve ser incluída no procedimento 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 (INMETRO, 2003).

O teste de Youden é o mais recomendado para a determinação da robustez. Este teste consiste na seleção de 7 variáveis de influência significativa sobre o método, que são arranjados por uma combinação fatorial, resultando em 8 ensaios distintos. Com os resultados obtidos por estes ensaios, é possível verificar a robustez do método e ordenar a influência de cada variável selecionada (INMETRO, 2003; Ribani et al., 2004).

TABELA 2 - Planejamento fatorial saturado para avaliação da estimativa do erro da distribuição dos efeitos utilizando o algoritmo de Dong (pequenos experimentos)

Valor do	Combinação Ensaiada							
Fator	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	Α	Α	Α	Α	а	а	а	а
B ou b	В	В	b	b	В	В	b	b
C ou c	С	С	С	С	С	С	С	С
D ou d	D	D	d	d	d	d	D	D
E ou e	Е	е	Е	е	е	Е	е	Е
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	У	Z

Os resultados obtidos em cada ensaio combinado representa a influência que cada fator exerce sobre o composto, que são mais facilmente interpretáveis através dos gráficos de robustez, probabilidade normalizada e Rankit.

# 7.7 RECUPERAÇÃO

O estudo de recuperação pode ser estimado por meio de fortificação (spike) da amostra com concentrações conhecidas da solução padrão dos compostos estudados. O método de fortificação da matriz é considerado uma limitação do teste de recuperação, pois o analito adicionado se apresenta exatamente da mesma forma que a contaminação na amostra *in natura*, resultando em uma avaliação excessivamente otimista da recuperação, pois os

analitos adicionados apresentarão uma forma mais favorável à detecção. Deste modo, é recomendável que a recuperação seja realizada em três níveis diferentes de concentração, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração intermediária ao intervalo estimado (INMETRO, 2003; Ribani et al., 2004). O cálculo da recuperação do analito pode ser realizado de acordo com a equação 15.

$$Recuperação (\%) = \frac{valor \ obtido}{valor \ adicionado} \times 100 \tag{15}$$

Pelo teste de recuperação em três diferentes níveis de concentração, é possível observar a variação da eficiência do método em função da concentração da substância. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados é inversamente proporcional a concentração, assim, a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Devido a isso, os intervalos de recuperação aceitáveis variam de 70 à 120% em análises de resíduo, ou ainda na faixa de 50 à 120% para amostras mais complexas (Ribani et al., 2004; Brito, 2009).

### 7.8 INCERTEZA DA MEDIÇÃO

A apresentação de um resultado obtido por um método analítico é completa somente se a ele estiver associada à incerteza de medição envolvida na obtenção desse valor. Assim, o conceito de incerteza está diretamente associado à variabilidade do resultado analítico. Por definição, o resultado obtido é considerado "grandeza de saída" e os fatores que influenciam na medida dessa grandeza é denominada "grandeza de entrada", que são diversas para uma única grandeza de entrada (NIT-DICLA-021, 2003; Brito, 2009). Segundo o Guia Eurachem, a incerteza de medição é definida como: "Um parâmetro associado ao resultado de uma medição, caracteriza a dispersão que poderiam ser razoavelmente atribuídas ao mensurando" (Guia Eurachem, 2002).

Este item é um requisito fundamental à qualidade laboratorial, uma vez que são inúmeros os fatores que podem afetar o resultado de uma medição. A incerteza associada a uma estimativa de grandeza de entrada, pode ser determinada direta ou indiretamente, sendo denominada de avaliação do Tipo A e

avaliação do Tipo B, respectivamente. No primeiro caso, a incerteza padrão é obtida pela análise estatística após sucessivas medições no instrumento, portanto a incerteza padrão será o desvio padrão da média. Quando a avaliação é do Tipo B, a incerteza é obtida por fontes externas como certificados de fabricantes, materiais de referência certificados, dados de manuais entre outros.

As fontes de incerteza devem ser quantificadas, de forma a possibilitar a avaliação da influência da grandeza na medida final. Dificilmente são consideradas todas as incertezas que influenciam uma metodologia, porém devem ser considerados o máximo de parâmetros que forem identificados para que se tenha uma idéia muito próxima da influência dos mesmos no resultado final. As incertezas têm como fontes os erros sistemáticos (podem não ser reconhecidos) e aleatórios (estimada por meio do desvio padrão). Pode ser avaliada desde um desvio padrão a um múltiplo dele proveniente de várias fontes possíveis como: pureza de padrões, amostragem, efeito matriz, interferentes, condições ambientais, incertezas das massas e equipamentos volumétricos, valores de referência, aproximações atribuídas ao método ou à medição e variação aleatória (Guia Eurachem, 2002; Eurachem, 2000).

Na estimativa da incerteza total quando o componente de incerteza é expresso como desvio padrão, ele é designado de Incerteza Padronizada, u(xi). Deve ser estimada para cada fonte de erro envolvida, analisando criticamente o processo de medição para identificar as fontes significativas de erros e quantificar os valores correspondentes das respectivas incertezas padronizadas de cada componente, uc(y). O conjunto destas incertezas levará à estimativa da incerteza combinada para o resultado do mensurando(y), obtido por meio das estimativas das grandezas de entrada. Incerteza Padronizada Combinada, uc(y), é um desvio padrão obtido pelo cálculo da raiz quadrada positiva da variância total, obtida pela combinação de todos os componentes da incerteza.

A Incerteza Expandida (U) é o componente que fornece um intervalo mais provável, com alto nível de confiança para o valor do mensurando. O valor de U é obtido multiplicando-se uc(y) por um Fator de Abrangência (k), que é baseado no nível de confiança desejado, por exemplo, 2 se o nível de confiança for de 95,45% (Guia Eurachem, 2002).

# 7.8.1 Diagrama de Causa e Efeito (Espinha de Peixe ou Ishikawa)

As principais fontes de incertezas podem ser identificadas por meio de um diagrama de causa e efeito. A correta utilização deste diagrama permite simplificar os cálculos, agrupando as incertezas de forma a considerar que todas as fontes sejam envolvidas no cálculo (NIT-DICLA-021, 2003).

Na FIG. 9 é apresentado o Diagrama de Causa e Efeito para a metodologia proposta para extração e determinação de estrógenos e hormônios considerados disruptores endócrinos em amostras de água destinadas ao abastecimento público.

As fontes de incerteza identificadas nesta metodologia foram as associadas à curva analítica, ao fator de recuperação do analito e ao volume final da solução. Sendo que as fontes envolvidas no cálculo da incerteza da curva analítica são a preparação da solução padrão, as diluições das soluções e as incertezas associadas à área de resposta de cada analito. E foram estabelecidas de acordo com o item 8.4.8 desta dissertação.

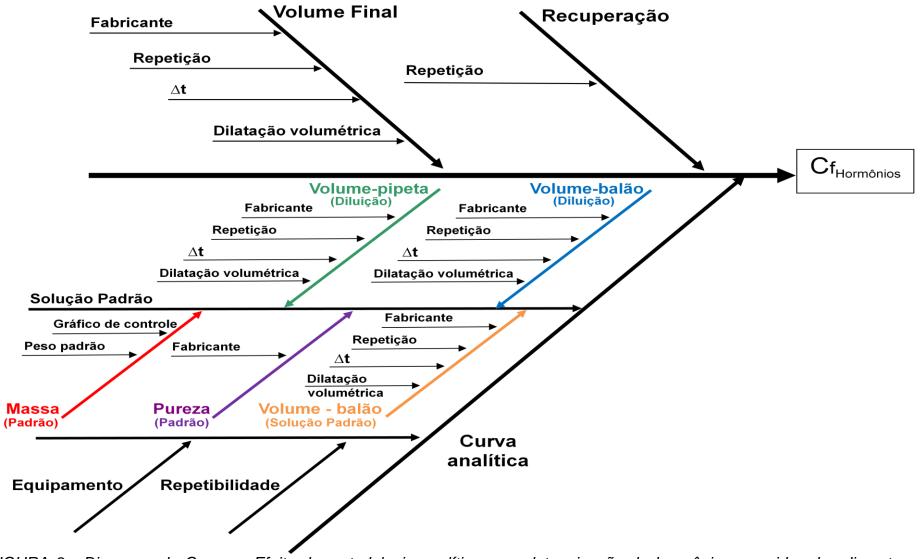


FIGURA 9 - Diagrama de Causa e Efeito da metodologia analítica para determinação de hormônios, considerados disruptores endócrinos, em água

### 8 PARTE EXPERIMENTAL

# 8.1 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Cromatógrafo a gás, Shimadzu 17A, acoplado ao detector de espectrometria de massas, Shimadzu - QP 5000 (FIG. 10), microprocessador de dados equipado com o programa GCMS Solution;
  - Sistema de filtração Sartórius a vácuo (FIG. 11);
- Sistema de extração em fase sólida, desenvolvido no laboratório do CQMA-IPEN (FIG. 12).



FIGURA 10 - Cromatógrafo gasoso (esquerda) acoplado a um espectrômetro de massas (direita)

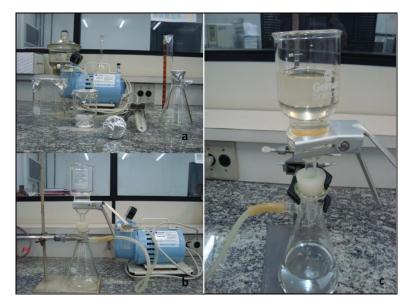


FIGURA 11 - Material utilizado para sistema de filtração (a), sistema Sartórius montado (b), filtração de amostra de água bruta (c)

A bomba utilizada para a formação de vácuo, tanto para a filtração como para o processo de extração, era livre de óleo para evitar contaminação proveniente de vapores do aquecimento da bomba.



FIGURA 12 - Sistema de extração em fase sólida

# 8.1.1 Outros equipamentos

Alguns equipamentos de uso comum em laboratório também foram utilizados para a realização de todo o procedimento, sendo:

- Equipamento de purificação de Água por osmose reversa ELIX 3,
   Millipore;
  - Equipamento de purificação de Água EASY pure PR, Barnstead;
  - Balança analítica E. METTLER (H16);
  - Compressor/Aspirador Dia pump (089-CAL), FANEM;
  - Microondas ELETROLUX;
  - Centrífuga SOLUMIX.

# 8.1.2 Reagentes e Soluções

- Água ultrapura (tipo 1) de baixa condutância;
- Metanol (MeOH), Diclorometano (DCM) e Acetona;
- Padrões de referência com certificado dos compostos: cafeína, androstano, estrona, estradiol, etinilestradiol, norgestrel e progesterona;
  - Solução Nitro sulfônica;
  - Ácido clorídrico.

Todos os reagentes e solventes utilizados são de grau (HPLC), analítico cromatográfico ou compatível. Para a confecção das curvas de calibração e desenvolvimento da metodologia foram utilizados padrões analíticos, com certificado de pureza de procedência Aldrich Chemical Co. As soluções padrões estoque foram preparadas em meio metanol, mantidas sob refrigeração e protegidas da luz.

#### 8.2 AMOSTRAGEM

As amostras de água bruta e tratada foram coletadas nas estações de tratamento de água da SABESP dos municípios de São José dos Campos, Taubaté, Pindamonhangaba e Guararema. A primeira coleta foi realizada com o acompanhamento dos funcionários da Divisão de Controle Sanitário-RVOC da SABESP de São José dos Campos, para familiarização com as instalações, as coletas posteriores foram realizadas exclusivamente pela SABESP (FIG. 13).



FIGURA 13 - 1ª Coleta de amostras de água tratada (a) e bruta (b)

O procedimento de coleta seguiu o Guia de coletas da CETESB (1987). Foram utilizados frascos de vidro âmbar de 1 litro lavados e descontaminados, durante o transporte esses frascos foram mantidos em caixas de isopor refrigerados com gelo, procurando manter a temperatura em torno de 4ºC. Assim que chegavam ao CQMA/IPEN, essas amostras eram imediatamente armazenadas em geladeira.

### 8.3 METODOLOGIA DESENVOLVIDA

A parte experimental deste trabalho consiste de várias etapas que se inicia com a preparação da amostra e finaliza com a análise no equipamento e interpretação dos dados gerados. O procedimento desenvolvido e otimizado será apresentado nos itens a seguir.

Na FIG. 14 é apresentado um fluxograma contendo todas as etapas realizadas.

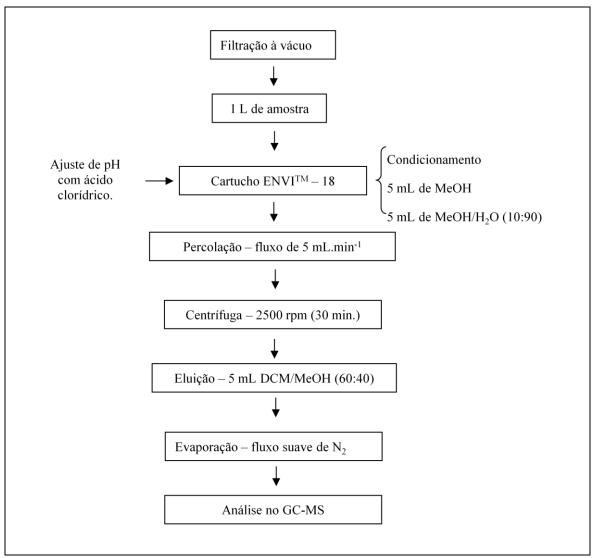


FIGURA 14 - Fluxograma do procedimento de preparação da amostra

# 8.3.1 Estudos para definição da metodologia

Para a definição do cartucho a ser utilizado, foram realizados testes de extração com diferentes tipos de cartuchos SPE (*Solid Phase Extraction*) como o OASIS®HLB *Cartridge da Waters* (1 mL) recheado com resina, *Supelclean*<sup>TM</sup> *ENVI*<sup>TM</sup>–*Carb* (6 mL), com grafite e *Supelclean*<sup>TM</sup> *ENVI*<sup>TM</sup>–18 (6 mL), preenchido com octadecil. A extração foi testada através da percolação de água de osmose reversa, em pH 7, fortificada com uma mistura de padrões analíticos, a um fluxo médio de 5 mL.min<sup>-1</sup>. Em artigos consultados, foram seguidas recomendações para extração e meio ácido. Pelos testes iniciais comprovou-se um melhor resultado de recuperação dos analitos quando a amostra era acidificada a pH 3 com ácido clorídrico e medido com tiras indicadoras de pH. Foram, portanto,

realizados ensaios também nas mesmas condições com água acidificada a pH 3 com solução de ácido clorídrico. O procedimento de extração foi definido após 14 testes, onde foram avaliados o cartucho, a etapa de condicionamento, a etapa de eluição e o pH da amostra, conforme apresentado na TAB. 3.

TABELA 3 - Testes de extração realizados para a definição do procedimento final

Teste	Cartucho	Condicionamento	Eluição	рН
1	OASIS®HLB (1mL)	- 1 mL de MeOH + - 1 mL de água <i>Milli-Q</i> + - 1 mL de água <i>Milli-Q</i> com pH 3.	- 4 mL de MeOH	3
2	ENVI <sup>™</sup> – 18 (6mL)	- 6 mL de MeOH + - 6 mL de água <i>Milli-Q</i> + - 6 mL de água <i>Milli-Q</i> com pH 3.	- 5mL de MeOH	3
3	ENVI <sup>TM</sup> – 18 (6mL)	- 5 mL de DCM + - 5 mL de MeOH + - 5 mL de água <i>Milli-</i> Q.	- 5 mL de MeOH	Neutro
4	ENVI <sup>TM</sup> – 18 (6mL)	- 5 mL de DCM + - 5 mL de MeOH + - 5 mL de água <i>Milli-</i> Q.	- 5 mL de MeOH	3
5	ENVI <sup>TM</sup> – 18 (6mL)	- 5 mL de DCM + - 5 mL de MeOH + - 5 mL de água <i>Milli-</i> Q.	- 5 mL de MeOH	3
6	ENVI <sup>™</sup> – 18 (6mL)	- 5 mL de MeOH + - 5 mL de MeOH/água <i>Milli-</i> Q (10:90).	** - 5 mL de MeOH + - 5 mL de EtOAc + - 5 mL de EtOAc/Acetona (50:50)	Neutro
7	ENVI <sup>TM</sup> – 18 (6mL)	- 5 mL de MeOH + - 5 mL de MeOH/água <i>Milli-</i> Q (10:90).	** - 5 mL de MeOH + - 5 mL de EtOAc + - 5 mL de DCM/MeOH (60:40)	3
8	ENVI <sup>™</sup> – Carb (6mL)	- 5 mL de MeOH + - 5 mL de MeOH/água <i>Milli-</i> Q (10:90).	** - 5 mL de MeOH + - 5 mL de EtOAc + - 5 mL de EtOAc/Acetona (50:50)	Neutro

TABELA 3 – continuação

Teste	Cartucho	Condicionamento	Eluição	рН
9	ENVI <sup>™</sup> – Carb (6mL)	- 5 mL de MeOH + - 5 mL de MeOH/água <i>Milli</i> -Q (10:90).	** - 5 mL de MeOH + - 5 mL de EtOAc + - 5 mL de DCM/MeOH (60:40)	3
10	ENVI <sup>™</sup> – 18 (6mL)	- 5 mL de MeOH + - 5 mL de MeOH/água <i>Milli</i> -Q (10:90).	** - 5 mL de MeOH + - 5 mL de EtOAc + - 5 mL de DCM/MeOH (60:40)	3 (no dia anterior)
11	ENVI <sup>TM</sup> – 18 (6mL)	- 5 mL de MeOH + - 5 mL de MeOH/água  Milli-Q (10:90).	** - 5 mL de MeOH + - 5 mL de EtOAc + - 5 mL de EtOAc/Acetona (50:50);	Neutro
12	4 cartuchos ENVI <sup>™</sup> – 18 (6mL)	- 5 mL de MeOH + - 5 mL de MeOH/água <i>Milli</i> -Q (10:90).	- 5 mL de MeOH; - 5 mL de DCM; - 5 mL de EtOAc; - 5 mL de DCM/MeOH (60:40)	3
13	2 cartuchos ENVITM – 18 (6mL)	- 5 mL de MeOH + - 5 mL de MeOH/água Milli-Q (10:90).	<ul> <li>5 mL de MeOH + 5 mL de         DCM/MeOH (60:40);     </li> <li>5 mL de DCM/MeOH (60:40)         na segunda     </li> </ul>	3
14	2 cartuchos ENVITM – 18 (6mL)	- 5 mL de MeOH + - 5 mL de MeOH/água Milli-Q (10:90)	<ul><li>5 mL de MeOH + 5 mL de DCM/MeOH (60:40);</li><li>5 mL de DCM/MeOH (60:40)</li></ul>	3

<sup>\*\*</sup> a eluição foi feita no mesmo cartucho, porém de um solvente para outro o eluato foi coletado em vials separados

O uso do cartucho OASIS® HLB é amplamente empregado na extração de estrógenos, entretanto a utilização de cartuchos C<sub>18</sub> também apresentou resultados satisfatórios nesse estudo e em estudos encontrados na literatura (Kuster, 2009). Portanto, após os testes apresentados na TAB. 3, optou-se pelo cartucho ENVI<sup>TM</sup>–18, por ter menor custo, ser de fácil aquisição e apresentar resultados semelhantes.

Na primeira etapa da preparação das amostras é feita a filtração à vácuo em um sistema *Sartórius*, utilizando membranas de 0,45 μm, para a remoção dos sólidos suspensos que podem prejudicar a extração por SPE, além disso, os compostos orgânicos podem readsorver na parte sólida (Brito, 2009; Otomo, 2007). Quando não foi possível realizar a extração logo após a filtração, as amostras foram armazenadas em geladeira. Antes da extração em fase sólida (SPE), as amostras foram acidificadas com ácido clorídrico a pH 3.

Os cartuchos de SPE foram condicionados antes da percolação, utilizando metanol (MeOH) e em seguida, uma mistura de MeOH e Água Milli-Q na proporção de 10:90 v/v. No condicionamento é necessário que a solução fique em contato com o recheio do cartucho por 2 minutos, para que se faça a ativação do material adsorvente. Nesta etapa é importante não deixar o cartucho secar, pois isso favorece a formação de caminhos preferenciais, prejudicando o processo de extração.

A percolação da amostra foi realizada em fluxo de aproximadamente 5 mL.min<sup>-1</sup>, para que as substâncias de interesse da amostra pudessem ser adsorvidas pelo material do cartucho. Ao final desta etapa, o cartucho foi centrífugado por 30 minutos a 2500 rpm (rotações por minuto) para eliminação da água residual.

Para a eluição utilizou-se 5 mL de uma mistura de diclorometano (DCM) e MeOH na proporção de 60:40 v/v. Assim como na etapa de condicionamento, o solvente ficou, inicialmente, em contato com o material de recheio do cartucho por 2 minutos e após este tempo foi eluído a um fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, sendo recolhido em um frasco (vial) de vidro e depois transferido em alíquotas para o balão volumétrico de 1 mL aonde foi evaporado em fluxo suave de N<sub>2</sub>. A etapa de evaporação tem a finalidade de redução do volume concentrando o eluato para 1 mL. Por fim, o volume foi acertado para 1 mL e foi realizada a injeção da solução resultante no equipamento (GC/MS).

### 8.3.2 Análise por GC/MS

O método cromatográfico depende de variáveis que podem ser modificadas de acordo com o que se deseja analisar. Inicialmente foi testado o método cromatográfico encontrado em literatura, entretanto, devido a não reprodução deste método no equipamento utilizado foram testadas outras condições, com injeção de padrão dos compostos individualmente e de mistura desses padrões, até que fosse obtido um método cromatográfico seletivo, em que todos os compostos foram adequadamente separados.

No desenvolvimento do método no GC foi utilizada uma coluna DB 5 (5% phenyl e 95% dimethylpolysiloxane) de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme da fase estacionária. Os parâmetros explorados foram: temperatura do injetor, rampa de temperatura do forno da coluna, temperatura da interface, velocidade do gás de arraste pela coluna, velocidade da amostra na coluna, voltagem do detector e seleção de íons a serem analisados pelo MS.

Os parâmetros definidos para o GC, com os quais foram obtidos os resultados desejados são listados a seguir:

- Temperatura do injetor: 265°C;
- Temperatura da interface: 270°C;
- Rampa de temperatura do forno (FIG.15):
- Fluxo na coluna: 1,6 mL.min<sup>-1</sup>;
- Fluxo total: 28 mL.min<sup>-1</sup>;
- Pressão total: 101 kPa;
- Velocidade Linear: 48,1 cm.sec<sup>-1</sup>.

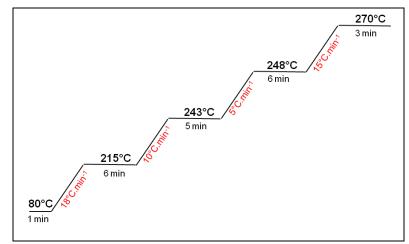


FIGURA 15 - Programação da rampa de temperatura do GC

Os parâmetros definidos para o MS, com os quais foram obtidos melhores resultados são listados a seguir:

Modo de aquisição dos dados: SIM;

• Tempo de corte do solvente: 3 minutos;

Voltagem do detector: 2,5 kV;

Relações massa/carga selecionadas para os 7 compostos (TAB. 4);

TABELA 4 - Relação massa/carga dos 5 íons monitorados para cada composto

Composto	Faixa de tempo		Relação m/z				
Composio	(minutos)	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5	
Cafeína	5,50-11,00	109	165	193	194	195	
Androstano	11,00-20,00	203	245	259	260	261	
Estrona	20,00-22,75	146	213	270	271	272	
Estradiol	22,75-24,00	160	213	272	273	274	
Etinilestradiol	24,00-25,50	213	228	296	297	298	
Norgestrel	25,50-27,50	91	245	297	312	313	
Progesterona	27,50-33,50	124	147	314	315	316	

Para a determinação dos compostos propostos, foram utilizados padrões analíticos com certificado de pureza da *Aldrich Chemical Co*. Foram preparadas soluções estoques individuais para cada composto, de acordo com o procedimento a seguir: em uma balança analítica pesou-se 1 mg dos padrões

(cafeína, androstano, estrona, estradiol, etinilestradiol, norgestrel e progesterona) em balões volumétricos de 10 mL devidamente calibrados, em seguida fez-se a dissolução em MeOH. A solução padrão mista estoque foi preparada a partir da solução estoque de cada composto e, a partir desta solução realizaram-se as diluições para preparação das soluções de trabalho utilizadas para a curva analítica e para os ensaios de validação com e sem matriz. Entretanto, percebeuse a necessidade de substituir o uso do solvente MeOH puro pela mistura de eluição (DCM/MeOH – 60:40), pois a resposta no equipamento apresentou-se de forma diferente quando diluída somente no primeiro solvente, além disso, a extração é feita com a mistura de solventes. Os solventes utilizados são de grau analítico cromatográfico ou compatível.

Devido à diferença na sensibilidade dos compostos no equipamento, foram utilizadas diferentes concentrações para cada um dos compostos, como pode ser observado na TAB. 5, na qual são apresentadas as concentrações de trabalho utilizadas.

TABELA 5 - Concentrações das soluções de trabalho dos compostos estudados

		Estradiol				
	Cafeína	Androstano	Estrona	Progesterona	Etinilestradiol	
				Norgestrel		
	0,05250	0,050	0,460	0,400	0,440	
<u>-</u> -	0,10500	0,100	0,920	0,800	0,880	
g.m	0,13125	0,125	1,150	1,000	1,100	
ão µ	0,15750	0,150	1,380	1,200	1,320	
Concentração µg.mL <sup>-1</sup>	0,17375	0,175	1,610	1,400	1,540	
ceni	0,21000	0,200	1,840	1,600	1,860	
Con	0,23625	0,225	2,070	1,800	2,080	
	0,26250	0,250	2,300	2,000	2,200	

# 8.4 ENSAIOS PARA VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

Para a avaliação dos parâmetros de validação estudados neste trabalho foram realizados ensaios com os dois tipos de matriz (água bruta e água tratada) e somente com o solvente, isto é, sem matriz. As áreas dos picos obtidos

nos cromatogramas foram utilizadas nos cálculos estatísticos referentes a cada parâmetro. Nestes testes foram utilizados oito níveis de concentrações, conforme apresentado anteriormente (TAB 5).

#### 8.4.1 Seletividade

O parâmetro seletividade foi avaliado baseando-se na análise do cromatograma gerado pela injeção da mistura de padrão dos 7 compostos avaliados, pelo teste de homogeneidade das variâncias (teste *F-Snedecor*) e teste de significância da diferença das médias (teste *t-Student*).

A seletividade do procedimento foi verificada a partir de uma situação controlada em que se estabeleceram dois conjuntos de soluções com 8 níveis crescentes de concentrações para os analitos de interesse. No primeiro conjunto denominado "sem matriz" utilizou-se a mistura de solvente da eluição dos compostos após extração para a diluição dos analitos. No segundo conjunto foi utilizada a matriz das amostras a serem analisadas (água bruta e água tratada). Foram utilizadas duas curvas, com e sem matriz, a fim de verificar a possível interferência da matriz nas medidas dos analitos.

Para extração das amostras dos quatro municípios avaliados, seguiuse o procedimento citado no item 8.3.1. Entretanto, a eluição dos 4 extratos foi realizada no mesmo recipiente coletor, obtendo assim uma única amostra (de 16 mL) representativa dos quatro mnicípios amostrados. Essa amostra foi dividida em 8 partes iguais para a adição de padrão em 8 níveis de concentração. As injeções de cada concentração foram realizadas em setuplicata. Como citado anteriormente, os ensaios foram realizados em matriz de água bruta, matriz de água tratada e sem matriz (DCM/MeOH - 60:40).

Para os cálculos estatísticos, utilizou-se como ferramenta a planilha "Ensaio de Validação Química" desenvolvida por Furusawa (2007) com base no documento do INMETRO DOQ-CGCRE-008 (2003, 2007, 2010) intitulado "Orientação sobre validação de métodos analíticos". Nesses testes estatísticos, os valores de F e t foram calculados para as oito concentrações de cada composto. Os valores de F foram obtidos pela equação 1 e os valores de t pela equação 2

descritas no item 7.1, para avaliar o efeito da matriz sobre a precisão do método (para o teste F) e se a matriz afeta as medidas do ensaio (para o teste t).

Avaliou-se o comportamento das curvas obtidas para cada conjunto (com e sem matriz), observando a relação entre as variâncias dos dois conjuntos de dados, a fim de verificar se os resultados de quantificação (precisão) são diferentes ao usar cada uma das curvas.

#### 8.4.2 Faixa de trabalho e Linearidade

Na avaliação do parâmetro Linearidade foi considerado o coeficiente de determinação (r²) das curvas analíticas para cada conjunto (água bruta, água tratada e sem matriz), os valores obtidos pelo teste t para a verificação do desvio da linearidade de cada ponto de concentração, considerando que quando o valor de t<sub>calculado</sub> foi menor que o valor de t<sub>tabelado</sub> o ponto pertence à curva.

Para verificar o comportamento linear, avaliaram-se também os gráficos de distribuição espacial dos resíduos absolutos em função da concentração e em função da probabilidade normalizada de cada resíduo, demonstrando possíveis valores discrepantes (outliers). Adicionalmente foram avaliados os dados obtidos por cálculos na tabela ANOVA.

### 8.4.3 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção foi calculado pela média das 7 replicatas da menor concentração mais o valor da abscissa t (*Student*) para (n-1) graus de liberdade com 100% de confiança multiplicado pelo desvio padrão obtido para essa concentração, de acordo com a equação 10 do item 7.3.

O limite de quantificação (LQ) foi obtido pela média das medidas de 7 replicatas do primeiro ponto da curva analítica mais cinco vezes o desvio padrão obtido das mesmas, conforme equação 11 (item 7.3).

#### 8.4.4 Exatidão

Para avaliação da exatidão foi utilizado material de referência, onde os valores obtidos foram comparados com os valores certificados através do índice z-score, além dos resultados dos cálculos de erros normalizados.

#### 8.4.5 Precisão

Neste trabalho, a precisão foi determinada pela repetitividade e reprodutibilidade das medições dos analitos em concentrações diferentes, dias diferentes e injeções sucessivas (7 replicatas) realizadas pelo mesmo analista, utilizando o mesmo procedimento e mesmo equipamento. A repetitividade foi analisada pelo cálculo de desvio padrão ou desvio padrão de repetitividade para cada concentração.

#### 8.4.6 Robustez

Para a avaliação da robustez do método foram selecionados 7 fatores com influência sobre o método, conforme relacionados na TAB. 6.

Os valores nominais de cada fator é representado pelas letras maiúsculas A, B, C, D, E, F e G e as respectivas variações estão representadas pelas letras minúsculas a, b, c, d, e, f e g. Essas 14 variáveis foram combinadas em 8 experimentos diferentes conforme TAB. 6 de "combinação ensaiada" extraída do documento do INMETRO, conforme citado no item 7.6 desta dissertação. Foram realizados estudos para as concentrações equivalentes a um ponto no meio da curva analítica. Os resultados considerados nos cálculos foram as médias de 3 replicatas para cada um dos oito estudos.

TABELA 6 - Fatores selecionados para a avaliação da robustez

Fator		Nominal	Variação		
Mistura extratora		60 <sub>DCM</sub> :40 <sub>МеОН</sub>	а	40 <sub>DCM</sub> :60 <sub>MeОН</sub>	
pH das amostras		3	b	6	
Temperatura do injetor °C	С	265	С	240	
Temperatura da interface °C	D	270	d	250	
Fluxo total, mL.min <sup>-1</sup>	Е	28	е	35	
Fluxo na coluna, mL.min <sup>-1</sup>	F	1,6	f	2	
Voltagem do detector, kV	G	2,5	g	2,2	

# 8.4.7 Recuperação

Os testes de recuperação foram realizados por adição da mistura de padrão nas amostras, seguindo o procedimento descrito no item 8.3.1. A recuperação foi realizada em 2 concentrações diferentes (TAB. 7), consideradas média e alta.

TABELA 7 - Concentrações do ensaio de recuperação

Composto	Concentração µg.L <sup>-1</sup>				
Composio	Média	Alta			
Cafeína	1,31	2,62			
Androstano	1,25	2,50			
Estrona	11,50	23,00			
Estradiol	10,00	20,00			
Etinilestradiol	11,00	22,00			
Norgestrel	10,00	20,00			
Progesterona	10,00	20,00			

O cálculo de recuperação foi realizado segundo a equação 15 do item

#### 8.4.8 Cálculo de incerteza

O parâmetro incerteza foi avaliado pelos cálculos de desvio padrão das fontes de incerteza identificadas e apresentadas no diagrama de Causa e Efeito (espinha de peixe ou Ishikawa), que foram associadas a curva analítica, ilustrado na FIG. 9 do item 7.8.1.

#### 8.4.8.1 Incerteza associada à curva analítica

Para a o cálculo das incertezas associadas à curva analítica, (μ<sub>curva</sub>), consideram-se as incertezas associadas à preparação da solução padrão, diluições para preparação das soluções de trabalho e as incertezas associadas às respostas do equipamento (áreas).

A incerteza da curva analítica pode ser estimada de diferentes formas em um ponto determinado. A rede metrológica indica que a forma mais adequada de estimar a incerteza padrão da curva de regressão em determinado ponto é considerando a correlação entre os coeficientes a e b da reta (RM 68, 2009).

Nesta dissertação, a incerteza associada à curva de calibração foi estimada utilizando uma planilha de cálculos adaptada do ISO GUM *Uncertainty in Chemistry* (2009).

### 8.4.8.1.1 Incertezas associadas à solução padrão

As fontes de incerteza envolvidas no cálculo da incerteza para preparação da solução padrão são a massa, pureza do padrão e volume do balão, conforme diagrama da FIG. 9.

Associado à massa, temos a incerteza da balança, do peso padrão e de repetitividade, de acordo com a equação 16.

$$\mu_{Massa\ Padrão} = \sqrt{\left(\mu_{repe}\right)^2 + \left(\mu_{peso\ padrão}\right)^2 + \left(\mu_{calib.balança}\right)^2} \tag{16}$$

Em relação ao volume do balão volumétrico, são consideradas as incertezas associadas à informação do fabricante, repetições, variação de temperatura e coeficiente de dilatação do vidro, de acordo com a equação 17.

$$\mu_{Vol.bal\~ao} = \sqrt{\left(\mu_{repe}\right)^2 + \left(\mu_{fabricante}\right)^2 + \left(\mu_{\Delta t}\right)^2 + \left(\mu_{coef.dilataç\~ao}\right)^2} \ \ (17)$$

Para a incerteza combinada da preparação da solução padrão temos a equação 18.

$$\mu_{Padr\~ao} = \sqrt{(\mu_{Massa\ Padr\~ao})^2 + (\mu_{Vol.bal\~ao})^2 + (\mu_{Pureza\ Padr\~ao})^2}$$
 (18)

# 8.4.8.1.2 Incertezas associadas à preparação das soluções de trabalho

Para a o cálculo das incertezas associadas à diluição para preparação das soluções de trabalho, as fontes de incerteza envolvidas são o volume da pipeta e o volume dos balões. Em ambos é necessário considerar informação do fabricante, repetições, variação de temperatura e coeficiente de dilatação, conforme equação 17.

Para a incerteza combinada da preparação das soluções de trabalho é necessário considerar as incertezas de cada uma das diluições, como mostra na equação 19.

$$\mu_{C_{Sol;trab.}} = C_{Sol.trab.} \sqrt{\left(\frac{\mu(V_{sol.estoq.})}{V_{sol.estoq.}}\right)^2 + \left(\frac{\mu(V_{10})}{V_{10}}\right)^2 + \left(\frac{\mu(C_{sol.estoq.})}{C_{sol.estoq.}}\right)^2}$$
(19)

onde:

C<sub>sol\_trab</sub> = concentração da solução mista de trabalho;

μV<sub>sol.estoq</sub> = incerteza do volume pipetado da solução estoque individual para preparação da solução mista de trabalho;

V<sub>sol.estoq</sub> = volume pipetado da solução estoque individual para preparação da solução mista de trabalho;

 $\mu V_{10}$  = incerteza do volume final da solução mista de trabalho;

 $V_{10}$  = volume final da solução mista de trabalho;

μC<sub>sol.estoque</sub> = incerteza da solução estoque de cada composto;

Csol.estoque = concentração da solução estoque de cada composto.

Sendo que, as concentrações das soluções de trabalho foram obtidas pela equação 20.

$$C_{Sol.trab.} = C_{Sol.estoque} \cdot \frac{V_{estoque}}{V_{10}}$$
 (20)

# 8.4.8.1.3 Incertezas associadas à resposta do equipamento (área)

No cálculo da incerteza da área (resposta) dos cromatogramas, μ<sub>Área</sub>, foi considerada a combinação das incertezas da repetitividade e as incertezas associadas ao equipamento. O cálculo foi realizado considerando-se 95% e uma distribuição retangular. Neste cálculo, subentende-se que estão considerados os erros do analista e do equipamento. A incerteza para a repetitividade de injeção no GC/MS é calculada de acordo com a equação 21.

$$\mu(A_{obtida}) = \frac{S}{\sqrt{n}} \tag{21}$$

onde:

S = desvio padrão das medições;

n = numero de injeções realizadas.

Para a incerteza relacionada ao equipamento foi considerada a resolução do equipamento na base dos picos, visto que o erro é maior do que à meia altura. O valor da incerteza foi obtido pela divisão da resolução por raiz de 3.

# 8.4.8.2 Incerteza associada à recuperação

A incerteza associada à recuperação,  $\mu_{(R)}$ , para os estudos de acordo com o procedimento estabelecido é calculada de acordo com a equação 22.

$$\mu(R) = R \sqrt{\left(\frac{\mu(C_{Real})}{C_{Real}}\right)^2 + \left(\frac{\mu(C_{Obtida})}{C_{Obtida}}\right)^2}$$
 (22)

onde:

R = valor de recuperação;

 $\mu(C_{Real})$  = incerteza da solução padrão adicionada;

C<sub>Real</sub> = concentração real adicionada;

 $\mu(C_{Obtida})$  = incerteza da concentração obtida;

C<sub>Obtida</sub> = concentração obtida.

A incerteza da concentração obtida,  $\mu_{(Cobtida)}$ , é calculada pela equação.23.

$$\mu(C_{Obtida}) = \frac{S_{rec}}{\sqrt{n}} \tag{23}$$

onde:

S<sub>rec</sub> = desvio padrão dos ensaios de recuperação; n = numero de ensaios de recuperação.

#### 8.4.8.3 Incerteza associada ao volume final

Associado ao volume final da amostra,  $\mu_{(VF)}$ , consideram-se as incertezas referentes ao balão volumétrico de 1 mL, isto é, as incertezas associadas à informação do fabricante, repetições, variação de temperatura de acordo com a equação 24.

$$\mu_{Volume} = \sqrt{\left(\mu_{repe}\right)^2 + \left(\mu_{fabricante}\right)^2 + \left(\mu_{\Delta t}\right)^2 + \left(\mu_{coef.dilatação}\right)^2} \quad (24)$$

## 8.4.8.4 Incerteza combinada e expandida

A incerteza combinada de todas as fontes envolvidas é calculada pela equação 25.

$$\mu_{C(C_{horm\hat{o}nios})} = \sqrt{(\mu_{V\_final})^2 + (\mu_R)^2 + (\mu_{curva})^2}$$
(25)

onde:

 $\mu_{V_{\text{final}}}$  = incerteza associada ao volume da amostra;

 $\mu_R$  = incerteza associada à recuperação;

 $\mu_{curva}$  = incerteza associada à curva analítica.

A incerteza expandida do método,  $\mu_{E(Chormônios)}$ , calculada pela equação 26.

$$\mu_{E(C_{horm\hat{o}nios})} = K \cdot \mu_{C(Cf)}$$
 (26)

onde:

 $\mu_{C(Cf)}$  = incerteza combinada;

k = fator de abrangência;

# 8.5 DETERMINAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO TOTAL

Com o objetivo de avaliar a interferência das matrizes nas determinações dos compostos propostos, foram realizadas nas amostras da segunda, terceira e quarta coletas a análise do teor de carbono orgânico.

A determinação dos compostos orgânicos foi realizada por método instrumental que envolve a reação de oxidação do carbono, sendo capaz de determinar carbono em baixas concentrações. O carbono presente é oxidado (Câmara ou forno de Combustão com catalisador a 680°C ou 720°C) a dióxido de carbono, CO<sub>2</sub>, que é então, medido espectrofotometricamente na região de

absorção do infra-vermelho (*non-dispersive infrared*, NDIR), com grande sensibilidade e precisão nas medições. O limite de determinação desta técnica está na ordem de centenas de ng.mL<sup>-1</sup>.

## 9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos nos testes estatísticos aplicados na avaliação dos parâmetros envolvidos na validação da metodologia no que se refere a seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação, exatidão, precisão, robustez, recuperação e cálculo de incerteza. Os resultados obtidos através da quantificação das amostras coletadas na área de estudo, utilizando a metodologia desenvolvida e validada, também estão apresentados neste capítulo, além dos resultados das análises de teor de carbono orgânico.

#### 9.1 SELETIVIDADE

A seletividade da metodologia foi avaliada realizando-se a corrida cromatográfica no método desenvolvido para padrões em solventes apenas, a fim de avaliar a separação dos compostos presentes nas soluções com e sem matriz. Na FIG. 16 é apresentado como exemplo, o cromatograma da mistura padrão de cafeína e dos hormônios estudados, referente à concentração de aproximadamente 2 μg.mL<sup>-1</sup>, onde pode ser observada a excelente separação dos compostos estudados, além da separação desses compostos dos demais presentes como impurezas.

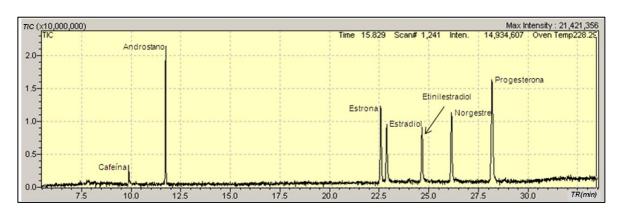


FIGURA 16 - Cromatograma de padrão misto de hormônios obtido em modo SCAN

Os resultados obtidos nos ensaios com matriz de água tratada, foram utilizados nos cálculos do teste F, considerando n=7 e 95% de confiança, conforme mencionado no item 8.4.1. e estão apresentados na TAB. 8. Nessa mesma tabela, também estão apresentados os resultados obtidos nos cálculos do teste t (*Student*).

TABELA 8 - Dados para o teste de seletividade (teste F, n=7) dos compostos estudados. Adição de padrão na matriz de água tratada (AT) e sem matriz. Tabela com os resultados dos valores calculados. Considerando  $t_{tabelado} = 2,179$  e  $F_{tabelado} = 4,28$ 

Cafeína						
Concentração	S	2	Е	4		
(µg.mL <sup>-1</sup> )	Matriz - AT	Sem Matriz	F <sub>calc</sub>	t <sub>calc</sub>		
0,052	52875561	19098269	2,77	2,87		
0,105	218939021	70325966	3,11	8,35		
0,131	281269631	160131553	1,76	12,48		
0,157	340972447	300782300	1,13	12,06		
0,174	1122491669	53174588	21,11	8,76		
0,210	1347956285	118503282	11,37	9,06		
0,236	1602362288	302072463	5,30	8,07		
0,262	7629865310	85455523	89,28	4,35		

Androstano							
Concentração	S	2	$F_{calc}$	t <sub>calc</sub>			
(μg.mL <sup>-1</sup> )	Matriz - AT	SEM Matriz	· caic	Caic			
0,050	103838831	8786999	11,82	5,87			
0,100	75243676	103105783	0,73	17,04			
0,125	22995134	211405636	0,11	16,27			
0,150	1092473574	496703418	16,19	7,79			
0,175	1219312049	67468619	2,45	4,85			
0,200	367008549	1608398699	0,23	4,97			
0,225	437622948	185363015	2,36	15,18			
0,250	3901682299	49036324	79,57	3,16			

TABELA 8 – continuação

	,	Estrona		
Concentração	s	2	Б.	<b>4</b> .
(µg.mL <sup>-1</sup> )	Matriz - AT	Sem Matriz	$F_{calc}$	t <sub>calc</sub>
0,460	178170571	45345766	3,93	0,30
0,920	203018932	71769861	2,83	8,34
1,150	88415802	56979846	1,55	19,30
1,380	781107551	126290602	6,19	10,88
1,610	675415668	12081534	55,90	17,02
1,840	755648969	228249472	3,31	14,00
2,070	3650197224	412062805	8,86	9,01
2,300	13795792814	75814798	181,97	7,09
		Estradiol		
Concentração	s	2	_	
(µg.mL <sup>-1</sup> )	Matriz - AT	Sem Matriz	$F_{calc}$	t <sub>calc</sub>
0,400	36058443	14262802	2,53	2,66
0,800	25143259	9772129	2,57	3,31
1,000	55232913	38499027	1,43	5,97
1,200	9849276	19252146	0,51	13,34
1,400	92705681	5905403	15,70	14,82
1,600	354536692	186482587	1,90	5,67
1,800	758991966	112694391	6,73	5,58
2,000	2491846603	10739169	232,03	3,90
	I	Etinilestradiol		
Concentração	s	2	_	
(µg.mL <sup>-1</sup> )	Matriz - AT	Sem Matriz	⊢ <sub>calc</sub>	t <sub>calc</sub>
0,440	18469984	11786939	1,57	1,81
0,880	26135055	5346706	4,89	4,87
1,100	50638726	21313997	2,38	6,78
1,320	24870156	3263276	7,62	13,57
1,540	116271419	6019061	19,32	9,56
1,860	82678235	65795118	1,26	9,41
2,080	537675770	31705003	16,96	4,80
2,200	1599399451	25015842	63,94	6,26

TABELA 8 – continuação

Norgestrel							
Concentração	S	) <sup>2</sup>	$F_{calc}$	<b>.</b>			
(µg.mL <sup>-1</sup> )	Matriz - AT	Sem Matriz	r calc	t <sub>calc</sub>			
0,400	14054286	23887083	0,59	1,16			
0,800	12948871	16498321	0,78	2,59			
1,000	40600342	2799709	14,50	2,29			
1,200	37842082	16984523	2,23	6,78			
1,400	75454236	20886465	3,61	6,39			
1,600	28579368	10577244	2,70	11,34			
1,800	464871023	116023474	4,01	2,61			
2,000	611112310	28466191	21,47	3,99			

Progesterona							
Concentração	s	2	$F_{calc}$	$t_calc$			
(µg.mL <sup>-1</sup> )	Matriz - AT	Sem Matriz	r calc	calc			
0,400	276073555	28861271	9,57	1,43			
0,800	169491853	77347014	2,19	14,87			
1,000	144842524	156172192	0,93	23,38			
1,200	1433431749	97928080	14,64	15,83			
1,400	3657792792	46331392	78,95	13,83			
1,600	1812232253	305028608	5,94	19,27			
1,800	11317621058	654998127	17,28	8,57			
2,000	37138552940	162969010	227,89	6,23			

Os valores de F<sub>calculado</sub> foram comparados com o valor F<sub>tabelado</sub>= 4,28 (6 graus de liberdade e 95% de confiança), foi observado que para alguns dos compostos estudados esse valor calculado foi superior ao tabelado, significando que estatisticamente a matriz interfere na precisão das medidas para esses compostos. Do mesmo modo, os resultados do teste t (*Student*) foram comparados ao valor de t<sub>tabelado</sub>= 2,179 (12 graus de liberdade e 95% de confiança), e foi observado que para praticamente todos os compostos os valores de t<sub>calculado</sub> são superiores ao tabelado, significando que as matrizes utilizadas afetam os ensaios para praticamente todas as concentrações avaliadas. Essa avaliação evidencia que resultados obtidos contra uma curva analítica preparada se matriz, somente com os solventes, serão diferentes se obtidos contra uma curva preparada com uma matriz igual ou semelhante à amostra. Na metodologia desenvolvida, como a matriz não é certificada (padrão), as determinações foram

realizadas a partir da adição de padrões a uma amostra de referência de acordo com o procedimento INMETRO (2007).

Na TAB. 9, podem ser observados os valores obtidos nos testes F e t considerando as mesmas condições do ensaio de matriz de água tratada, porém agora com os resultados obtidos no ensaio com matriz de água bruta.

TABELA 9 - Dados para o teste de seletividade (teste F, n=7) dos hormônios estudados. Adição de padrão na matriz de água bruta (AB) e sem matriz. Tabela com os resultados dos valores calculados. Considerando  $t_{tabelado} = 2,179$  e  $F_{tabelado} = 4,28$ 

Cafeína						
Concentração	s	2	$F_{calc}$	<b>t</b> .		
(µg.mL <sup>-1</sup> )	Matriz - AB	Sem Matriz	□ calc	t <sub>calc</sub>		
0,052	16914265364	19098269	885,64	7,20		
0,105	4204906877	70325966	59,79	21,22		
0,131	8515388503	160131553	53,18	14,64		
0,157	11102870894	300782300	36,91	16,58		
0,174	29109953097	53174588	547,44	8,29		
0,210	6841223171	118503282	57,73	24,34		
0,236	20511051303	302072463	67,90	14,60		
0,262	9730130092	85455523	113,86	20,62		
		Androstano				
Concentração	s²	2	F			
(µg.mL <sup>-1</sup> )	Matriz - AB	Sem Matriz	F <sub>calc</sub>	t <sub>calc</sub>		
0,050	50732859	8786999	5,77	2,06		
0,100	53392769	103105783	0,52	0,34		
0,125	47595950	211405636	0,23	3,78		
0,150	259789608	496703418	0,52	0,09		
0,175	77034042	67468619	1,14	4,22		
0,200	98261866	1608398699	0,06	0,56		
0,225	416120802	185363015	2,24	0,10		
0,250	216048497	49036324	4,41	0,89		

TABELA 9 – continuação

Estrona						
Concentração	s²	2	-	4		
(µg.mL <sup>-1</sup> )	Matriz - AB	Sem Matriz	$F_{calc}$	t <sub>calc</sub>		
0,460	961906562	45345766	21,21	36,55		
0,920	1010376046	71769861	14,08	79,83		
1,150	2839741602	56979846	49,84	51,15		
1,380	27920709783	126290602	221,08	23,04		
1,610	60627949889	12081534	5018,23	18,16		
1,840	19077972955	228249472	83,58	38,08		
2,070	19426554594	412062805	47,14	39,09		
2,300	45480690329	75814798	599,89	26,64		
		Estradiol				
Concentração	s	2	F			
(µg.mL-1)	Matriz - AB	Sem Matriz	F <sub>calc</sub>	t <sub>calc</sub>		
0,400	332401032	14262802	23,31	21,72		
0,800	),800 2197154866 9772129		224,84	21,95		
1,000	5662564500	38499027	147,08	16,53		
1,200	2890114663	19252146	150,12	25,57		
1,400	12402569306	5905403	2100,21	12,92		
1,600	3564649329	186482587	19,12	34,57		
1,800	1474534113	112694391	13,08	56,35		
2,000	8900340616	10739169	828,77	25,15		
	Ē	Etinilestradiol				
Concentração	s²	2	Е	1		
(µg.mL <sup>-1</sup> )	Matriz - AB	Sem Matriz	$F_{calc}$	t <sub>calc</sub>		
0,440	133144939	11786939	11,30	22,50		
0,880	108351759	5346706	20,27	80,54		
1,100	6442608653	21313997	302,27	14,85		
1,320	9524853656	3263276	2918,80	19,60		
1,540	12692705029	6019061	2108,75	17,37		
1,860	1509137996	65795118	22,94	61,28		
2,080	24424720617	31705003	770,37	18,53		
2,200	3165048920	25015842	126,52	55,01		

TABELA 9 – continuação

Norgestrel							
Concentração	s²	2	$F_{calc}$	t			
(µg.mL <sup>-1</sup> )	Matriz - AB	Sem Matriz	• calc	t <sub>calc</sub>			
0,400	121687739	23887083	5,09	12,66			
0,800	109059206	16498321	6,61	43,10			
1,000	1275625171	2799709	455,63	21,53			
1,200	5938345793	16984523	349,63	13,82			
1,400	4496020144	20886465	215,26	17,23			
1,600	716403881	10577244	67,73	53,79			
1,800	16018995020	116023474	138,07	16,25			
2,000	9799689531	28466191	344,26	21,83			

Progesterona							
Concentração	s	2	$F_{calc}$	t <sub>calc</sub>			
(µg.mL <sup>-1</sup> )	Matriz - AB	Sem Matriz	• calc	caic			
0,400	1115163665	28861271	38,64	13,52			
0,800	276516632	77347014	3,58	91,20			
1,000	5546522680	156172192	35,52	32,71			
1,200	35370541426	97928080	361,19	16,41			
1,400	25200045417	46331392	543,91	21,66			
1,600	2184930031	305028608	7,16	84,94			
1,800	51916005472	654998127	79,26	22,86			
2,000	50901051759	162969010	312,34	24,59			

Fazendo a mesma avaliação, foram comparados os valores calculados com os valores de F e t tabelados, para todos os compostos os cálculos de F e t resultaram em valores superiores ao F e t tabelados, em todos os níveis de concentração. Exceto para o composto androstano, que apresentou valores de F e t inferiores para a maioria das concentrações, significando que o comportamento desse composto em matriz de água bruta é semelhante quando o mesmo está presente somente em solvente (sem matriz).

Essa diferença de comportamento dos compostos em diferentes matrizes pode ser mais facilmente interpretada pelos gráficos de área pela concentração (FIG. 17), onde pode-se observar as diferentes inclinações das retas.

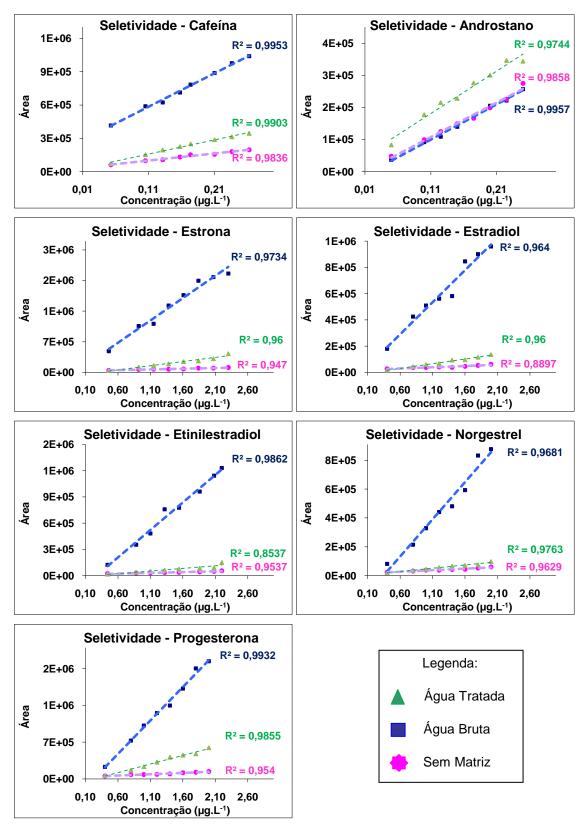


FIGURA 17 - Representação gráfica da seletividade para matriz de água tratada e bruta e no ensaio sem matriz

Comprovando estatisticamente o comportamento das retas, na TAB. 10 e 11 são apresentados os resultados obtidos no teste de inclinação e paralelismo e no teste de intercepto.

TABELA 10 - Valores obtidos no ensaio com matriz de Água Tratada, para o Teste t *Student* para a verificação da inclinação e paralelismo e do intercepto na análise de seletividade. O valor 2,179 é o valor crítico para 8 (n-1) graus de liberdade considerando os dois conjuntos (com e sem matriz) de dados com 95% de confiança

Composto	$t_{calculado} = 2,179$				
Composio	Teste Inclinação/Paralelismo	Teste do Intercepto			
Cafeína	40,1	1,0			
Androstano	16,0	13,7			
Estrona	29,8	10,8			
Estradiol	15,5	6,5			
Etinilestradiol	13,9	5,7			
Norgestrel	8,5	3,5			
Progesterona	40,4	11,8			

TABELA 11 - Valores obtidos no ensaio com matriz de Água Bruta, para o Teste t-*Student* para a verificação da inclinação e paralelismo e do intercepto na análise de seletividade. O valor 2,179 é o valor crítico para 8 (n-1) graus de liberdade considerando os dois conjuntos (com e sem matriz) de dados com 95% de confiança

Composto	$t_{\text{calculado}} = 2,179$				
Composio	Teste Inclinação/Paralelismo	Teste do Intercepto			
Cafeína	102,5	72,3			
Androstano	1,6	3,4			
Estrona	86,0	2,0			
Estradiol	58,9	1,9			
Etinilestradiol	68,0	13,1			
Norgestrel	60,4	17,1			
Progesterona	95,1	18,3			

Os valores de t<sub>calculado</sub> foram comparados com os valores de t<sub>tabelado</sub> conforme equação 4 e 5 do item 7.1. Para quase todos os compostos e concentrações esses valores calculados foram superiores ao tabelado, o que significa que as inclinações e o intercepto das retas obtidas para as diferentes matrizes são estatisticamente diferentes. Com exceção do composto androstano em água bruta que mostrou ter inclinação igual a da reta sem matriz, como pode ser observado na FIG. 17.

## 9.2 LINEARIDADE

Para avaliação do parâmetro linearidade, levou-se em consideração o coeficiente de determinação obtido pela regressão linear de cada composto em cada um dos ensaios, além da análise de resíduos através do teste t (*Student*) e dos gráficos de resíduos e probabilidade normalizada.

Nas FIG. 18 a 20, podem ser observadas as curvas de calibração obtidas para cada composto estudado nos 3 ensaios, assim como os respectivos coeficientes de determinação.

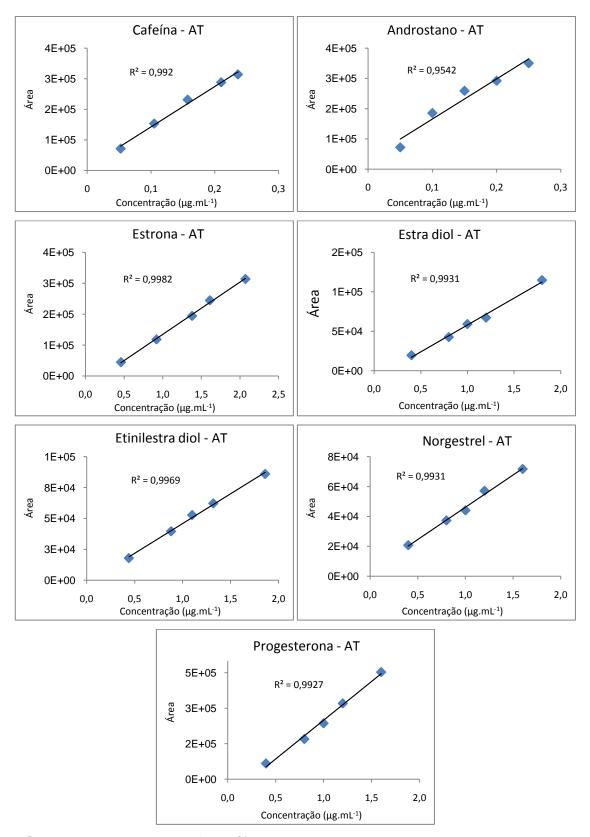


FIGURA 18 - Representação gráfica da Faixa de trabalho e linearidade para os 7 compostos de estudo em matriz de água tratada

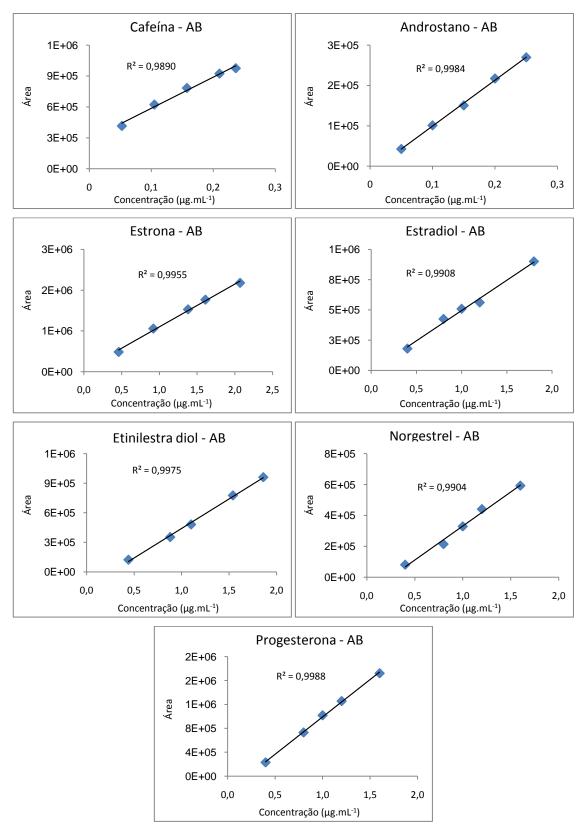


FIGURA 19 - Representação gráfica da Faixa de trabalho e linearidade para os 7 compostos de estudo em matriz de água bruta

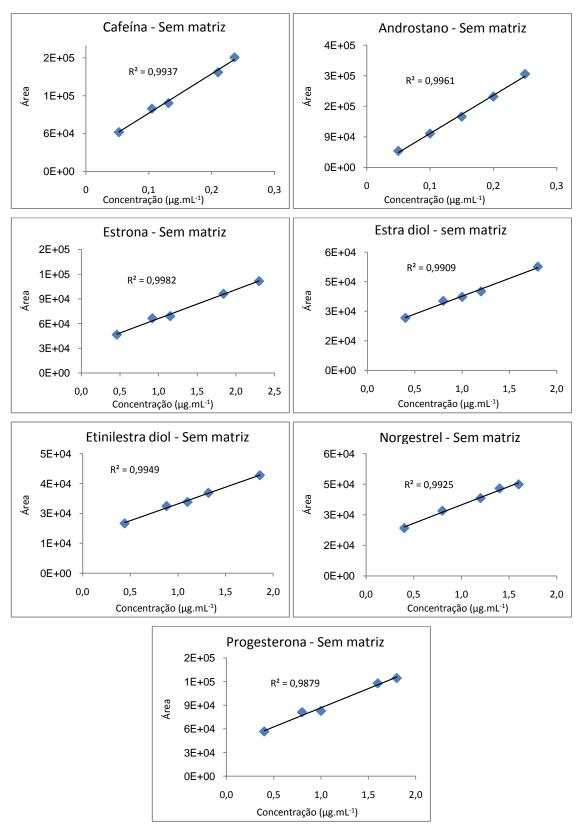


FIGURA 20 - Representação gráfica da Faixa de trabalho e linearidade para os 7 compostos de estudo no ensaio sem matriz

As representações gráficas das FIG. 18 a 20 apresentam a correlação do sinal medido (área dos compostos obtida nos cromatogramas) pela concentração do analito. Essa correlação é expressa pelo coeficiente de determinação de cada curva analítica que se apresentou maior que 0,90, ou seja, a curva analítica pode ser utilizada na quantificação de amostras.

Nas TAB. 12 a 14 estão apresentados os valores de t<sub>calculado</sub> obtidos nos cálculos estatísticos da análise de resíduos para os 7 compostos nas 8 concentrações em matriz de água tratada, matriz de água bruta e no ensaio sem matriz.

TABELA 12 - Valores obtidos no Teste t-*Student* para a verificação do desvio da linearidade de cada ponto da curva de cada composto em matriz de água tratada. O valor 2,365 é o valor crítico para 8 (n-1) graus de liberdade com 95% de confiança

Cafeína	μg.mL <sup>-1</sup>	0,053	0,105	0,131	0,158	0,174	0,210	0,236	0,263
Calema	t <sub>calc</sub>	3,628	0,803	3,003	1,363	4,670	0,363	1,688	2,554
Androstano	μg.mL <sup>-1</sup>	0,050	0,100	0,125	0,150	0,175	0,200	0,225	0,250
Androstano	t <sub>calc</sub>	2,672	2,062	2,038	2,636	4,336	0,943	3,164	1,949
Ectrona	μg.mL <sup>-1</sup>	0,460	0,920	1,150	1,380	1,610	1,840	2,070	2,300
Estrona	t <sub>calc</sub>	1,907	0,270	0,385	1,109	0,327	3,499	2,528	5,672
Estradiol	μg.mL <sup>-1</sup>	0,400	0,800	1,000	1,200	1,400	1,600	1,800	2,000
Estractor	t <sub>calc</sub>	2,159	1,154	0,199	3,514	3,644	3,804	0,611	3,082
Etinilestradiol	μg.mL <sup>-1</sup>	0,440	0,880	1,100	1,320	1,540	1,860	2,080	2,200
EllilleStradio	t <sub>calc</sub>	1,026	0,108	0,078	0,638	0,363	2,284	3,813	5,885
Norgostrol	μg.mL <sup>-1</sup>	0,400	0,800	1,000	1,200	1,400	1,600	1,800	2,000
Norgestrel	t <sub>calc</sub>	1,109	0,114	1,858	1,148	1,476	1,514	4,892	4,645
Drogostorono	μg.mL <sup>-1</sup>	0,400	0,800	1,000	1,200	1,400	1,600	1,800	2,000
Progesterona	t <sub>calc</sub>	1,551	2,171	2,044	0,431	4,210	0,581	4,684	2,125

TABELA 13 - Valores obtidos no Teste t-*Student* para a verificação do desvio da linearidade de cada ponto da curva de cada composto em matriz de água bruta. O valor 2,365 é o valor crítico para 8 (n-1) graus de liberdade com 95% de confiança

Cafeína	μg.mL <sup>-1</sup>	0,053	0,105	0,131	0,158	0,174	0,210	0,236	0,263
	t <sub>calc</sub>	1,206	2,221	1,724	3,105	4,403	2,836	1,734	2,563
Androstano	μg.mL <sup>-1</sup>	0,050	0,100	0,125	0,150	0,175	0,200	0,225	0,250
Androstano	t <sub>calc</sub>	1,264	1,829	2,536	0,871	5,453	2,767	1,055	2,315
Estrona	μg.mL <sup>-1</sup>	0,460	0,920	1,150	1,380	1,610	1,840	2,070	2,300
LStrona	t <sub>calc</sub>	1,374	1,504	3,519	1,543	1,623	4,225	0,072	4,074
Estradiol	μg.mL <sup>-1</sup>	0,400	0,800	1,000	1,200	1,400	1,600	1,800	2,000
Lottadioi	t <sub>calc</sub>	0,741	2,067	1,291	1,245	5,597	3,744	1,358	0,876
Etinilestradiol	μg.mL <sup>-1</sup>	0,440	0,880	1,100	1,320	1,540	1,860	2,080	2,200
Lumicondulor	t <sub>calc</sub>	0,984	1,917	2,531	6,016	1,405	2,396	0,265	0,985
Norgestrel	μg.mL <sup>-1</sup>	0,400	0,800	1,000	1,200	1,400	1,600	1,800	2,000
	t <sub>calc</sub>	2,913	1,222	0,567	0,077	3,680	3,161	4,536	1,259
Progesterona	μg.mL <sup>-1</sup>	0,400	0,800	1,000	1,200	1,400	1,600	1,800	2,000
- Togesterona	t <sub>calc</sub>	0,410	0,080	1,510	0,674	4,967	1,573	5,000	0,973

Nos resultados para o teste t (*Student*) apresentados nas TAB. 12 a 14, pode-se observar que alguns valores de t<sub>calculado</sub> se apresentaram acima do valor de t<sub>tabelado</sub>, significando que esses valores não pertencem a reta de regressão da curva analítica. Entretanto, pela experiência na técnica e pelo valor de coeficiente de determinação obtido, que foi satisfatório, pode-se considerar esses pontos na quantificação das amostras estudadas.

TABELA 14 - Valores obtidos no Teste t-*Student* para a verificação do desvio da linearidade de cada ponto da curva de cada composto no ensaio sem matriz. O valor 2,365 é o valor crítico para 8 (n-1) graus de liberdade com 95% de confiança

Cafeína	μg.mL <sup>-1</sup>	0,053	0,105	0,131	0,158	0,174	0,210	0,236	0,263
	t <sub>calc</sub>	0,124	1,126	1,148	3,737	4,751	1,679	0,237	0,124
Androstano	μg.mL <sup>-1</sup>	0,050	0,100	0,125	0,150	0,175	0,200	0,225	0,250
Androstano	t <sub>calc</sub>	1,613	0,766	0,347	0,388	5,76	1,172	2,749	1,613
Estrona	μg.mL <sup>-1</sup>	0,460	0,920	1,150	1,380	1,610	1,840	2,070	2,300
LStrona	t <sub>calc</sub>	0,37	2,898	0,13	3,075	4,168	2,484	1,169	0,37
Estradiol	μg.mL <sup>-1</sup>	0,400	0,800	1,000	1,200	1,400	1,600	1,800	2,000
Lottadioi	t <sub>calc</sub>	1,225	1,971	0,423	0,474	5,78	2,422	0,338	1,225
Etinilestradiol	μg.mL <sup>-1</sup>	0,440	0,880	1,100	1,320	1,540	1,860	2,080	2,200
Lumicondulor	t <sub>calc</sub>	2,288	2,221	1,418	1,129	4,199	4,135	1,893	2,288
Norgestrel	μg.mL <sup>-1</sup>	0,400	0,800	1,000	1,200	1,400	1,600	1,800	2,000
	t <sub>calc</sub>	0,436	0,574	3,534	2,498	1,694	4,761	0,003	0,436
Progesterona	μg.mL <sup>-1</sup>	0,400	0,800	1,000	1,200	1,400	1,600	1,800	2,000
- Togesterona	t <sub>calc</sub>	1,156	3,138	0,759	3,81	3,875	1,384	0,178	1,156

A análise dos resíduos foi avaliada através dos gráficos apresentados nas FIG. 21 a 26, que expõe a distribuição espacial dos resíduos absolutos pela concentração e pela probabilidade normalizada

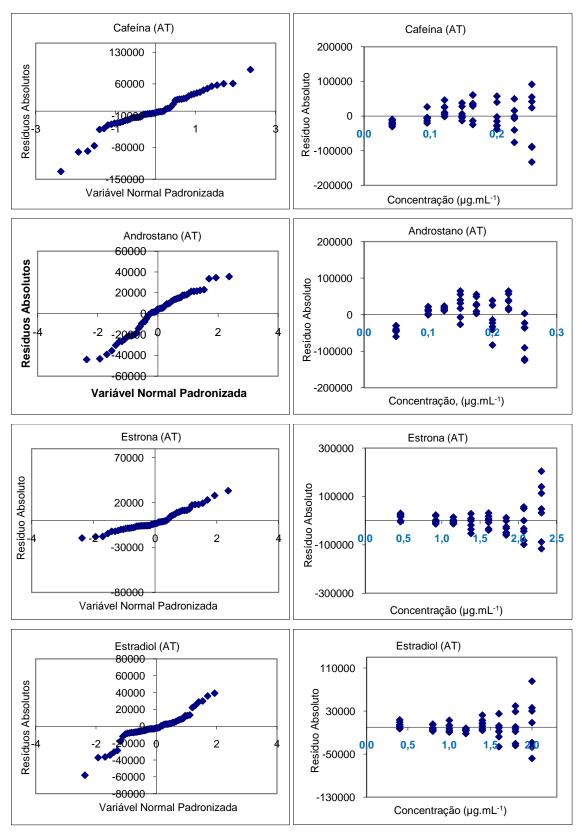


FIGURA 21 - Gráficos de resíduo absoluto e normalizado para os compostos cafeína, androstano, estrona e estradiol em matriz de água tratada

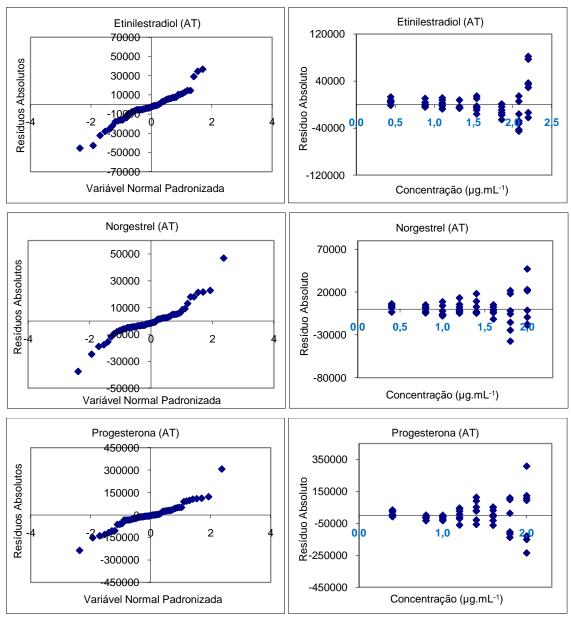


FIGURA 23 - Gráficos de resíduo absoluto e normalizado para os compostos etinilestradiol, norgestrel e progesterona em matriz de água tratada

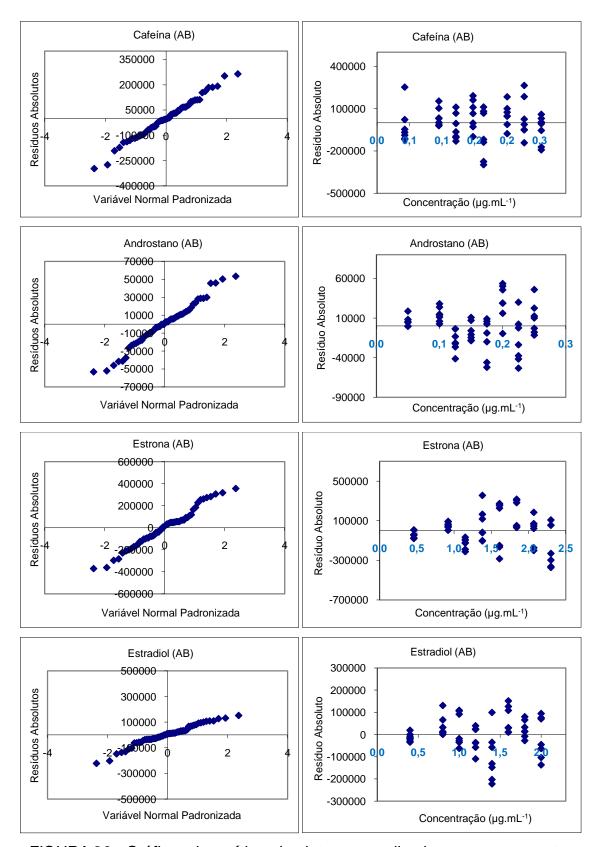


FIGURA 23 - Gráficos de resíduo absoluto e normalizado para os compostos cafeína, androstano, estrona e estradiol estudados em matriz de água bruta

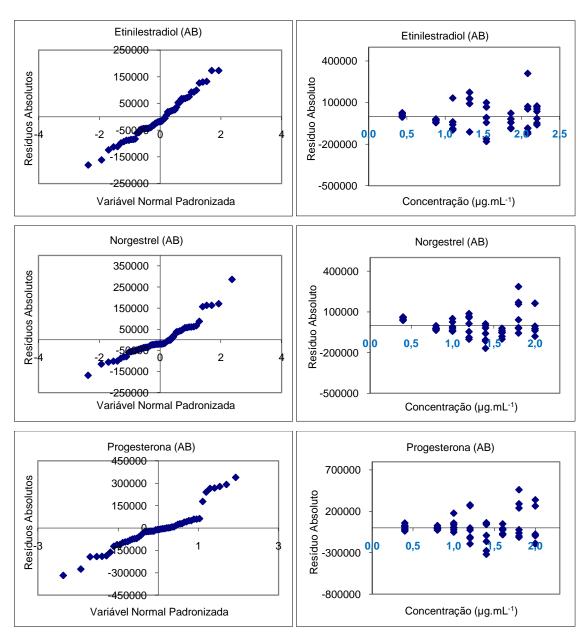


FIGURA 24 – Gráficos de resíduo absoluto e normalizado para os compostos etinilestradiol, norgestrel e progesterona em matriz de água bruta

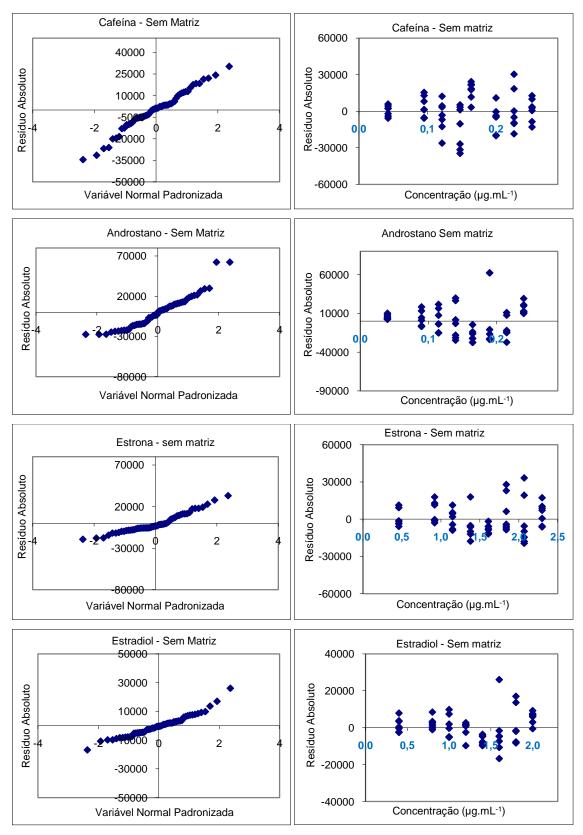


FIGURA 25 - Gráficos de resíduo absoluto e normalizado para os compostos cafeína, androstano, estrona e estradiol no ensaio sem matriz

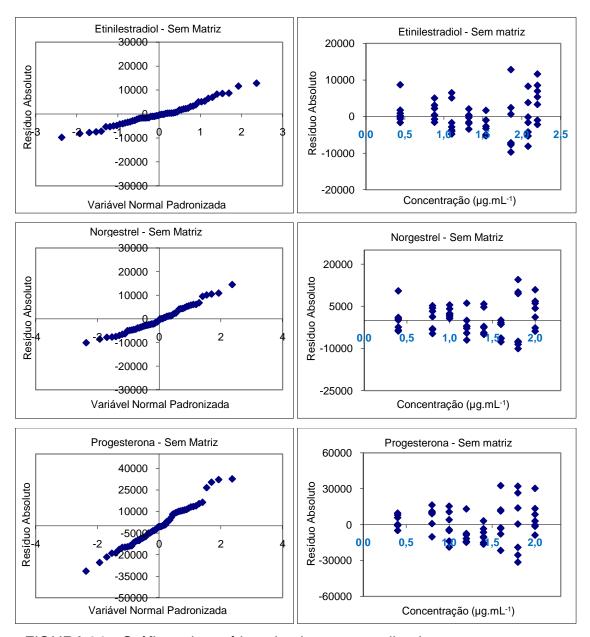


FIGURA 26 - Gráficos de resíduo absoluto e normalizado para os compostos etinilestradiol, norgestrel e progesterona no ensaio sem matriz

Observando esses gráficos, FIG. 21 a 26, verifica-se que existem flutuações entre as replicatas de cada concentração, principalmente as concentrações mais altas. Porém, ao analisar-se o gráfico de resíduos versus a probabilidade normal, observamos que a distribuição geral dos pontos se assemelha a uma reta sem grandes tendências que depreciem o comportamento linear. Além disso, os pontos estão dentro da faixa -2 a +2, o que significa que estão dentro de ± 2s (dois desvios padrão, ou seja, com 95% de confiança).

A avaliação da linearidade e exatidão, também foi realizada através da análise de variância (tabela ANOVA) que gerou os resultados apresentados na TAB. 15 e 16. O teste F de regressão avalia se o modelo de regressão adotado é significativo, ou seja, se o modelo linear se ajusta ao conjunto de dados obtidos, considerando 95% de confiança. Enquanto que o teste F de ajuste verifica o quanto esse modelo se ajusta ao conjunto de dados obtidos, também com 95% de confiança. Por último, foi realizada a avaliação da porcentagem de variação explicada da porcentagem máxima de variação explicável, ou seja, o quanto de variação pôde ser explicada dentro da porcentagem explicável pelo ajuste aplicado ao método.

TABELA 15 - Resumo dos resultados da análise de variância (ANOVA) para os compostos estudados na matriz de água tratada

	F <sub>calc</sub>	ulado	% de	% máxima de
Composto	Regressão	Ajuste	variação	variação
	F <sub>2,13,95% tab. = 3,81</sub>	$F_{5,8,95\% \text{ tab} = 3,69}$	explicada	explicável
Cafeína	181,8	11,2	97	100
Androstano	66,1	42,6	91	100
Estrona	136,7	22,2	95	100
Estradiol	415,4	22,2	98	100
Etinilestradiol	36,2	92,7	85	100
Norgestrel	223,7	7,1	97	99
Progesterona	325,2	7,0	98	100

Pela avaliação da ANOVA empregada no ensaio com matriz de água tratada, pode ser observado que os valores calculados no teste de Regressão foram superiores ao F<sub>tabelado</sub>, para todos os compostos em todas as concentrações, esse resultado demonstra que o modelo de regressão adotado é significativo, ou seja, a equação é adequada para os pares de pontos e que as variações foram explicadas satisfatoriamente pelos modelos lineares adotados, representados pelas equações das retas de cada composto. O resultado do teste de ajuste revela que houve falta de ajuste (F<sub>calculado</sub> > F<sub>tabelado</sub>), o que indica uma dispersão dos pontos ou que apesar de a equação ser adequada, existem pontos

fora. Porém, as porcentagens máximas explicadas estão próximas das porcentagens máximas explicáveis para todos os compostos e a avaliação da porcentagem de variação explicada da porcentagem máxima de variação explicável apresentou todos os valores acima de 90%, ou seja, as variações foram explicadas satisfatoriamente pelos modelos lineares adotados e que o mesmo se ajusta aos dados. Além disso, nos estudos ANOVA, foi avaliado o erro puro para todos os compostos, que está associado aos erros aleatórios, e estes representam uma fração muito pequena em relação à soma quadrática total, ou seja, as características dos dados avaliados permitem que se possa explicar uma porcentagem muito grande (próximo de 100%) do comportamento inerente aos dados.

TABELA 16 - Resumo dos resultados da análise de variância (ANOVA) para os compostos estudados na matriz de água bruta

	F <sub>calcu</sub>	lado	% de % máxima d	
Composto	Regressão	Ajuste	variação	variação
	$F_{2,13,95\%}$ tab. = 3,81	$F_{5,8,95\% \text{ tab}} = 3,69$	explicada	explicável
Cafeína	75,2	6,4	92	98
Androstano	116,1	82,0	95	100
Estrona	225,4	24,2	97	100
Estradiol	116,5	4,6	95	99
Etinilestradiol	376,0	8,7	98	100
Norgestrel	184,1	15,7	97	100
Progesterona	624,0	2,6	99	100

No ensaio com matriz de água bruta, observamos resultados semelhantes para o teste de regressão. Já no teste de ajuste, pode ser observado que alguns compostos apresentaram valores de F calculado próximos ao valor tabelado e somente a progesterona apresentou valor abaixo ao tabelado, significando que nessa matriz a falta de ajuste foi menor em comparação a matriz de água tratada. Na avaliação das porcentagens de variação, para todos os compostos as variações foram explicadas satisfatoriamente, assim como no ensaio com matriz de água tratada. Na FIG. 27, observam-se os gráficos de faixa de trabalho para os compostos estudados. Dentro desta faixa, os resultados são

estatisticamente aceitáveis, porém, quanto maior a concentração, menor é a confiança nos resultados. Pelos resultados de validação, observa-se que tanto para as concentrações mais baixas quanto para as mais altas, perde-se na confiança dos resultados.

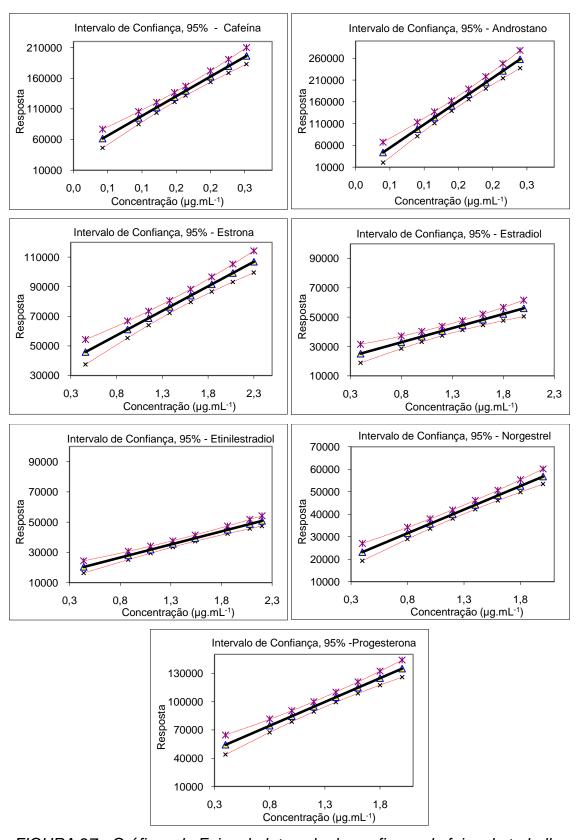


FIGURA 27 - Gráficos de Faixa de Intervalo de confiança da faixa de trabalho para os 7 compostos estudados no ensaio sem matriz

# 9.3 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Para cada composto foi obtido um limite de detecção e um limite de quantificação diferente, pois cada composto apresenta uma sensibilidade distinta no equipamento. Os LQ e LD obtidos para as diferentes matrizes estão apresentados nas TAB. 17 a 19.

TABELA 17 - Limites de quantificação e detecção do método de cada composto em matriz de água tratada

Composto	Limite do método			
Composto	LQ (µg.L )	LD (µg.L )		
Cafeína	0,074	0,013		
Androstano	0,068	0,019		
Estrona	0,864	0,193		
Estradiol	0,876	0,216		
Etinilestradiol	0,865	0,219		
Norgestrel	0,845	0,212		
Progesterona	0,696	0,124		

TABELA 18 - Limites de quantificação e detecção do método de cada composto em matriz de água bruta

Comments	Limite do método			
Composto	LQ (µg.L )	LD (µg.L )		
Cafeína	0,258	0,105		
Androstano	0,082	0,015		
Estrona	0,561	0,072		
Estradiol	0,552	0,089		
Etinilestradiol	0,567	0,047		
Norgestrel	0,556	0,061		
Progesterona	0,525	0,065		

TABELA 19 - Limites de quantificação e detecção do método de cada composto no ensaio sem matriz

Composto	Limite do método			
Composto	LQ (µg.L <sup>-1</sup> )	LD (µg.L 1)		
Cafeína	0,087	0,017		
Androstano	0,066	0,006		
Estrona	1,400	0,471		
Estradiol	1,436	0,511		
Etinilestradiol	1,596	0,576		
Norgestrel	1,723	0,662		
Progesterona	0,934	0,271		

## 9.4 EXATIDÃO

Na TAB. 20 são apresentados os valores de z *Score* calculados para os compostos estudados, valores de z que seguem o seguinte critério:

|**z**| ≤ 2, o resultado está satisfatório;

2 < |z| < 3, o resultado é questionável;

 $|z| \ge 3$ , o resultado é insatisfatório.

TABELA 20 - Resumo dos resultados do teste z *Score* para os compostos estudados nas matrizes de água bruta (AB), tratada (AT) e no ensaio sem matriz

Composto		z Score	
Composio	AB	Sem matriz	AT
Cafeína	0,10	0,20	0,10
Androstano	0,02	0,21	1,06
Estrona	0,12	0,12	0,12
Estradiol	0,04	0,81	0,04
Etinilestradiol	0,09	1,60	0,09
Norgestrel	0,11	1,24	0,11
Progesterona	0,18	0,33	0,18

Conforme apresentado no item 7.4, utilizando-se a equação 12, observa-se que todos os valores estão dentro do limite satisfatório de exatidão para todos os compostos nas diferentes matrizes.

#### 9.5 Precisão

A avaliação dos resultados da repetitividade foi feita a partir do cálculo do limite de repetitividade, *r*, de acordo com a equação 14. Na TAB. 21 são apresentados os valores de r para as três concentrações, baixa, média e alta, para a metodologia proposta.

TABELA 21 - Resumo dos resultados do teste de repetitividade para os compostos estudados na matriz de água tratada

Composto	Valores de r				
Composio	Baixa	Média	Alta		
Cafeína	0,0103	0,0246	0,0561		
Androstano	0,0087	0,0192	0,0108		
Estrona	0,1568	0,0964	0,7043		
Estradiol	0,1657	0,1963	0,7527		
Etinilestradiol	0,0934	0,1649	0,5882		
Norgestrel	0,1755	0,2654	0,9253		
Progesterona	0,1027	0,0675	0,6336		

TABELA 22 - Resumo dos resultados do teste de repetitividade para os compostos estudados na matriz de água bruta

Composto		Valores de r	
Composio	Baixa	Média	Alta
Cafeína	0,0690	0,0573	0,0825
Androstano	0,0118	0,0257	0,0156
Estrona	0,0511	0,1030	0,2554
Estradiol	0,0670	0,3076	0,1487
Etinilestradiol	0,0363	0,2147	0,4865
Norgestrel	0,0465	0,1424	0,5602
Progesterona	0,0495	0,1068	0,3638

Avaliando os resultados obtidos, de acordo com a TAB. 21 e 22, nenhum dos compostos teve diferença entre os valores das replicatas maior do que o valor de r obtido, portanto considera-se boa a precisão da metodologia.

#### 9.6 ROBUSTEZ

Como descrito no item 8.4.6, foram realizados 8 experimentos aonde 14 variáveis foram combinadas de forma que o resultado gerado mostra a influência que cada fator tem sobre o método desenvolvido. Os gráficos dos efeitos dessas variações estão apresentados na FIG. 28 e 29.

Nos gráficos apresentados na FIG. 28, pode-se observar que para os compostos cafeína, androstano, estrona, estradiol e etinilestradiol o fator de maior influência positiva é a voltagem do detector e a temperatura do injetor e o fator de maior influência negativa é o fluxo da coluna. Exceto para os compostos progesterona e norgestrel, que apresentaram resultados positivos para todas as variações, como pode ser observado na FIG. 29.

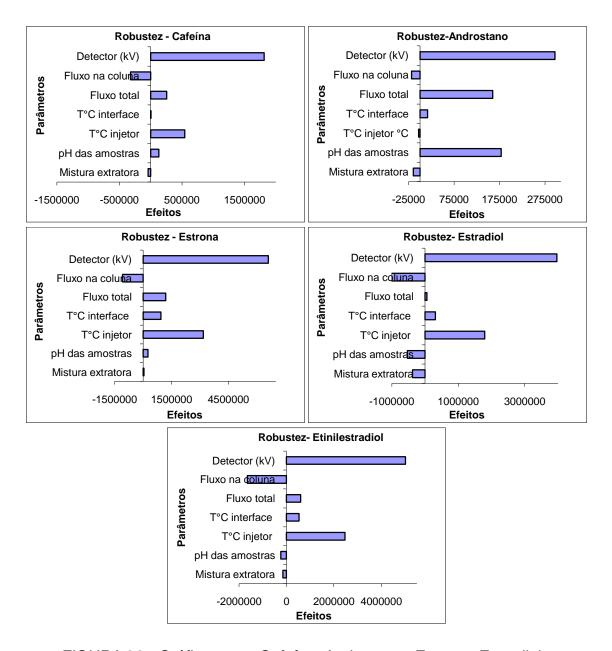


FIGURA 28 - Gráficos para Cafeína, Androstano, Estrona, Estradiol e Etinilestradiol representando o teste de verificação de significância dos efeitos

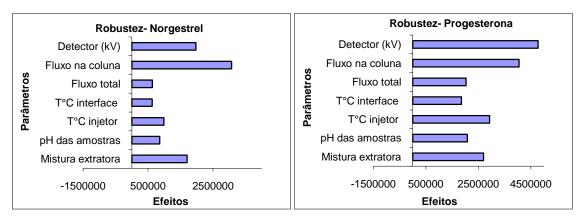


FIGURA 29 - Gráficos para Norgestrel e Progesterona representando o teste de verificação de significância dos efeitos

Entretanto uma alteração da metodologia baseada somente nesses 2 compostos não se faz necessária, uma vez que esses dois compostos mostram boa reprodutibilidade no método proposto.

Pela avaliação dos gráficos de rankit confrontadas com os gráficos de probabilidade normal (FIG. 30 e 31), observa-se que os efeitos das variações aplicadas não afetam de forma significativa os resultados, pois os valores obtidos encontram-se abaixo do limite mais critico ME (Margin of Error). Considera-se que para resultados até o valor de ME (Margin of Error) não há efeito significativo. Até o valor de SME (Simultaneous Margin of Error) que é mais abrangente, corre-se o risco de ocorrer um falso negativo. Portanto, de acordo com a literatura (Furusawa, 2007; Zeaiter et al., 2004; Vander Heyden et al., 2001), considera-se o valor de ME como referência. E os valores muito próximos dessa margem de erro significam os parâmetros aos quais deve ser dada uma maior atenção durante o procedimento. Também pela avaliação do gráfico de probabilidade normal podese observar que os valores obtidos estão bem distribuídos entre -2 e +2, o que significa que provavelmente não haja outliers.

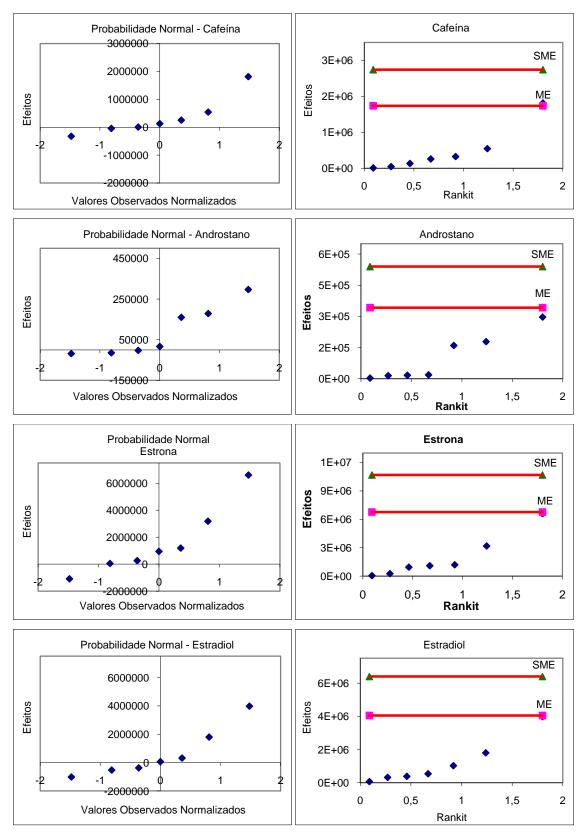


FIGURA 30 - Gráficos de probabilidade normal e rankit para todos os compostos cafeína, androstano, estrona e estradiol

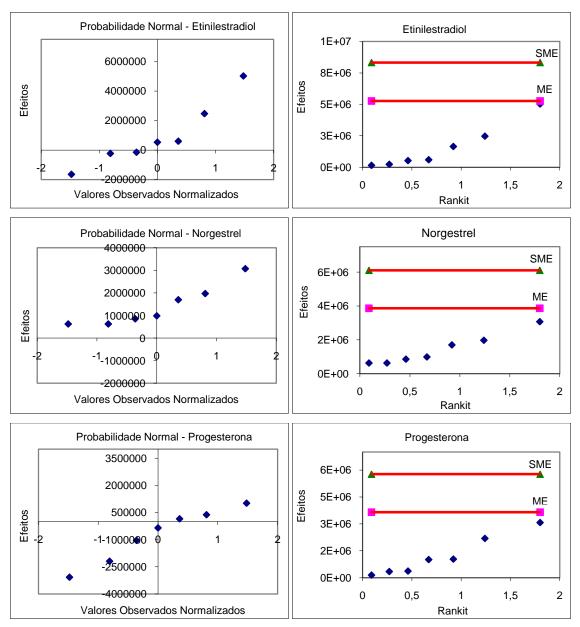


FIGURA 31 – Gráficos de probabilidade normal e rankit para todos os compostos etinilestradiol, norgestrel e progesterona

### 9.7 RECUPERAÇÃO

Valores de recuperação entre 70 e 120% são aceitos para procedimentos analíticos de validação (INMETRO, 2003). Nas TAB. 23 a 25 estão apresentados os resultados para os 7 compostos estudados, onde pode-se observar que nas diferentes matrizes alguns compostos apresentaram valores de recuperação acima de 100%, o que é considerado normal devido à maior influência da matriz sobre esses compostos. Porém, o composto que sofre maior influência é o androstano.

TABELA 23 - Resultado dos testes de recuperação com concentração média em água tratada

Composto	Concentração adicionada μg.L	Concentração recuperada μg.L	Recuperação %
Cafeína	1,31	1,41	108
Androstano	1,25	0,52	41
Estrona	11,50	12,30	107
Estradiol	10,00	9,66	97
Etinilestradiol	11,00	11,05	100
Norgestrel	10,00	11,13	111
Progesterona	10,00	10,80	108

TABELA 24 - Resultado dos testes de recuperação com concentração média em água bruta

Composto	Concentração adicionada -1 μg.L	Concentração recuperada μg.L <sup>-1</sup>	Recuperação %
Cafeína	1,31	1,29	98
Androstano	1,25	0,49	39
Estrona	11,50	13,11	114
Estradiol	10,00	11,05	111
Etinilestradiol	11,00	11,35	103
Norgestrel	10,00	11,22	112
Progesterona	10,00	10,42	104

TABELA 25 - Resultado dos testes de recuperação com concentração alta em água tratada

Composto	Concentração adicionada -1 μg.L	Concentração recuperada -1 μg.L	Recuperação %
Cafeína	2,62	2,72	103,65
Androstano	2,50	2,47	99,01
Estrona	23,00	33,00	133,51
Estradiol	20,00	28,43	132,19
Etinilestradiol	22,00	27,75	126,18
Norgestrel	20,00	25,39	107,00
Progesterona	20,00	21,55	107,76

#### 9.8 CÁLCULO DE INCERTEZAS

Nas TAB. 26 e 27 são apresentados os resultados dos cálculos de incerteza expandida para os compostos estudados em matrizes de água tratada e bruta, considerando-se um ponto intermediário na curva. Não foi apresentado o cálculo para androstano, visto que este apresentou baixo valor de recuperação.

TABELA 26 - Resultados dos cálculos de incerteza compostos estudados em matrizes de água tratada, considerando-se intervalos de concentração equivalentes em pontos médios das curvas

Composto	concentração (µg.L <sup>-1</sup> )	Incerteza expandida		%
Cafeína	0,1066	±	0,0127	11,88
Estrona	0,8516	±	0,1076	12,63
Estradiol	0,8720	±	0,1772	20,32
Etinilestradiol	0,7392	±	0,1346	18,20
Norgestrel	0,8283	±	0,0440	5,32
Progesterona	0,6735	±	0,0420	6,24

TABELA 27 - Resultados dos cálculos de incerteza compostos estudados em matrizes de água bruta, considerando-se intervalos de concentração equivalentes em pontos médios das curvas

Composto	AB				
Composio	concentração (µg.L <sup>-1</sup> )	Incerteza expandida	%		
Cafeína	0,1460	± 0,0087	5,98		
Estrona	0,8207	± 0,0460	5,61		
Estradiol	0,7328	± 0,0372	5,08		
Etinilestradiol	0,6668	± 0,1227	18,40		
Norgestrel	0,4405	± 0,0191	4,33		
Progesterona	0,7470	± 0,0397	5,31		

Nas TAB. 28 e 29, são apresentados os resultados das contribuições individuais parciais de cada incerteza envolvida nos cálculos para cada composto estudado nas matrizes de água tratada e bruta, respectivamente.

TABELA 28 - Resultados das contribuições de incertezas de cada grandeza de entrada no calculo do mensurando dos compostos estudados em matriz de água tratada, considerando-se intervalos de concentração equivalentes em pontos médios das curvas

	Valor real	Contribuições individuais de cada incerteza en			
Composto	calculado em	1	matriz de água tratada (AT)		
	mg.L	Ucurva	U(Vf)	U(Rec)	UCombinada
Cafeína	0,0001066	0,037	0,006	0,047	0,000006
Estrona	0,0008516	0,046	0,006	0,044	0,000055
Estradiol	0,0008720	0,030	0,006	0,099	0,000090
Etinilestradiol	0,0007392	0,031	0,003	0,087	0,000069
Norgestrel	0,0008283	0,026	0,006	0,007	0,000022
Progesterona	0,0006735	0,031	0,006	0,006	0,000021

TABELA 29 - Resultados das contribuições de incertezas de cada grandeza de entrada no calculo do mensurando dos compostos estudados em matriz de água bruta, considerando-se intervalos de concentração equivalentes em pontos médios das curvas

	Valor real	Contribuições individuais de cada incerteza en			
Composto	calculado em	matriz de água bruta (AB)			
	mg.L	Ucurva	U(Vf)	U(Rec)	UCombinada
Cafeína	0,0001460	0,030	0,006	0,004	0,000004
Estrona	0,0008207	0,028	0,006	0,003	0,000023
Estradiol	0,0007328	0,020	0,006	0,015	0,000019
Etinilestradiol	0,0006668	0,032	0,006	0,088	0,000063
Norgestrel	0,0004405	0,021	0,006	0,004	0,000010
Progesterona	0,0007470	0,020	0,006	0,017	0,000020

De acordo com os resultados obtidos para os cálculos de incertezas dos compostos estudados, apresentados na TAB. 28 e 29, pode ser observado que a maior contribuição para a incerteza global está associada à recuperação do analito e à curva analítica. Isso é coerente, visto que ambas estão relacionadas à concentração e à resposta obtida pelo equipamento. Estes resultados podem ser melhor observados nas representações gráficas das FIG. 32 e 33, que apresentam a influência das principais incertezas envolvidas na metodologia.

No ANEXO 1, encontram-se os valores de todas as incertezas envolvidas nos cálculos de incertezas para cada um dos compostos estudados.

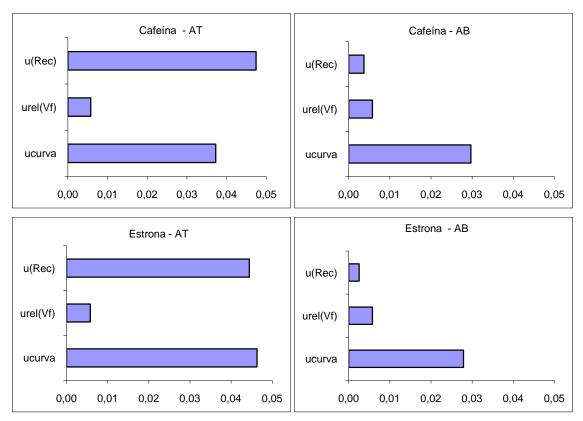


FIGURA 32 - Representação gráfica das incertezas envolvidas na metodologia desenvolvida para determinação dos compostos cafeín e estrona

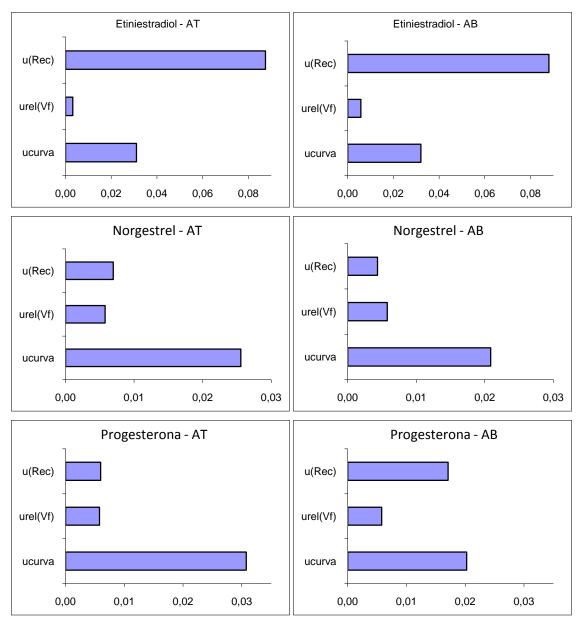


FIGURA 33 - Representação gráfica das incertezas envolvidas na metodologia desenvolvida para determinação dos compostos estradiol, etinilestradiol, norgestrel e progesterona

## 9.9 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS DO RIO PARAÍBA DO SUL

Com a metodologia validada, foi possível quantificar com segurança as amostras de água bruta e água tratada dos municípios propostos. Durante a realização deste trabalho, foram amostrados quatro períodos: março e setembro de 2009, e fevereiro e junho de 2010 obtendo dessa forma épocas secas e chuvosas. Os resultados estão apresentados a seguir nas TAB.30 a 33, onde alguns dos compostos puderam ser detectados, entretanto permaneceram abaixo

de seus respectivos limites de quantificação (LQ). Para as amostras de água tratada os LQ obtidos foram 0,074 μg.L<sup>-1</sup> (cafeína), 0,068 μg.L<sup>-1</sup> (androstano), 0,864 μg.L<sup>-1</sup> (estrona), 0,876 μg.L<sup>-1</sup> (estradiol), 0,865 μg.L<sup>-1</sup> (etiniletradiol), 0,845 μg.L<sup>-1</sup> (norgestrel) e 0,696 μg.L<sup>-1</sup> (progesterona) conforme apresentado na TAB. 17 do item 9.3. Para as amostras de água bruta os LQ obtidos foram 0,258 μg.L<sup>-1</sup> (cafeína), 0,082 μg.L<sup>-1</sup> (androstano), 0,561 μg.L<sup>-1</sup> (estrona), 0,552 μg.L<sup>-1</sup> (estradiol), 0,567 μg.L<sup>-1</sup> (etiniletradiol), 0,556 μg.L<sup>-1</sup> (norgestrel) e 0,525 μg.L<sup>-1</sup> (progesterona) conforme apresentado na TAB. 18 do mesmo item.

TABELA 30 - Resultados da análise da 1ª coleta para os 7 compostos nas amostras (1L) de água bruta e tratada da região do rio Paraíba do Sul: Pindamonhangaba; Taubaté; São José dos Campos e Guararema

1ª Coleta - média de 3 resultados - concentração em μg.L <sup>-1</sup>					
	Água Tratada				
Composto	Pindamonhangaba	Taubaté	São José dos Campos	Guararema	
Cafeína	0,351	<0,074	<0,074	0,084	
Androstano	nd	nd	nd	nd	
Estrona	<0,864	<0,864	<0,864	<0,864	
Estradiol	<0,876	<0,876	<0,876	<0,876	
Etinilestradiol	nd	nd	nd	nd	
Norgestrel	nd	nd	nd	nd	
Progesterona	nd	nd	nd	nd	
	Á	gua Bruta			
Composto	Pindamonhangaba	Taubaté	São José dos Campos	Guararema	
Cafeína	0,632	0,425	0,333	nd	
Androstano	nd	nd	nd	nd	
Estrona	nd	nd	nd	nd	
Estradiol	<0,552	<0,552	<0,552	<0,552	
Etinilestradiol	nd	nd	nd	nd	
Norgestrel	nd	nd	nd	nd	
Progesterona	nd	nd	nd	nd	

TABELA 31 - Resultados da análise da 2ª coleta para os 7 compostos nas amostras (1L) de água bruta e tratada da região do rio Paraíba do Sul: Pindamonhangaba; Taubaté; São José dos Campos e Guararema

Pindamonnangaba; Taubate; Sao Jose dos Campos e Guararema						
2ª Coleta - média de 3 resultados - concentração em μg.L <sup>-1</sup>						
	Água tratada					
Composto	Pindamonhangaba	Taubaté	São José dos Campos	Guararema		
Cafeína	<0,074	<0,074	0,108±0,017	<0,074		
Androstano	nd	nd	nd	nd		
Estrona	<0,864	<0,864	<0,864	<0,864		
Estradiol	$0.892 \pm 0.201$	<0,876	<0,876	<0,876		
Etinilestradiol	<0,865	<0,865	<0,865	<0,865		
Norgestrel	nd	nd	nd	nd		
Progesterona	<0,696	nd	nd	nd		
	Á	gua Bruta				
Composto	Pindamonhangaba	Taubaté	São José dos Campos	Guararema		
Cafeína	0,386±0,122	0,227±0,016	0,329±0,074	nd		
Androstano	nd	nd	nd	nd		
Estrona	nd	nd	nd	nd		
Estradiol	<0,552	<0,552	<0,552	<0,552		
Etinilestradiol	nd	nd	nd	nd		
Norgestrel	nd	nd	nd	nd		
Progesterona	nd	nd	nd	nd		

TABELA 32 - Resultados da análise da 3ª coleta para os 7 compostos nas amostras (1L) de água bruta e tratada da região do rio Paraíba do Sul: Pindamonhangaba; Taubaté; São José dos Campos e Guararema

3ª Coleta - média de 3 resultados - concentração em μg.L<sup>-1</sup> Água tratada São José dos Pindamonhangaba Composto Taubaté Guararema Campos Cafeína nd nd nd nd Androstano nd nd nd nd Estrona nd nd nd nd Estradiol nd nd nd nd Etinilestradiol nd nd nd nd Norgestrel nd nd nd nd Progesterona nd nd nd nd Água Bruta São José dos Pindamonhangaba Taubaté Composto Guararema Campos Cafeína <0,258 <0,258 <0,258 nd Androstano nd nd nd nd Estrona nd nd nd nd Estradiol nd nd nd nd Etinilestradiol nd nd nd nd

nd

nd

nd

nd

nd

nd

Norgestrel

Progesterona

nd

nd

TABELA 33 - Resultados da análise da 4ª coleta para os 7 compostos nas amostras (1L) de água bruta e tratada da região do rio Paraíba do Sul: Pindamonhangaba; Taubaté; São José dos Campos e Guararema

4ª Coleta - média de 3 resultados - concentração em μg.L⁻¹						
	Água tratada					
Composto	Pindamonhangaba	Taubaté	São José dos Campos	Guararema		
Cafeína	0,101±0,015	<0,074	<0,074	<0,074		
Androstano	nd	nd	nd	nd		
Estrona	nd	nd	nd	nd		
Estradiol	nd	nd	nd	nd		
Etinilestradiol	nd	nd	nd	nd		
Norgestrel	nd	nd	nd	nd		
Progesterona	nd	nd	nd	nd		
		Água Bruta				
Composto	Pindamonhangaba	Taubaté	São José dos Campos	Guararema		
Cafeína	<0,074	0,599±0,101	0,319±0,018	0,602±0,135		
Androstano	nd	nd	nd	nd		
Estrona	nd	nd	nd	nd		
Estradiol	nd	nd	nd	nd		
Etinilestradiol	nd	nd	nd	nd		
Norgestrel	nd	nd	nd	nd		
Progesterona	nd	nd	nd	nd		

As amostras referentes à 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> coletas foram obtidas em períodos chuvosos, e as determinações dos compostos são prejudicadas, pela grande diluição e o carreamento destes pelas águas. Sempre que houve a possibilidade da ocorrência de um valor falso negativo ou falso positivo nas amostras, foram realizadas adições padrão a fim de confirmar os valores.

Com os resultados obtidos, apresentados nas TAB. 30 a 33, para amostras coletadas na área estudada, pode-se observar que apesar de a água

distribuída pela Sabesp ser de ótima qualidade, já se nota uma pequena contaminação em amostras de água bruta em determinadas épocas do ano, principalmente em períodos secos.

#### 9.9.1 Resultados da avaliação do Teor de Carbono Orgânico

Algumas matrizes interferem mais que outras na determinação dos compostos. Os resultados de carbono orgânico possibilita um maior entendimento da influência de determinadas matrizes. Na TAB. 34, podem ser observados os valores médios das concentrações de carbono orgânico nas amostras de águas tratada e bruta.

TABELA 34 - Resultados médios de Carbono Orgânico Total das análises de amostras de água bruta e tratada das cidades estudadas (em mg.L<sup>-1</sup>)

Cidade	Amostras de água tratada	Amostras de água bruta
Guararema	2,2	3,6
Taubaté	2,1	5,9
São José dos Campos	2,1	4,8
Pindamonhangaba	2,4	5,5

Os valores maiores, praticamente o dobro, de carbono orgânico contidos nas amostras de água bruta podem ser uma referência do porque essa matriz interfere de maneira mais sensível nas determinações de quase todos os compostos estudados, exceto para o androstano que parece ter comportamento semelhante para água bruta e somente no solvente.

Esses valores podem estar associados à presença de ácidos orgânicos naturais, como por exemplo, ácido fúlvicos e húmicos, os quais podem interagir de maneira positiva ou negativa na determinação dos compostos estudados. Porém, este é um tema que demanda mais estudo e será uma proposta de trabalho futuro.

#### 10 Conclusão

- 1. Conforme objetivo proposto, foi desenvolvida metodologia para determinação dos compostos cafeína, androstano, estrona, estradiol, etinilestradiol, norgestrel e progesterona em amostras de água bruta e tratada da região da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul. Para avaliação da qualidade dos dados gerados, seguiram-se as diretrizes do documento do INMETRO DOQ-CGCRE-008 (2003, 2007 e 2010) "Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos", que abrange os parâmetros seletividade, linearidade e faixa de trabalho, limite de detecção e quantificação, exatidão, precisão, robustez e recuperação. Para a incerteza de medição utilizou-se o guia Eurachem (2002).
- 2. O processo de validação demonstrou que, para a maioria dos compostos estudados, a metodologia desenvolvida é seletiva, robusta, exata, linear e precisa para a análise proposta, sendo ainda um método simples que permite a minimização da contaminação e da perda de compostos por excesso de manipulação. A validação da metodologia a partir dos parâmetros estudados permite que se assegure a qualidade dos resultados obtidos e que o desempenho tenha sido avaliado conforme indicado em documento de referência (INMETRO, 2003; 2007; 2010).
- 3. A metodologia se mostrou robusta diante de pequenas variações das condições inicialmente estabelecidas no método, destacando-se maior influência positiva para a voltagem do detector e influência negativa para o fluxo na coluna. para quase todos os compostos. Exceto para o norgestrel e para a progesterona, os quais sofrem uma influência positiva de todos os parâmetros. Porém não justifica uma alteração nos parâmetros apenas para estes dois compostos, visto que os mesmos apresentam bons resultados de validação com os parâmetros originais.
- 4. O método de detecção é sensível e seletivo, visto que os compostos estudados apresentaram boa separação entre eles e ausência de picos coeluidos, fornecendo segurança na determinação destes para a metodologia desenvolvida.

- 5. Durante a validação foi possível observar que a metodologia, além de possuir seletividade e exatidão, possui também precisão, repetibilidade e reprodutibilidade, apesar da dispersão dos resultados entre ensaios repetidos, o que pode ser atribuído à injeção manual.
- 6. A metodologia desenvolvida mostrou ser linear na faixa de trabalho proposta, fornecendo resultados de área diretamente proporcionais à concentração dos analitos dentro de uma variação estatisticamente aceitável.
- 7. O processo de validação demonstrou que a metodologia desenvolvida pode ser aplicada à análise proposta nas condições dos parâmetros avaliados. Aplicando-se a metodologia desenvolvida nas amostras da área estudada, pode-se perceber uma maior incidência de contaminação por cafeína nas duas primeiras coletas podendo ser quantificada em 25% das amostras analisadas de água tratada, onde a concentração máxima foi de 0,351 μg.L<sup>-1</sup> e em 75% das amostras de água bruta com concentração máxima de 0,632 μg.L<sup>-1</sup>. Enquanto que na 3ª e 4ª coleta, a cafeína pode ser quantificada em apenas 12,5% das amostras de água tratada, com concentração máxima de 0,101 μg.L<sup>-1</sup> e 37,5% das amostras de água bruta, sendo a concentração máxima de 0,602 μg.L<sup>-1</sup>. Com esses resultados pode-se observar uma pequena contaminação principalmente em períodos secos e nas amostras de água bruta.

### 11 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho de pesquisa é de suma importância, pois além de realizar o diagnóstico ambiental da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul, no que se refere a alguns disruptores endócrinos, auxiliará o plano de gestão de recursos hídricos da região, contribuindo para o entendimento do nível de contaminação dos recursos hídricos estaduais, além de dar subsídios aos órgãos governamentais para a reavaliação da legislação vigente.

#### 11.1 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros, será realizado um monitoramento por mais quatro anos nessa região, onde serão avaliados os compostos presentes em maior concentração e sua relação com as doenças mais comuns da região. Será feita uma investigação mais aprofundada sobre os interferentes das matrizes.

Propõe-se ainda, uma verificação sobre a viabilidade em realizar estudos ecotoxicológicos nas amostras dessa região.

### 12 ANEXO 1

Resultados das incertezas parciais envolvidas no Cálculo de Incertezas para todos os compostos estudados.

## CÁLCULO DE INCERTEZAS PARA CAFEÍNA EM ÁGUA TRATADA

1 - Incerteza da preparação da solução padrão

Grandezas de entrada: massa do padrão, pureza do padrão e volume final da solução estoque.

Componentes de incertezas  $u(m) = 0.0353701 \text{ mg.mL}^{-1}$   $u(P) = 0.0011547 \text{ mg.mL}^{-1}$   $u(V) = 0.0087335 \text{ mg.mL}^{-1}$  Incerteza combinada  $uc (Cafeína) = 0.00365 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

### 2 - Incerteza da preparação da solução de trabalho

Grandezas de entrada: Solução estoque, volume pipetado da solução estoque individual para preparação da solução mista de trabalho e volume da solução mista de trabalho.

Componentes de incertezas 
$$\begin{split} u(C_{estoque}) &= 0,003645063 \; \mu g.mL^{-1} \\ u(\textit{V}_{i\_estoque}) &= 0,000500918 \; mg.mL^{-1} \\ calibração &= 0,000433013 \\ repe &= 0,00025 \\ \Delta t &= 3,03109E-05 \\ u(V_{final}) &= 0,015323294 \; \mu g.mL^{-1} \\ calibração &= 0,011547005 \\ repe &= 0,01 \end{split}$$

 $\Delta t = 0,001212436$ 

Incerteza combinada

uc ( $C_{\text{sol\_trabalho}}$ ) = 0,006608806  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>

3 - Incerteza da preparação das soluções de calibração para a curva analítica Grandezas de entrada: volumes da solução de trabalho pipetados e volumes dos frascos usados para diluição das soluções.

 $V1_{work_{sol}} = 0,000289377$ 

calibração = 0,000288675

repe = 0,00002

 $\Delta t = 2,42487E-06$ 

 $V2\_work\_sol = 0,000578755$ 

calibração = 0,00057735

repe = 0,00004

 $\Delta t = 4,84974E-06$ 

 $V3_{work}sol = 0,000351643$ 

calibração = 0,00034641

repe = 0,00006

 $\Delta t = 7,27461E-06$ 

 $V4\_work\_sol = 0,000468858$ 

calibração = 0,00046188

repe = 0,00008

 $\Delta t = 9,69948E-06$ 

 $V5_{work_{sol}} = 0,000527465$ 

calibração = 0,000519615

repe = 0,00009

 $\Delta t = 1,09119E-05$ 

 $V1_1mL = 0,005774776$ 

V2\_1mL= 0,005774776

V3\_1mL= 0,005774776

V4\_1mL= 0,005774776

V5\_1mL= 0,005774776

A incerteza para cada um dos frascos de 1mL foi calculada a partir das seguintes contribuições individuais:

calibração = 0,005773503  
repe = 0  
$$\Delta t = 0,000121244$$

Incerteza combinada para cada uma das soluções da curva

uc  $(C1_{\text{sol\_curva}})$  = 0,000826879 µg.mL<sup>-1</sup> uc  $(C2_{\text{sol\_curva}})$  = 0,001653758 µg.mL<sup>-1</sup> uc  $(C3_{\text{sol\_curva}})$  = 0,001352705 µg.mL<sup>-1</sup> uc  $(C4_{\text{sol\_curva}})$  = 0,001803606 µg.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C5_{\text{sol curva}}$ ) = 0,002029057 µg.mL<sup>-1</sup>

#### 4 - Incerteza da Curva analítica

Grandezas de entrada: Area da amostra, Area do branco, 5 soluções ( $C_1$  a  $C_5$ ), áreas referentes às soluções da curva (A1 a A5).

Incerteza combinada

uc (
$$C_{\text{curva\_analitica}}$$
) = 0,0044 µg.mL<sup>-1</sup>

### 5 - Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultados da concentração encontrada.

Incerteza combinada

uc (
$$Rec$$
) = 0,0526  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>  
u( $C_{real}$ ) = 0,00252269  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>  
u( $C_{encontrada}$ ) = 0,047361231  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>

# CÁLCULO DE INCERTEZAS PARA CAFEÍNA EM ÁGUA BRUTA

### 1 - Incerteza da preparação da solução padrão

Grandezas de entrada: massa do padrão, pureza do padrão e volume final da solução estoque.

Componentes de incertezas

$$u(m) = 0.0353701 \text{ mg.mL}^{-1}$$

### 2 - Incerteza da preparação da solução de trabalho

Grandezas de entrada: Solução estoque, volume pipetado da solução estoque individual para preparação da solução mista de trabalho e volume da solução mista de trabalho.

Componentes de incertezas 
$$\begin{split} u(C_{estoque}) &= 0,003645063 \ \mu g.mL^{-1} \\ u(\textit{V}_{i\_estoque}) &= 0,000500918 \ mg.mL^{-1} \\ calibração &= 0,000433013 \\ repe &= 0,00025 \\ \Delta t &= 3,03109E-05 \\ u(V_{final}) &= 0,015323294 \ \mu g.mL^{-1} \\ calibração &= 0,011547005 \\ repe &= 0,01 \\ \Delta t &= 0,001212436 \end{split}$$

Incerteza combinada uc  $(C_{\text{sol\_trabalho}}) = 0,006608806 \ \mu \text{g.mL}^{-1}$ 

3 - Incerteza da preparação das soluções de calibração para a curva analítica Grandezas de entrada: volumes da solução de trabalho pipetados e volumes dos frascos usados para diluição das soluções.

```
V1\_work\_sol = 0,000289377 calibração = 0,000288675 repe = 0,00002 \Delta t = 2,42487E-06 V2\_work\_sol = 0,000578755 calibração = 0,00057735 repe = 0,00004 \Delta t = 4,84974E-06 V3\_work\_sol = 0,000351643
```

calibração = 0,00034641

repe = 0,00006

 $\Delta t = 7,27461E-06$ 

 $V4\_work\_sol = 0,000468858$ 

calibração = 0,00046188

repe = 0.00008

 $\Delta t = 9,69948E-06$ 

 $V5_{work_{sol}} = 0,000527465$ 

calibração = 0,000519615

repe = 0,00009

 $\Delta t = 1,09119E-05$ 

 $V1_1mL = 0.005774776$ 

V2\_1mL= 0,005774776

V3\_1mL= 0,005774776

V4\_1mL= 0,005774776

V5\_1mL= 0,005774776

A incerteza para cada um dos frascos de 1mL foi calculada a partir das seguintes contribuições individuais:

calibração = 0,005773503

repe = 0

 $\Delta t = 0,000121244$ 

Incerteza combinada para cada uma das soluções da curva

uc ( $C1_{\text{sol curva}}$ ) = 0,000826879 µg.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C2_{\text{sol curva}}$ ) = 0,001653758 µg.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C3_{sol\ curva}$ ) = 0,001352705 µg.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C4_{\text{sol curva}}$ ) = 0,001803606 µg.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C5_{\text{sol\_curva}}$ ) = 0,002029057 µg.mL<sup>-1</sup>

### 4 - Incerteza da Curva analítica

Grandezas de entrada: Area da amostra, Area do branco, 5 soluções ( $C_1$  a  $C_5$ ), áreas referentes às soluções da curva (A1 a A5).

Incerteza combinada

uc (
$$C_{\text{curva analitica}}$$
) = 0,0043 µg.mL<sup>-1</sup>

5 – Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultados da concentração encontrada.

Incerteza combinada uc (Rec) = 0,0037 µg.mL<sup>-1</sup>

 $u(C_{real}) = 0.00252269 \ \mu g.mL^{-1}$  $u(C_{encontrada}) = 0.00271219 \ \mu g.mL^{-1}$ 

# CÁLCULO DE INCERTEZAS PARA ESTRONA EM AGUA TRATADA

1 - Incerteza da preparação da solução padrão

Grandezas de entrada: massa do padrão, pureza do padrão e volume final da solução estoque.

Componentes de incertezas

 $u(m) = 0.0353701 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

 $u(P) = 0.0028868 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

 $u(V) = 0.0087335 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

Incerteza combinada

uc (Estrona) =  $0.00365 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

### 2 - Incerteza da preparação da solução de trabalho

Grandezas de entrada: Solução estoque, volume pipetado da solução estoque individual para preparação da solução mista de trabalho e volume da solução mista de trabalho.

Componentes de incertezas

$$\begin{split} u(C_{estoque}) &= 0,003654653~\mu g.mL^{-1}\\ u(\textit{V}_{i\_estoque}) &= 0,004007343~m g.mL^{-1}\\ &= calibração = 0,003464102\\ &= epe = 0,002\\ &= 0,000242487\\ u(V_{final}) &= 0,015323294~\mu g.mL^{-1}\\ &= calibração = 0,011547005 \end{split}$$

repe = 0,01  $\Delta t = 0,001212436$ 

Incerteza combinada

uc ( $C_{\text{sol\_trabalho}}$ ) = 0,057730802 µg.mL<sup>-1</sup>

3 - Incerteza da preparação das soluções de calibração para a curva analítica Grandezas de entrada: volumes da solução de trabalho pipetados e volumes dos frascos usados para diluição das soluções.

 $V1_{work_sol} = 0,000289377$ 

calibração = 0,000288675

repe = 0,00002

 $\Delta t = 2,42487E-06$ 

 $V2_{work_{sol}} = 0,000578755$ 

calibração = 0,00057735

repe = 0,00004

 $\Delta t = 4,84974E-06$ 

 $V3_{work_{sol}} = 0,000351643$ 

calibração = 0,00034641

repe = 0,00006

 $\Delta t = 7,27461E-06$ 

 $V4\_work\_sol = 0,00041025$ 

calibração = 0,000404145

repe = 0,00007

 $\Delta t = 8,48705E-06$ 

 $V5_{work_{sol}} = 0,000527465$ 

calibração = 0,000519615

repe = 0,00009

 $\Delta t = 1,09119E-05$ 

 $V1_1mL = 0,005774776$ 

V2\_1mL= 0,005774776

V3\_1mL= 0,005774776

V4\_1mL= 0,005774776

V5\_1mL= 0,005774776

A incerteza para cada um dos frascos de 1mL foi calculada a partir das seguintes contribuições individuais:

calibração = 0,005773503  
repe = 0  
$$\Delta t = 0,000121244$$

Incerteza combinada para cada uma das soluções da curva

```
uc (C1_{\text{sol\_curva}}) = 0.007223252 \, \mu \text{g.mL}^{-1}

uc (C2_{\text{sol\_curva}}) = 0.014446503 \, \mu \text{g.mL}^{-1}

uc (C3_{\text{sol\_curva}}) = 0.011816626 \, \mu \text{g.mL}^{-1}

uc (C4_{\text{sol\_curva}}) = 0.013786064 \, \mu \text{g.mL}^{-1}

uc (C5_{\text{sol\_curva}}) = 0.017724939 \, \mu \text{g.mL}^{-1}
```

### 4 - Incerteza da Curva analítica

Grandezas de entrada: Area da amostra, Area do branco, 5 soluções (C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>), áreas referentes às soluções da curva (A1 a A5).

Incerteza combinada uc ( $C_{\text{curva\_analitica}}$ ) = 0,0424 µg.mL<sup>-1</sup>

### 5 – Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultados da concentração encontrada.

Incerteza combinada

uc (
$$Rec$$
) = 0,0478  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> 
$$u(C_{real}) = 0,00252265 \ \mu$$
g.mL<sup>-1</sup> 
$$u(C_{encontrada}) = 0,04436029 \ \mu$$
g.mL<sup>-1</sup>

# CÁLCULO DE INCERTEZAS PARA ESTRONA EM AGUA BRUTA

## 1 - Incerteza da preparação da solução padrão

Grandezas de entrada: massa do padrão, pureza do padrão e volume final da solução estoque.

Componentes de incertezas  $u(m) = 0.0353701 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

### 2 - Incerteza da preparação da solução de trabalho

Grandezas de entrada: Solução estoque, volume pipetado da solução estoque individual para preparação da solução mista de trabalho e volume da solução mista de trabalho.

Componentes de incertezas 
$$\begin{split} u(C_{estoque}) &= 0,003645063 \; \mu g.mL^{-1} \\ u(\textit{V}_{i\_estoque}) &= 0,004007343 \; mg.mL^{-1} \\ calibração &= 0,003464102 \\ repe &= 0,002 \\ \Delta t &= 0,000242487 \\ u(V_{final}) &= 0,015323294 \; \mu g.mL^{-1} \\ calibração &= 0,011547005 \\ repe &= 0,01 \\ \Delta t &= 0,001212436 \end{split}$$

Incerteza combinada uc ( $C_{\text{sol\_trabalho}}$ ) = 0,057730802 µg.mL<sup>-1</sup>

3 - Incerteza da preparação das soluções de calibração para a curva analítica Grandezas de entrada: volumes da solução de trabalho pipetados e volumes dos frascos usados para diluição das soluções.

calibração = 0,00034641

repe = 0,00006

 $\Delta t = 7,27461E-06$ 

 $V4\_work\_sol = 0,0004103$ 

calibração = 0,000404145

repe = 0.00007

 $\Delta t = 8,48705E-06$ 

 $V5_{work_sol} = 0,0005275$ 

calibração = 0,000519615

repe = 0,00009

 $\Delta t = 1,09119E-05$ 

 $V1_1mL = 0.005774776$ 

V2\_1mL= 0,005774776

V3\_1mL= 0,005774776

V4\_1mL= 0,005774776

V5\_1mL= 0,005774776

A incerteza para cada um dos frascos de 1mL foi calculada a partir das seguintes contribuições individuais:

calibração = 0,005773503

repe = 0

 $\Delta t = 0,000121244$ 

Incerteza combinada para cada uma das soluções da curva

uc ( $C1_{\text{sol curva}}$ ) = 0,007223252  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C2_{\text{sol curva}}$ ) = 0,014446503 µg.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C3_{sol\ curva}$ ) = 0,011816626 µg.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C4_{\text{sol curva}}$ ) = 0,013786064 µg.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C5_{\text{sol\_curva}}$ ) = 0,017724939 µg.mL<sup>-1</sup>

### 4 - Incerteza da Curva analítica

Grandezas de entrada: Area da amostra, Area do branco, 5 soluções ( $C_1$  a  $C_5$ ), áreas referentes às soluções da curva (A1 a A5).

Incerteza combinada

uc (
$$C_{\text{curva analitica}}$$
) = 0,0262 µg.mL<sup>-1</sup>

5 – Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultados da concentração encontrada.

Incerteza combinada  $uc~(\textit{Rec}) = 0,0029~\mu g.m L^{-1}$   $u(C_{real}) = 0,00252265~\mu g.m L^{-1}$   $u(C_{encontrada}) = 5,31907E-05~\mu g.m L^{-1}$ 

# CÁLCULO DE INCERTEZAS PARA ESTRADIOL EM ÁGUA TRATADA

1 - Incerteza da preparação da solução padrão

Grandezas de entrada: massa do padrão, pureza do padrão e volume final da solução estoque.

Componentes de incertezas

 $u(m) = 0.0353701 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

 $u(P) = 0.0173205 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

 $u(V) = 0.0087335 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

Incerteza combinada

uc (Estradiol) =  $0.00403 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

### 2 - Incerteza da preparação da solução de trabalho

Grandezas de entrada: Solução estoque, volume pipetado da solução estoque individual para preparação da solução mista de trabalho e volume da solução mista de trabalho.

Componentes de incertezas

$$\begin{split} u(C_{estoque}) &= 0,004034 \; \mu g.mL^{-1} \\ u(\textit{V}_{i\_estoque}) &= 0,004007343 \; mg.mL^{-1} \\ & calibração = 0,003464102 \\ & repe = 0,002 \\ & \Delta t = 0,000242487 \\ u(V_{final}) &= 0,015323294 \; \mu g.mL^{-1} \end{split}$$

calibração = 0,011547005 repe = 0,01  $\Delta t = 0,001212436$ 

### Incerteza combinada

uc ( $C_{\text{sol\_trabalho}}$ ) = 0,048942101 µg.mL<sup>-1</sup>

3 - Incerteza da preparação das soluções de calibração para a curva analítica Grandezas de entrada: volumes da solução de trabalho pipetados e volumes dos frascos usados para diluição das soluções.

 $V1_{work\_sol} = 0,000289377$ 

calibração = 0,000288675

repe = 0,00002

 $\Delta t = 2,42487E-06$ 

 $V2\_work\_sol = 0,000578755$ 

calibração = 0,00057735

repe = 0,00004

 $\Delta t = 4,84974E-06$ 

 $V3_{work_{sol}} = 0,000293036$ 

calibração = 0,000288675

repe = 0,00005

 $\Delta t = 6,06218E-06$ 

 $V4\_work\_sol = 0,000351643$ 

calibração = 0,00034641

repe = 0,00006

 $\Delta t = 7,27461E-06$ 

 $V5_{work_{sol}} = 0,000527465$ 

calibração = 0,000519615

repe = 0,00009

 $\Delta t = 1,09119E-05$ 

V1\_1mL= 0,005774776

V2\_1mL= 0,005774776

V3\_1mL= 0,005774776

V4\_1mL= 0,005774776

V5\_1mL= 0,005774776

A incerteza para cada um dos frascos de 1mL foi calculada a partir das seguintes contribuições individuais:

calibração = 0,005773503  
repe = 0 
$$\Delta t = 0,000121244$$

Incerteza combinada para cada uma das soluções da curva

```
uc (C1_{\text{sol\_curva}}) = 0,006123281 \ \mu \text{g.mL}^{-1}

uc (C2_{\text{sol\_curva}}) = 0,012246562 \ \mu \text{g.mL}^{-1}

uc (C3_{\text{sol\_curva}}) = 0,008347667 \ \mu \text{g.mL}^{-1}

uc (C4_{\text{sol\_curva}}) = 0,010017201 \ \mu \text{g.mL}^{-1}

uc (C5_{\text{sol\_curva}}) = 0,015025801 \ \mu \text{g.mL}^{-1}
```

### 4 - Incerteza da Curva analítica

Grandezas de entrada: Area da amostra, Area do branco, 5 soluções (C<sub>1</sub> a C<sub>5</sub>), áreas referentes às soluções da curva (A1 a A5).

Incerteza combinada uc ( $C_{\text{curva\_analitica}}$ ) = 0,0263 µg.mL<sup>-1</sup>

### 5 – Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultados da concentração encontrada.

Incerteza combinada

```
uc (Rec) = 0,0986 \mug.mL<sup>-1</sup> u(C_{real}) = 0,002522789 \ \mug.mL<sup>-1</sup> u(C_{encontrada}) = 0,098961414 \mug.mL<sup>-1</sup>
```

# CÁLCULO DE INCERTEZAS PARA ESTRADIOL EM AGUA BRUTA

## 1 - Incerteza da preparação da solução padrão

Grandezas de entrada: massa do padrão, pureza do padrão e volume final da solução estoque.

Componentes de incertezas  $u(m) = 0.0353701 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

### 2 - Incerteza da preparação da solução de trabalho

Grandezas de entrada: Solução estoque, volume pipetado da solução estoque individual para preparação da solução mista de trabalho e volume da solução mista de trabalho.

Componentes de incertezas 
$$\begin{split} u(C_{estoque}) &= 0,004034 \; \mu g.mL^{-1} \\ u(\textit{V}_{i\_estoque}) &= 0,004007343 \; mg.mL^{-1} \\ calibração &= 0,003464102 \\ repe &= 0,002 \\ \Delta t &= 0,000242487 \\ u(V_{final}) &= 0,015323294 \; \mu g.mL^{-1} \\ calibração &= 0,011547005 \\ repe &= 0,01 \\ \Delta t &= 0,001212436 \end{split}$$

Incerteza combinada uc ( $C_{\text{sol\_trabalho}}$ ) = 0,048942101 µg.mL<sup>-1</sup>

3 - Incerteza da preparação das soluções de calibração para a curva analítica Grandezas de entrada: volumes da solução de trabalho pipetados e volumes dos frascos usados para diluição das soluções.

```
V1\_work\_sol = 0,000289377 calibração = 0,000288675 repe = 0,00002 \Delta t = 2,42487E-06 V2\_work\_sol = 0,000578755 calibração = 0,00057735 repe = 0,00004 \Delta t = 4,84974E-06 V3\_work\_sol = 0,000293036
```

calibração = 0,000288675 repe = 0,00005

 $\Delta t = 6,06218E-06$ 

 $V4\_work\_sol = 0,000351643$ 

calibração = 0,00034641

repe = 0,00006

 $\Delta t = 7,27461E-06$ 

 $V5_{work_{sol}} = 0,000527465$ 

calibração = 0,000519615

repe = 0,00009

 $\Delta t = 1,09119E-05$ 

 $V1_1mL = 0.005774776$ 

V2\_1mL= 0,005774776

V3\_1mL= 0,005774776

V4\_1mL= 0,005774776

V5\_1mL= 0,005774776

A incerteza para cada um dos frascos de 1mL foi calculada a partir das seguintes contribuições individuais:

calibração = 0,005773503

repe = 0

 $\Delta t = 0,000121244$ 

Incerteza combinada para cada uma das soluções da curva

uc ( $C1_{\text{sol curva}}$ ) = 0,006123281 µg.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C2_{sol\_curva}$ ) = 0,012246562 µg.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C3_{sol\ curva}$ ) = 0,008347667  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C4_{sol\_curva}$ ) = 0,010017201  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C5_{sol curva}$ ) = 0,015025801 µg.mL<sup>-1</sup>

#### 4 - Incerteza da Curva analítica

Grandezas de entrada: Area da amostra, Area do branco, 5 soluções ( $C_1$  a  $C_5$ ), áreas referentes às soluções da curva (A1 a A5).

Incerteza combinada

uc (
$$C_{\text{curva analitica}}$$
) = 0,0168 µg.mL<sup>-1</sup>

5 – Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultados da concentração encontrada.

Incerteza combinada

uc (
$$Rec$$
) = 0,0174  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> 
$$u(C_{real}) = 0,00252279 \ \mu g.mL^{-1}$$
 
$$u(C_{encontrada}) = 0,015048411 \ \mu g.mL^{-1}$$

# CÁLCULO DE INCERTEZAS PARA ETINILESTRADIOL EM ÁGUA TRATADA

1 - Incerteza da preparação da solução padrão

Grandezas de entrada: massa do padrão, pureza do padrão e volume final da solução estoque.

Componentes de incertezas

 $u(m) = 0.0353701 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

 $u(P) = 0.0034641 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

 $u(V) = 0.0087335 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

Incerteza combinada

uc (Etinilestradiol) = 0,00366 mg.mL<sup>-1</sup>

### 2 - Incerteza da preparação da solução de trabalho

Grandezas de entrada: Solução estoque, volume pipetado da solução estoque individual para preparação da solução mista de trabalho e volume da solução mista de trabalho.

Componentes de incertezas

$$\begin{split} u(C_{estoque}) &= 0,003659666 \ \mu g.mL^{-1} \\ u(V_{i\_estoque}) &= 0,004007343 \ mg.mL^{-1} \\ & calibração = 0,003464102 \\ & repe = 0,002 \\ & \Delta t = 0,000242487 \\ u(V_{final}) &= 0,015323294 \ \mu g.mL^{-1} \end{split}$$

calibração = 0,011547005 repe = 0,01  $\Delta t = 0,001212436$ 

Incerteza combinada

uc ( $C_{\text{sol\_trabalho}}$ ) = 0,055165703 µg.mL<sup>-1</sup>

3 - Incerteza da preparação das soluções de calibração para a curva analítica Grandezas de entrada: volumes da solução de trabalho pipetados e volumes dos frascos usados para diluição das soluções.

 $V1_{work_{sol}} = 0,000289377$ 

calibração = 0,000288675

repe = 0,00002

 $\Delta t = 2,42487E-06$ 

 $V2\_work\_sol = 0,000578755$ 

calibração = 0,00057735

repe = 0,00004

 $\Delta t = 4,84974E-06$ 

 $V3_{work_sol} = 0,000293036$ 

calibração = 0,000288675

repe = 0,00005

 $\Delta t = 6,06218E-06$ 

 $V4\_work\_sol = 0,00041025$ 

calibração = 0,000404145

repe = 0,00007

 $\Delta t = 8,48705E-06$ 

 $V5_{work}sol = 0,000468858$ 

calibração = 0,00046188

repe = 0,00008

 $\Delta t = 9,69948E-06$ 

 $V1_1mL = 0,005774776$ 

V2\_1mL= 0,005774776

V3\_1mL= 0,005774776

V4\_1mL= 0,005774776

V5 1mL= 0,005774776

A incerteza para cada um dos frascos de 1mL foi calculada a partir das seguintes contribuições individuais:

calibração = 0,005773503  
repe = 0  
$$\Delta t = 0,000121244$$

Incerteza combinada para cada uma das soluções da curva

```
uc (C1_{\text{sol\_curva}}) = 0.006902255 \, \mu \text{g.mL}^{-1}

uc (C2_{\text{sol\_curva}}) = 0.013804509 \, \mu \text{g.mL}^{-1}

uc (C3_{\text{sol\_curva}}) = 0.00940959 \, \mu \text{g.mL}^{-1}

uc (C4_{\text{sol\_curva}}) = 0.013173426 \, \mu \text{g.mL}^{-1}

uc (C5_{\text{sol\_curva}}) = 0.015055344 \, \mu \text{g.mL}^{-1}
```

#### 4 – Incerteza da Curva analítica

Grandezas de entrada: Area da amostra, Area do branco, 5 soluções ( $C_1$  a  $C_5$ ), áreas referentes às soluções da curva (A1 a A5).

Incerteza combinada

uc (
$$C_{\text{curva\_analitica}}$$
) = 0,0232 µg.mL<sup>-1</sup>

## 5 - Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultados da concentração encontrada.

Incerteza combinada

```
uc (Rec) = 0,0884 \mug.mL<sup>-1</sup>

u(C_{real}) = 0,00252267 \mug.mL<sup>-1</sup>

u(C_{encontrada}) = 0,087427989 \mug.mL<sup>-1</sup>
```

# CÁLCULO DE INCERTEZAS PARA ETINILESTRADIOL EM ÁGUA BRUTA

### 1 - Incerteza da preparação da solução padrão

Grandezas de entrada: massa do padrão, pureza do padrão e volume final da solução estoque.

Componentes de incertezas

$$u(m) = 0.0353701 \text{ mg.mL}^{-1}$$
  
 $u(P) = 0.0034641 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

2 - Incerteza da preparação da solução de trabalho

Grandezas de entrada: Solução estoque, volume pipetado da solução estoque individual para preparação da solução mista de trabalho e volume da solução mista de trabalho.

Componentes de incertezas  $u(C_{estoque}) = 0,003659666 \ \mu g.mL^{-1}$   $u(V_{i\_estoque}) = 0,004007343 \ mg.mL^{-1}$  calibração = 0,003464102 repe = 0,002  $\Delta t = 0,000242487$   $u(V_{final}) = 0,015323294 \ \mu g.mL^{-1}$  calibração = 0,011547005 repe = 0,01  $\Delta t = 0,001212436$ 

Incerteza combinada uc ( $C_{\text{sol\_trabalho}}$ ) = 0,055165703 µg.mL<sup>-1</sup>

3 - Incerteza da preparação das soluções de calibração para a curva analítica Grandezas de entrada: volumes da solução de trabalho pipetados e volumes dos frascos usados para diluição das soluções.

```
V1\_work\_sol = 0,000289377 calibração = 0,000288675 repe = 0,00002 \Delta t = 2,42487E-06 V2\_work\_sol = 0,000578755 calibração = 0,00057735 repe = 0,00004 \Delta t = 4,84974E-06 V3\_work\_sol = 0,000293036 calibração = 0,000288675
```

repe = 0,00005

 $\Delta t = 6,06218E-06$ 

 $V4\_work\_sol = 0,00041025$ 

calibração = 0,000404145

repe = 0,00007

 $\Delta t = 8,48705E-06$ 

 $V5_{work_sol} = 0,000468858$ 

calibração = 0,00046188

repe = 0,00008

 $\Delta t = 9,69948E-06$ 

 $V1_1mL = 0.005774776$ 

V2\_1mL= 0,005774776

V3 1mL= 0,005774776

V4\_1mL= 0,005774776

V5\_1mL= 0,005774776

A incerteza para cada um dos frascos de 1mL foi calculada a partir das seguintes contribuições individuais:

calibração = 0,005773503

repe = 0

 $\Delta t = 0.000121244$ 

Incerteza combinada para cada uma das soluções da curva

uc ( $C1_{\text{sol curva}}$ ) = 0,006902255 µg.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C2_{\text{sol curva}}$ ) = 0,013804509 µg.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C3_{\text{sol curva}}$ ) = 0,00940959 µg.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C4_{\text{sol curva}}$ ) = 0,013173426 µg.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C5_{\text{sol curva}}$ ) = 0,015055344 µg.mL<sup>-1</sup>

#### 4 - Incerteza da Curva analítica

Grandezas de entrada: Area da amostra, Area do branco, 5 soluções ( $C_1$  a  $C_5$ ), áreas referentes às soluções da curva (A1 a A5).

Incerteza combinada

uc (
$$C_{\text{curva analitica}}$$
) = 0,0227 µg.mL<sup>-1</sup>

### 5 – Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultados da concentração encontrada.

Incerteza combinada  $uc \; (\textit{Rec}) = 0.0934 \; \mu g.mL^{-1} \\ u(C_{real}) = 0.00252267 \; \mu g.mL^{-1} \\ u(C_{encontrada}) = 0.087993806 \; \mu g.mL^{-1}$ 

# CÁLCULO DE INCERTEZAS PARA NORGESTREL EM ÁGUA TRATADA

### 1 - Incerteza da preparação da solução padrão

Grandezas de entrada: massa do padrão, pureza do padrão e volume final da solução estoque.

Componentes de incertezas

 $u(m) = 0.0353701 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

 $u(P) = 0.0057735 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

 $u(V) = 0.0087335 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

Incerteza combinada

uc (Norgestrel) =  $0.00369 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

### 2 - Incerteza da preparação da solução de trabalho

Grandezas de entrada: Solução estoque, volume pipetado da solução estoque individual para preparação da solução mista de trabalho e volume da solução mista de trabalho.

Componentes de incertezas

$$\begin{split} u(C_{estoque}) &= 0,003688697 \; \mu g.mL^{-1} \\ u(\textit{V}_{i\_estoque}) &= 0,004007343 \; mg.mL^{-1} \\ &= calibração = 0,003464102 \\ &= epe = 0,002 \\ &= 0,000242487 \\ u(V_{final}) &= 0,015323294 \; \mu g.mL^{-1} \\ &= calibração = 0,011547005 \end{split}$$

repe = 0,01  $\Delta t = 0,001212436$ 

Incerteza combinada

uc ( $C_{\text{sol\_trabalho}}$ ) = 0,049949877 µg.mL<sup>-1</sup>

3 - Incerteza da preparação das soluções de calibração para a curva analítica Grandezas de entrada: volumes da solução de trabalho pipetados e volumes dos frascos usados para diluição das soluções.

 $V1_{work_sol} = 0,000289377$ 

calibração = 0,000288675

repe = 0,00002

 $\Delta t = 2,42487E-06$ 

 $V2_{work\_sol} = 0,000578755$ 

calibração = 0,00057735

repe = 0,00004

 $\Delta t = 4,84974E-06$ 

 $V3_{work_{sol}} = 0,000293036$ 

calibração = 0,000288675

repe = 0,00005

 $\Delta t = 6,06218E-06$ 

 $V4\_work\_sol = 0,000351643$ 

calibração = 0,00034641

repe = 0,00006

 $\Delta t = 7,27461E-06$ 

 $V5_{work_sol} = 0,000468858$ 

calibração = 0,00046188

repe = 0,00008

 $\Delta t = 9,69948E-06$ 

 $V1_1mL = 0,005774776$ 

V2\_1mL= 0,005774776

V3\_1mL= 0,005774776

V4\_1mL= 0,005774776

V5\_1mL= 0,005774776

A incerteza para cada um dos frascos de 1mL foi calculada a partir das seguintes contribuições individuais:

calibração = 0,005773503  
repe = 0  
$$\Delta t = 0,000121244$$

Incerteza combinada para cada uma das soluções da curva

```
uc (C1_{\text{sol\_curva}}) = 0,00624953 \ \mu \text{g.mL}^{-1}

uc (C2_{\text{sol\_curva}}) = 0,01249906 \ \mu \text{g.mL}^{-1}

uc (C3_{\text{sol\_curva}}) = 0,008519765 \ \mu \text{g.mL}^{-1}

uc (C4_{\text{sol\_curva}}) = 0,010223718 \ \mu \text{g.mL}^{-1}

uc (C5_{\text{sol\_curva}}) = 0,013631624 \ \mu \text{g.mL}^{-1}
```

#### 4 – Incerteza da Curva analítica

Grandezas de entrada: Area da amostra, Area do branco, 5 soluções ( $C_1$  a  $C_5$ ), áreas referentes às soluções da curva (A1 a A5).

Incerteza combinada

uc (
$$C_{\text{curva analitica}}$$
) = 0,0238 µg.mL<sup>-1</sup>

### 5 - Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultados da concentração encontrada.

Incerteza combinada

uc (
$$Rec$$
) = 0,0078  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> 
$$u(C_{real}) = 0,00252272 \ \mu$$
g.mL<sup>-1</sup> 
$$u(C_{encontrada}) = 0,006501636 \ \mu$$
g.mL<sup>-1</sup>

# CÁLCULO DE INCERTEZAS PARA NORGESTREL EM ÁGUA BRUTA

#### 1 - Incerteza da preparação da solução padrão

Grandezas de entrada: massa do padrão, pureza do padrão e volume final da solução estoque.

Componentes de incertezas

 $u(m) = 0.0353701 \text{ mg.mL}^{-1}$   $u(P) = 0.0057735 \text{ mg.mL}^{-1}$   $u(V) = 0.0087335 \text{ mg.mL}^{-1}$ Incerteza combinada

uc (Norgestrel) =  $0.00369 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

2 - Incerteza da preparação da solução de trabalho

Grandezas de entrada: Solução estoque, volume pipetado da solução estoque individual para preparação da solução mista de trabalho e volume da solução mista de trabalho.

Componentes de incertezas

$$\begin{split} u(C_{estoque}) &= 0,003688697 \; \mu g.mL^{-1} \\ u(\textit{V}_{i\_estoque}) &= 0,004007343 \; mg.mL^{-1} \\ & calibração = 0,003464102 \\ repe &= 0,002 \\ \Delta t &= 0,000242487 \\ u(V_{final}) &= 0,015323294 \; \mu g.mL^{-1} \\ & calibração = 0,011547005 \\ repe &= 0,01 \\ \Delta t &= 0,001212436 \end{split}$$

Incerteza combinada

uc (
$$C_{\text{sol\_trabalho}}$$
) = 0,049949877 µg.mL<sup>-1</sup>

3 - Incerteza da preparação das soluções de calibração para a curva analítica Grandezas de entrada: volumes da solução de trabalho pipetados e volumes dos frascos usados para diluição das soluções.

```
V1\_work\_sol = 0,000289377 calibração = 0,000288675 repe = 0,00002 \Delta t = 2,42487E-06 V2\_work\_sol = 0,000578755 calibração = 0,00057735 repe = 0,00004
```

$$\Delta t = 4,84974E-06$$

 $V3_{work_{sol}} = 0,000293036$ 

calibração = 0,000288675

repe = 0,00005

 $\Delta t = 6,06218E-06$ 

 $V4\_work\_sol = 0,000351643$ 

calibração = 0,00034641

repe = 0,00006

 $\Delta t = 7,27461E-06$ 

 $V5_{work\_sol} = 0,000468858$ 

calibração = 0,00046188

repe = 0,00008

 $\Delta t = 9,69948E-06$ 

 $V1_1mL = 0.005774776$ 

V2\_1mL= 0,005774776

V3\_1mL= 0,005774776

V4 1mL= 0,005774776

V5\_1mL= 0,005774776

A incerteza para cada um dos frascos de 1mL foi calculada a partir das seguintes contribuições individuais:

calibração = 0,005773503

repe = 0

 $\Delta t = 0,000121244$ 

Incerteza combinada para cada uma das soluções da curva

uc ( $C1_{\text{sol\_curva}}$ ) = 0,00624953 µg.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C2_{sol\_curva}$ ) = 0,01249906 µg.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C3_{sol\ curva}$ ) = 0,008519765 µg.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C4_{\text{sol curva}}$ ) = 0,010223718 µg.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C5_{\text{sol\_curva}}$ ) = 0,013631624 µg.mL<sup>-1</sup>

4 – Incerteza da Curva analítica

Grandezas de entrada: Area da amostra, Area do branco, 5 soluções ( $C_1$  a  $C_5$ ), áreas referentes às soluções da curva (A1 a A5).

Incerteza combinada

uc (
$$C_{\text{curva\_analitica}}$$
) = 0,0104 µg.mL<sup>-1</sup>

### 5 – Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultados da concentração encontrada.

Incerteza combinada

uc (
$$Rec$$
) = 0,0049  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> 
$$u(C_{real}) = 0,002522721 \ \mu$$
g.mL<sup>-1</sup> 
$$u(C_{encontrada}) = 0,003554227 \ \mu$$
g.mL<sup>-1</sup>

## CÁLCULO DE INCERTEZAS PARA PROGESTERONA EM ÁGUA TRATADA

## 1 - Incerteza da preparação da solução padrão

Grandezas de entrada: massa do padrão, pureza do padrão e volume final da solução estoque.

Componentes de incertezas

 $u(m) = 0.0353701 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

 $u(P) = 0.0023094 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

 $u(V) = 0.0087335 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

Incerteza combinada

uc (Progesterona) = 0,00365 mg.mL<sup>-1</sup>

## 2 - Incerteza da preparação da solução de trabalho

Grandezas de entrada: Solução estoque, volume pipetado da solução estoque individual para preparação da solução mista de trabalho e volume da solução mista de trabalho.

Componentes de incertezas

$$u(C_{estoque}) = 0.003650546 \ \mu g.mL^{-1}$$
  $u(V_{i\_estoque}) = 0.00250459 \ mg.mL^{-1}$  calibração = 0.002165064 repe = 0.00125

$$\Delta t = 0,000151554$$
 
$$u(V_{final}) = 0,015323294 \ \mu g.mL^{-1}$$
 
$$calibração = 0,011547005$$
 
$$repe = 0,01$$
 
$$\Delta t = 0,001212436$$

Incerteza combinada

uc (
$$C_{\text{sol\_trabalho}}$$
) = 0,050249194 µg.mL<sup>-1</sup>

3 - Incerteza da preparação das soluções de calibração para a curva analítica Grandezas de entrada: volumes da solução de trabalho pipetados e volumes dos frascos usados para diluição das soluções.

dos frascos usados para diluição das soluções. 
$$V1\_work\_sol = 0,000289377$$
 
$$calibração = 0,000288675$$
 
$$repe = 0,00002$$
 
$$\Delta t = 2,42487E-06$$
 
$$V2\_work\_sol = 0,000578755$$
 
$$calibração = 0,00057735$$
 
$$repe = 0,00004$$
 
$$\Delta t = 4,84974E-06$$
 
$$V3\_work\_sol = 0,000293036$$
 
$$calibração = 0,000288675$$
 
$$repe = 0,00005$$
 
$$\Delta t = 6,06218E-06$$
 
$$V4\_work\_sol = 0,000351643$$
 
$$calibração = 0,00034641$$
 
$$repe = 0,00006$$
 
$$\Delta t = 7,27461E-06$$
 
$$V5\_work\_sol = 0,000468858$$
 
$$calibração = 0,00046188$$
 
$$repe = 0,00008$$
 
$$\Delta t = 9,69948E-06$$

 $V1_1mL = 0,005774776$ 

V2\_1mL= 0,005774776

V3\_1mL= 0,005774776

A incerteza para cada um dos frascos de 1mL foi calculada a partir das seguintes contribuições individuais:

calibração = 0,005773503  
repe = 0  
$$\Delta t = 0,000121244$$

Incerteza combinada para cada uma das soluções da curva

```
uc (C1_{\text{sol\_curva}}) = 0.006287395 \ \mu \text{g.mL}^{-1}

uc (C2_{\text{sol\_curva}}) = 0.01257479 \ \mu \text{g.mL}^{-1}

uc (C3_{\text{sol\_curva}}) = 0.00857135 \ \mu \text{g.mL}^{-1}

uc (C4_{\text{sol\_curva}}) = 0.01028562 \ \mu \text{g.mL}^{-1}

uc (C5_{\text{sol\_curva}}) = 0.013714159 \ \mu \text{g.mL}^{-1}
```

#### 4 – Incerteza da Curva analítica

Grandezas de entrada: Area da amostra, Area do branco, 5 soluções ( $C_1$  a  $C_5$ ), áreas referentes às soluções da curva (A1 a A5).

Incerteza combinada

uc (
$$C_{\text{curva\_analitica}}$$
) = 0,0225 µg.mL<sup>-1</sup>

## 5 – Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultados da concentração encontrada.

Incerteza combinada

uc (
$$Rec$$
) = 0,0065  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> 
$$u(C_{real}) = 0,00252255 \ \mu$$
g.mL<sup>-1</sup> 
$$u(C_{encontrada}) = 0,005429057 \ \mu$$
g.mL<sup>-1</sup>

# CÁLCULO DE INCERTEZAS PARA PROGESTERONA EM ÁGUA BRUTA

1 - Incerteza da preparação da solução padrão

Grandezas de entrada: massa do padrão, pureza do padrão e volume final da solução estoque.

Componentes de incertezas  $u(m) = 0.0353701 \text{ mg.mL}^{-1}$   $u(P) = 0.0023094 \text{ mg.mL}^{-1}$   $u(V) = 0.0087335 \text{ mg.mL}^{-1}$  Incerteza combinada  $uc \text{ (Progesterona)} = 0.00365 \text{ mg.mL}^{-1}$ 

## 2 - Incerteza da preparação da solução de trabalho

Componentes de incertezas

Grandezas de entrada: Solução estoque, volume pipetado da solução estoque individual para preparação da solução mista de trabalho e volume da solução mista de trabalho.

$$\begin{split} u(C_{estoque}) &= 0,003650546 \; \mu g.mL^{-1} \\ u(V_{i\_estoque}) &= 0,00250459 \; mg.mL^{-1} \\ &= calibração = 0,002165064 \\ repe &= 0,00125 \\ \Delta t &= 0,000151554 \\ u(V_{final}) &= 0,015323294 \; \mu g.mL^{-1} \end{split}$$

calibração = 0,011547005 repe = 0,01  $\Delta t = 0,001212436$ 

Incerteza combinada

uc (
$$C_{\text{sol\_trabalho}}$$
) = 0,050249194 µg.mL<sup>-1</sup>

3 - Incerteza da preparação das soluções de calibração para a curva analítica Grandezas de entrada: volumes da solução de trabalho pipetados e volumes dos frascos usados para diluição das soluções.

 $V2\_work\_sol = 0,000578755$ 

calibração = 0,00057735

repe = 0,00004

 $\Delta t = 4,84974E-06$ 

 $V3_{work_{sol}} = 0,000293036$ 

calibração = 0,000288675

repe = 0,00005

 $\Delta t = 6,06218E-06$ 

 $V4\_work\_sol = 0,000351643$ 

calibração = 0,00034641

repe = 0,00006

 $\Delta t = 7,27461E-06$ 

V5 work sol = 0,000468858

calibração = 0,00046188

repe = 0,00008

 $\Delta t = 9,69948E-06$ 

 $V1_1mL = 0,005774776$ 

V2\_1mL= 0,005774776

V3\_1mL= 0,005774776

V4\_1mL= 0,005774776

V5\_1mL= 0,005774776

A incerteza para cada um dos frascos de 1mL foi calculada a partir das seguintes contribuições individuais:

calibração = 0,005773503

repe = 0

 $\Delta t = 0,000121244$ 

Incerteza combinada para cada uma das soluções da curva

uc ( $C1_{sol\_curva}$ ) = 0,006287395  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C2_{sol\_curva}$ ) = 0,01257479 µg.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C3_{\text{sol curva}}$ ) = 0,00857135 µg.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C4_{\text{sol curva}}$ ) = 0,01028562 µg.mL<sup>-1</sup>

uc ( $C5_{\text{sol curva}}$ ) = 0,013714159 µg.mL<sup>-1</sup>

### 4 – Incerteza da Curva analítica

Grandezas de entrada: Area da amostra, Area do branco, 5 soluções ( $C_1$  a  $C_5$ ), áreas referentes às soluções da curva (A1 a A5).

Incerteza combinada

uc (
$$C_{curva\_analitica}$$
) = 0,0158 µg.mL<sup>-1</sup>

## 5 – Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultados da concentração encontrada.

Incerteza combinada

uc (
$$Rec$$
) = 0,0179  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> 
$$u(C_{real}) = 0,00252255 \ \mu$$
g.mL<sup>-1</sup> 
$$u(C_{encontrada}) = 0,016891347 \ \mu$$
g.mL<sup>-1</sup>

## 13 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. ALCOCK, E. R.; SWEETMAN, A.; JONE, C. K. Assessment of organic contaminant fate in waste water treatment plants. I: selected compounds and physicochemical properties. *Chemosph.*, v. 38, no 10, 2247-2262, 1999
- 2. AMABIS, J. M.; MARTHO, G. R. Fundamentos da Biologia moderna. Editora Moderna, 3ª ed., 2002.
- 3. ANKLEY, G.; MIHAICH, E.; STAHL, R.; TILLITT, D.; COLBORN, T.; MCMASTER, S.; MILLER, R.; BANTLE, J.; CAMPBELL, P.; DENSLOW, N.; DICKERSON, R.; FOLMAR, L.; FRY, M.; GIESY, J.; GRAY, L.E.; GUINEY, P.; HUTCHINSON, Th.; KENNEDY, S.; KRAMER, V.; LEBLANC, G.; MAYES, M.; NIMROD, A.; PATINO, R.; PETERSON, R.; PURDY, R.; RINGER, R.; THOMAS, P.; TOUART, L.; VAN DER KRAAK, G.; ZACHAREWSKI, T. Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti-) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Environ. Toxicol .Chem.*, v. 17, 68-87, 1998.
- ARAÚJO, J. C. Estudo da eficiência do tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara-SP na remoção de hormônios sexuais. 2003. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos.
- 5. BAREL-COHEN, K.; SHORE, L. S.; SHEMESH, M.; WENZEL, A.; MUELLER, J.; KRONFELD-SCHOR, N. Monitoring of natural and synthetic hormones in a polluted river *J. Environ. Manag.*, v. 78, 16-23, 2006.
- 6. BARONTI, C.; CURINI, R.; D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; GENTILI, A.; SAMPERI, R. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environ. Sci. Technol.*, v. 34, nº 24, 34, 5059-5066, 2000.
- 7. BELFROID, A. C.; VAN DER HORST, A.; VETHAAK, A. D.; SCHÄFER, A. J.; RIJS, G. B. J.; WEGENER, J.; COFINO, W. P. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands *Sci. Total Environ.*, v. 225, 101-108. 1999.
- 8. BILA, D. M.; DEZOTTI, M.; Fármacos no meio ambiente. Quim. Nova, V. 26, n° 4, p. 523-530, 2003.
- 9. BIRKETT, J. W., LESTER, J. N., 2003, Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Process, 1° edição, Lewis Publishers.
- 10. BONATO, P. S.; COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. Introdução a Métodos Cromatográficos. 6ª ed., Campinas, SP: Unicamp, 1995.

- 11. BRAGA, B.; HESPANHOL, I.; CONEJO, J.G.L.; BARROS, M.T.L. de.; SPENCER, M.; PORTO, M.; NUCCI, N.; JULIANO, N.; EIGER, S. Introdução à Engenharia Ambiental. 1 ed. São Paulo: Prentice Hall, 2002.
- 12. BRITO, C. F. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em sedimentos. Avaliação da represa do Parque do Pedroso, Santo André. Dissertação (Mestrado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- 13. BUENO, P. C. P. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica em cromatografia gasosa para o controle de qualidade de *Eucalyptus globulus* e seus produtos: planta desidrata, extratos, óleo essencial e xarope de eucalipto. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- 14. BUERGE, I. J., POIGER, T., MULLER, M. D., BUSER, H-R. Caffeine, an Anthropogenic Marker for Wastewater Contamination of Surface Waters. *Environ Sci Technol*, v.37, 691–700, 2003.
- 15. CAS, 2010. Acessado em 16 de julho de 2010. Disponível em <a href="https://www.cas.org">www.cas.org</a>.
- CEIVAP e AGEVAP. Relatório de situação: Bacia Hidrográfica do rio Paraíba do Sul. 2008/2009. 2009.
- 17. CETESB Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Guia de coleta e preservação de amostras de água. 1987.
- 18. CHEN, H.-C.; KUO, H.-W.; DING, W.-H. Determination of estrogenic compounds in wastewater using liquid chromatography—tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure photoionization following desalting extraction. *Chemosphere*, v. 74, 508–514, 2009.
- 19. Chemkey, 2010. Acessado em 28 de agosto de 2010. Disponível em < http://chemkeys.com/en/>.
- 20. CIOLA, R. Fundamentos da cromatografia a gás. Ed. Edgard Blücher LTDA, 1985.
- 21. COLUCCI, M.S., BORK, H., TOPP, E. Persistence of estrogenic hormones in agricultural soils: I. 17b-estradiol and estrone. *J. Environ. Qual.* 30, 2070–2076, 2001.
- COPPETEC. Associação Pró-Gestão das águas da Bacia Hidrográfica do rio Paraíba do Sul – AGEVAP. Diagnóstico dos recursos hídricos - Relatório final, 2006
- 23. CSTEE; Human and wildlife health effects of endocrine disrupting chemicals, with emphasis on wildlife and on ecotoxicology test methods (CSTEE), 1999
- 24. DAMSTRA, T., BARLOW, S., BERGMAN, A., KAVLOCK, R., e VAN Der KRAAK, G. (2002). Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors. WHO publication no. WHO/PCS/EDC/02.2. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

- DASTON, G. P.; GOOCH, J. W.; BRESLIN, W. J.; SHUEY, D. L.; NIKIFOROV, A. I.; FICO, T. A.; GORSUCH, J. W. Environmental estrogens and reproductive health: A discussion of the human and environmental data. *Reproductive Toxicology*, v. 11, n. 4, 465-481, 1997.
- 26. DE MARIA, C. A. B., MOREIRA, R. F. A. Cafeína: Revisão sobre métodos de análise. *Quim. Nova,* v. 30, n. 1, 99-106, 2007.
- 27. EBERLIN, M. N. Espectrometria de massas. Princípios e Aplicações. Disponível em <a href="http://www.espectrometriademassas.com.br/autores/">http://www.espectrometriademassas.com.br/autores/</a>. Acessado em 17 de setembro de 2010.
- 28. EURACHEM-CITAC. *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. 2<sup>a</sup> ed., 2000. Disponível em: <a href="http://www.measurementuncertainty.org">http://www.measurementuncertainty.org</a>>. Acesso em 27 abril, 2009.
- 29. FCR. Plano da Bacia Hidrográfica di Paraíba do Sul UGRHI 02 2009-2012. **Fundação Christiano Rosa**, 2009
- 30. FREDHOLM, B; BÄTTIG, K; HOLMÉN, J; NEHLIG, A; ZVARTAU, E. Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors That Contribute to Its Widespread Use. *Pharmacological Reviews*, v. 51, n.1, 83-133, 2005;
- 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.
- 32. GEROLIN, E. R. R. Ocorrência e remoção de disruptores endócrinos em águas utilizadas para abastecimento público de Campinas e Sumaré São Paulo. Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo. Campinas/SP, 2008.
- 33. GHISELLI, G. Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP). Tese de doutorado, UNICAMP, Campinas, 2006.
- 34. GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. *Quim. Nova*, v. 30, n. 3, 695-706, 2007.
- 35. GIBBS, P. E.; BRYAN, G. W. Reproductive failure in populations of the dogwhelk, Nucella lapillus, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints. *J Mar Biol Assoc UK*, v. 66, 767-777, 1986.
- GIESY, J. P.; JONES, P. D.; KANNAN, K.; NEWSTED, J. L.; TILLITT, D. E.; WILLIAMS, L. L.Effects of chronc dietary exposure of environmentally relevant concentrations of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on survival, growth, reproduction and biochemical responses of female rainbow trout (Oncorhynchus mykiss); *Aquatic Toxicol.*, v. 59, 35-53, 2002.
- 37. GIROTTO, G. et al. Estrógenos em água: otimização da extração em fase sólida utilizando ferramentas quimiométricas. *Ecl. Quím.*, v. 32, nº 2, 61-68, 2007.

- GOETTLICH, P. What are Endocrine Disruptors? in Fundamentals of Naturopathic Endocrinology. Dr Friedman Michael Edit. CCNM Press 2005. Rev.8aug(2006). Disponível em: <a href="http://www.mindfully.org/Pesticide/EDs-PWG-16jun01.htm">http://www.mindfully.org/Pesticide/EDs-PWG-16jun01.htm</a>.
- 39. GOONAN, P. Risks from endocrine disrupting substances in the South Australian aquatic environment. Environment Protection Authority, Austrália, 2008.
- GRUBEN, A.; LOPES, P. D.; JOHNSSON, R. M. F. A Bacia do rio Paraíba do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais – 2001. Projeto Marca d'água. Relatórios preliminares 2001. 2002.
- 41. GUARAREMA. Disponível em < http://www.guararema.com.br/novagma/turismo\_dados.php>. Acessado em: 13/02/2008.
- 42. GUIA EURACHEM. **Determinando a incerteza na medição analítica**. Versão Brasileira,2ª ed, 2002
- 43. GUILLETTE, Jr. L. J.; WOODWARD, A. R.; CRAIN, D. A.; PICKFORD, D. B.; ROONEY, A. A.; PERCIVAL, H. F. Plasma steroid concentrations and male phallus size in juvenile alligators from seven florida lakes. *General and Comparative Endocrinology*, v. 116, 356-372, 1999.
- 44. GUIMARÃES, T. S. Detecção e quantificação dos hormônios sexuais 17 B-estradiol (E2), estriol (E3), estrona (E1) e 17 A- etinilestradiol (EE2) em água de abastecimento: Estudo de caso da cidade de São Carlos, com vistas ao saneamento ambiental. Dissertação (mestrado) Escola de engenharia de São Carlos da universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- HANSEN, P. D.; DIZER, H.; HOCK, B.; MARX, A.; SHERRY, J.; McCaster, M.; BLAISE, C. Vitellogenin a biomarker for endocrine disruptors. *Trends in analytical chemistry*, v. 17, no. 7, 1998.
- HEINZ, G. H.; PERCIVAL, H. F.; JENNINGS. M. L. Contaminants in American alligator eggs from Lake Apopka, Lake Griffin, and Lake Okeechobee, Florida. Jennings. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 16, 277-285, 1991.
- 47. HENTZ, K. L.; LAMB, J. C. State of the Science and Policy for Endocrine Disruption. The Weinberg Group Inc., 2007
- 48. HUANG, C. H.; SEDLAK, D. L. Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immune sorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environ Toxicol Chem*, v. 20, nº1,133-139, 2001.
- 49. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Acessado em 28 de julho de 2010. Disponível em <www.ibge.gov.br>.
- 50. INMETRO INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. *Quality management systems-guidelines for performance improvements.* Rio de Janeiro, NBR ISO 9004:2000, Revisão 01, Mar. 2003.

- 51. INMETRO INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. *Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos*. Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 02. Jun. 2007.
- 52. INMETRO INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. *Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos*. Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 03. Fev. 2010.
- 53. ISO GUM *Examples of Uncertainty Budgets for Chemical Analysis*. Disponível em <a href="http://www.ut.ee/katsekoda/GUM\_examples">http://www.ut.ee/katsekoda/GUM\_examples</a>>. Acesso em 03 julho 2009.
- 54. ISTAS Instituto sindical de trabajo ambeinte y salud. Curso de introdución a los disruptores endocrinos. 2002. Disponível em < http://www.istas.net/ma/decops/>. Acessado em 08 de fevereiro de 2010.
- 55. KAVLOCK, J.R., DASTON, G.P., DEROSA, C., FENNER-CRISP, P., GRAY, L.E., KAATTARI, S., LUCIER, G., LUSTER, M., MAC, M.J., MACZKA, C., MILLER, R., MOORE, J., ROLLAND, R., SCOTT, G., SHEEHAN, M., SINK, T.; TILSON, H.A. Research needs for risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the US sponsored workshop. Environmental Health Perspectives 104 (suppl. 4), 715-740. 1996.
- 56. KOLPIN, D. W., FURLONG, E. T., MEYER, M. T., THURMAN, E. M., ZAUGG, S. D., BARBER, L. B., BUXTON, H. T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S Streams, 1999 2000: *A National Reconnaissance. Environmental Science & Technology*, vol. 36, n. 6, p. 1202 1211, 2002.
- 57. KOOKANA, R. S.; RU, Y.-J., YING, G.-G. Ocurrence and fate of hormone steroids in the environmenta. *Environmental International*, v. 28, 545-551, 2002.
- KUCH HM, BALLSCHMITER K. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the pictogram per liter range. *Environ Sci Technol*, v. 35, 3201-3206, 2001.
- KUSTER, M.; AZEVEDO, D. A.; ALDA, M. J. L.; NETO, F.R. A.; BARCELÓ, D. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental Waters from Rio de Janeiro (Brazil). *Environment International*, v. 35, 997 – 1003, 2009.
- 60. LAI, K. M.; JOHNSON, K. L.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. *Environ Sci Technol*, v. 34, 3890 3894, 2000.
- 61. LAUDICÉIA, G. L.; MARCHI, R. R.; MARCHI, J. B. G. S.; MOURA, J. A. LORENZON, C. S.; CRUZ, L. A.; AMARAL, L. A. Estrogênio em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal São Paulo. *Quim. Nova,* v. 33, nº 3, 639-643, 2010.
- 62. LEITE, F. *Validação em análise química.* 5.ed. Campinas, SP: Editora Átomo, 2008.
- 63. LIBÂNIO, M. Fundamentos de qualidade e tratamento de água. 2.ed. Campinas, SP: Editora Átomo, 2008.

- 64. LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A. Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report) *Pure Appl. Chem.*, v. 75, no 5, 631-681, 2003.
- 65. MANNING, T. 'Endocrine-disrupting chemicals: A review of the state of the science', *Aust. J. Ecotoxicol.* 11: 1–52, 2005.
- 66. MANSILHA, C.; MELO, A.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; PINHO, O.; DOMINGUES, V.; PINHO, C.; GAMEIRO. Quantification of endocrine disruptors and pesticides in water by gás chromatography-tandem mass spectrometry. Method validation using weighted linear regression schemes. Journal of Chromatography A, v.x, n. x, 1-11, 2010.
- 67. MAS, S.; JUAN, A.; TAULER, R. OLIVIERI, A. C.; ESCANDAR, G. M. Application of chemometric methods to environmental analysis of organic pollutants: A review. *Talanta*, v. 8, 1052-1067, 2010.
- 68. McMaster, M.; McMaster, C. GC/MS a practical user's guide. Ed. Wiley-VCH, USA, 1998;
- MELLO-DA-SILVA, C. A.; FRUCHTENGARTEN,L. Riscos químicos ambientais à saúde da criança. *J. Pediatr*. (Rio J.). 2005;81(5.Supl.): S205-S211.
- MONTEIRO, M. C.; TRUGO, L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Quim. Nova*, v. 28, n. 4, 637-641, 2005
- 71. NIT-DICLA-021. Expressão da incerteza de medição. Ver. 02 de mai. 2003.
- 72. ORME M,; BACK D,; BRECKENRIDGE A. Clinical pharmacokinetics of oral contraceptive steroids. *Clin Pharmacokinet*, v. 8, 85-136, 1983.
- 73. OTOMO, J. I.; MARTINS, E. A. J.; MARQUES, M. N.; PIRES, M. A. F. . Avaliação do potencial de associação ao sedimento de traços de pesticida em águas de descarte de Estações de Tratamento de Água e águas superficiais da Bacia Hidrográfica do Rio Ribeira de Iguape, SP. In: 7º Congresso Nacional de Iniciação Científica-CONIC e 5 Congresso Internacional de Iniciação Científica-COINT, 2007, Sorocaba. Anais do 7º CONIC e 5 COINT. São Paulo: SEMESP, 2007. v. 2007. p. 1000004208.-1-1000004208.-2.
- 74. PAIXÃO, Y. N. F. Os problemas da gestão da bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul e suas conseqüências ambientais. Centro Federal de Educação Tecnológica Celso Suckow da Fonseca CEFET/RJ. 2009 XIII Simpósio Brasileiro de Geografia Física Aplicada. Ocorrida na Universidade Federal de Viçosa, 06 a 10/07/2009. Disponível em <a href="http://www.geo.ufv.br/simposio/simposio/trabalho3.html">http://www.geo.ufv.br/simposio/simposio/trabalho3.html</a>.
- 75. PARAIBA DO SUL. Acessado em: 03 de fevereiro de 2008. Disponível em: <a href="http://pt.wikipedia.org/wiki/Rio\_Para%C3%ADba\_do\_Sul.">http://pt.wikipedia.org/wiki/Rio\_Para%C3%ADba\_do\_Sul.</a>
- Pindamonhangaba. Acessado em 08 de setembro de 2010. Disponível em < http://pt.wikipedia.org/wiki/Pindamonhangaba>.
- 77. Pindamonhangaba. Acessado em 08 de setembro de 2010. Disponível em <a href="http://www.explorevale.com.br/cidades/pindamonhangaba/index.htm">http://www.explorevale.com.br/cidades/pindamonhangaba/index.htm</a>.

- 78. PIRES, M; A. F.; FURUSAWA, H. A. **Validação de métodos analíticos.** Apostila de Curso TNM 5797 Fundamentos em Química Ambiental e Ecotoxicologia, 2010.
- 79. PROJETO MARCA D'ÁGUA Finatec-UnB. Acessado em: 13/02/2008. Disponível em: <a href="http://www.marcadagua.org.br/bacia13.htm">http://www.marcadagua.org.br/bacia13.htm</a>.
- 80. PURDOM, C.E., HARDIMAN, P.A., BYE, V.J., ENO, N.C., TYLER, C.R., SUMPTER, J.P. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Journal of Chemical Ecology*, v. 8, 275-285, 1994.
- 81. REDDY, D. S.; VENKATARANGAN, L.; CHIEN, B.; RAMU, K. A high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay of the androgenic neurosteroid 3-androstanediol (5α-androstane-3α,17β-diol) in plasma. *Steroids*, v. 70, 879-885, 2005.
- 82. REIS FILHO; R. W.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E.M.. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. *Quím. Nova*. vol.29, n°.4, São Paulo July/Aug., 2006.
- 83. 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*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- 84. RM 68 Rede Metrológica RS. *Incerteza de medição: Guia prático do avaliador de laboratórios.* Revisão 03. Fev.2009.
- 85. RICHARDSON, S. D. Water analysis: Emerging Contaminants and current issues. *Anal. Chem.* v. 81, 4645-4677, 2009.
- 86. ROUTLEDGE, E.; SHEAHAN, D.; Desbrow, C.; Brighty, G.; Waldock, M.; Sumpter, J. Identification of estrogenic chemicals in STP effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environ Sci Technol.*, v. 32, 1559-65, 1998.
- 87. SEADE-Fundação Sistema Estadual de Analise de Dados. Acessado em: 28 de fevereiro de 2008. Disponível em: <www.seade.gov.br>.
- 88. SERVOS, R. M.; BENNIE, T. D.; BURNISON, K. JURKOVIC, B.; MCINNIS, A.; R.; NEHELI, T.; SCHNELL, A.; SETO, P.; SMUTH, A. S.; TERNES, A. T. Distribution of estrogens, 17h-estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. *Science of Tot. Environ.*, v. 336, 155-170, 2005.
- 89. SHIMADA, K.; MITAMURA, K.; HIGASHI, T. Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids; *Journal of Chromatography A*, v. 935, p. 141–172, 2001.
- 90. SILVA, A. M. Avaliação da qualidade do rio São Lourenço, SP, sob influência de estações de tratamento de água e estações de tratamento de esgoto. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- 91. SODRÉ, F. F.; MONTAGNER, C. C.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W.F. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil). *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 2, n. 2, 2007, 187-196

- 92. SONNENSCHEIN, C.; SOTO, A.M. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 65 (1-6), 143-150. 1998.
- 93. STRECK, G. Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 28, no 6, 635-652, 2009.
- 94. TABATA, A., KASHIWA, S., OHNISHI, Y., ISHIKAWA, H., MIYAMOTO, N., ITOH, M.; MAGARA, Y. Estrogenic influence of estradiol-17β, p-nonylphenol and bisphenol A on Japanese Medaka (Oryzias latipes) at detected environmental concentrations. *Water Science and Technology,* v. 43, nº 2, 109-116, 2001.
- 95. TAPIERO, H.; NGUYEN-BA, G.; TEW, K. D. Estrogens and environmental estrogens. *Biomed. Pharmacother*, v. 56, 36-44, 2002.
- TAYLOR JR, SELHORST JB, HOUFF SA, MARTINEZ AJ. Chlordecone intoxication in man. I. Clinical observations. *Neurology*. 1978 Jul;28(7):626-30.
- 97. TERNES, T. A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R.-D.; SERVOS, M. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *The Science of Total Environment*, v. 225, 81-90, 1999
- TERNES, T.A.; KRECKEL, P.; MUELLER, J. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – II. Aerobic batch experiments with activated sludge, *The Science of Total Environment*, v. 225, 91-99, 1999.
- 99. URASE,T.; KIKUTA, T. Separate estimation of adsorption and degradation of pharmaceutical substances and estrogens in the activated sludge process. *Water Research*, v. 39, 1289-1300, 2005.
- 100. USEPA-United States Environmental Protection Agency; Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An effects assessment and analysis, Washington, 1997.
- 101. USEPA-United States Environmental Protection Agency; Research Plan for Endocrine Disruptors, Washington, 1998.
- 102. VALE do Paraíba. Disponível em < http://www.valedoparaiba.com/>. Acessado em 07de fevereiro de 2008.
- 103. VANDER HEYDEN, Y.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B.G.M.; MASSART, D.L.; Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. J. Pharm. Biomed. Anal., 24, 2001.
- 104. VEGA-BUSTILLOS, O.; SASSINE, A.; MARCH, R. A espectrometria de massas quadrupolar. São Paulo, 2001.
- 105. VERENITCH, S. S.; MAZUMDER, A. Development of a methodology utilizing gas chromatography ion-trap tandem mass spectrometry for the determination of low levels of caffeine in surface marine and freshwater samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 391, n. 7, 2635-1646, 2008.

- 106. VIVAVOZ. Cafeína. SISP, v.1, 2007.
- 107. WESTER, P. W.; CANTON, J. H. Histopathological study of Oryzias latipes (medaka) after long-term β-hexachlorocyclohexane exposure. *Aquat. Toxicol.* v. 9, 21-45, 1986.
- 108. YING, G.-G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y.-J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International*, v. 28, 545-551, 2002.
- 109. YING, G.-G.; KOOKANA, R. S.; DILLON, P. Sorption and degradation of selected five endocrine disrupting chemicals in aquifer material. *Water Research*, v. 37, 3785-3791, 2003.
- 110. YING, G.-G.; KOOKANA, R. S.; KUMAR, A.; MORTIMER, M. Occurrence and implications of estrogens and xenoestrogens in sewage effluents and receiving waters from South East Queensland. *Science of the Total Environment*, v. 407, 5147–5155, 2009.
- 111. YOUNG, W. F.; WHITEHOUSE, P.; JOHNSON, I.; SOROKIN, N. Proposed predicted no effect concentrations (PNECs) for natural and synthetic steroid oestrogens in surface waters. Environment Agency R & D Technical report P2-T04/1. Bristol: England and Wales Environment Agency; p. 172, 2002.
- 112. ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia Aquática, Princípios e Aplicações. 1ª Ed., Ed. RIMA, São Carlos, SP, 2006.
- 113. ZEAITER, M,; ROGER, J,M.; BELLON-MAUREL, V,; RUTLEDGE, D.N.; Robustness of models developed by multivariate calibration. Part I: The assessment of robustness. Trends Anal. Chem., v. 23, n. 2, 2004.
- 114. ZHAO, J.-L.; YING, G.-G.; Wang, L.;, YANG, J.-F.; YANG, X.-B.; YANG, L.-H.; XU LI. Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface water of the Pearl Rivers in South China by gas chromatography–negative chemical ionization–mass spectrometry. *Science of the total environment*, v. 407, 962 974, 2009.