AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Avaliação de interferentes endócrinos e marcadores de atividade antrópica nos corpos d'água da área de instalação do Reator Multipropósito Brasileiro – RMB

LARISSA LIMEIRA DA SILVA

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

Orientadora:

Profa. Dra. Marycel Elena Barboza Cotrim

São Paulo

2018

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

Avaliação de interferentes endócrinos e marcadores de atividade antrópica nos corpos d'água da área de instalação do Reator Multipropósito Brasileiro – RMB

LARISSA LIMEIRA DA SILVA

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

Orientadora:
Profa. Dra. Marycel Elena Barboza Cotrim

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2018

Fonte de Financiamento: CNPq

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

SILVA, L. L. . ***Avaliação de interferentes endócrinos e marcadores de atividade a trópica nos corpos d'água da área de instalação do Reator Multipropósito Brasileiro – RMB.*** 2018. 201p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: <www.teses.usp.br> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva, Larissa Limeira da
Avaliação de interferentes endócrinos e marcadores de
atividade antrópica nos corpos d'água da área de instalação do
Reator Multipropósito Brasileiro – RMB / Larissa Limeira da
Silva; orientadora Marycel Elena Barboza Cotrim. -- São
Paulo, 2018.
201 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2018.

1. validação. 2. cromatografia gasosa. 3. interferentes
endócrinos. 4. material em suspensão na coluna d'água. I.
Cotrim, Marycel Elena Barboza, orient. II. Título.

**Dedico este trabalho a todas
as mulheres que me inspiram
a nunca desistir.**

AGRADECIMENTOS

À Dra. Marycel Elena Barboza Cotrim pelo tempo concedido, orientação e confiança durante todo o meu trabalho.

À Dra. Elâine Arantes Jardim Martins por sempre ter me auxiliado de forma tão positiva em todo o meu período de estudo, desde a iniciação científica.

Ao Dr. Hélio Akira Furusawa por sempre estar disponível para qualquer ajuda que foi precisa, e também pela elaboração da valiosa planilha de validação.

Ao Dr. Oscar Vegas, pela disponibilidade de tempo e ensinamentos sobre a técnica de espectrometria de massas.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, especialmente ao Centro de Química e Meio Ambiente, CQMA, pela oportunidade de desenvolver e dar continuidade aos meus estudos.

Ao CNPq pela bolsa concedida durante o período de mestrado.

À Dra. Sueli da Silva Peres do Instituto de Radioproteção e Dosimetria (IRD), coordenadora do Programa de Monitoração Radiológica Ambiental - Fase: Pré-operacional - Reator Multipropósito Brasileiro . RMB, e toda sua equipe pelo auxílio nas coletas.

Ao Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, CDTN/MG, pela belíssima equipe composta por pessoas especiais. E um grande agradecimento aos colegas Elenísio Santana Fonseca e Namir de Souza Vieira, do Serviço de Meio Ambiente, SEMAM, pelo valioso auxílio nas campanhas de coleta.

Às companheiras de trabalho Gisele Adame, Thamiris Stellato, Karoline Pereira, Priscila Amaral, Adriana Cavalcante e Juliana Carvalho, por sempre me ajudarem. E principalmente à Dra. Juliana Ikebe Otomo pela convivência e transmissão de conteúdos e informações sempre muito importantes.

A todos os funcionários do IPEN e CQMA pela disponibilidade para qualquer assunto. E um agradecimento em especial à Bruna Roque por toda ajuda e atenção.

À Sandra Merlo, Marcos Suguiura, e Tadele Simion, por anos de ótima convivência e diversos conhecimentos compartilhados.

Aos meus amigos Bruno, Marcos, Jennifer, Anderson, Wilson, Titan e Amanda, pelo companheirismo e apoio perante as minhas decisões.

E à minha família, em especial à minha mãe Irene de Cássia, e meus avós, Ruth e Irineu, por todo amor e confiança durante toda vida.

***Í Feliz aquele que transfere o que
sabe e aprende o que ensina. Í***

Cora Coralina

RESUMO

SILVA, L.L. **Avaliação de interferentes endócrinos e marcadores de atividade antrópica nos corpos d'água da área de instalação do Reator Multipropósito Brasileiro (RMB)**. 2018. 201 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) . Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares . IPEN - CNEN/SP. São Paulo.

O estudo de poluentes com características orgânicas e inorgânicas nas águas subterrâneas e superficiais de uma dada região é uma ferramenta importante na avaliação da poluição. Os interferentes endócrinos são produtos químicos sintéticos ou naturais que têm a capacidade de atuar no sistema endócrino de seres humanos e animais mimetizando hormônios naturais estimulando respostas diferentes das que originalmente seriam geradas e podem produzir efeitos adversos sobre os organismos, mesmo em concentrações de μg e ng L^{-1} . As atividades antrópicas são a principal fonte de entrada de interferentes endócrinos no meio ambiente. O objetivo desta pesquisa foi determinar 13 compostos orgânicos (dietilftalato, dibutilftalato, nonilfenol, bisfenol A, cafeína, androstano, estrona, estradiol, etinilestradiol, progesterona, coprostanol, colesterol e colestanol) que podem estar presentes nas águas subterrâneas e superficiais da área de instalação do Reator Multipropósito Brasileiro (RMB). Este é um estudo sem precedentes e de grande importância para a região avaliada, uma vez que fornecerá orientação sobre o grau de contaminação das águas locais antes do início do projeto de construção. O estudo também permitirá verificar se o projeto de construção do reator oferecerá algum prejuízo ambiental para a área em seu entorno. Para a determinação dos compostos de interesse, foi utilizado um método analítico desenvolvido e validado para determinação dos compostos de interesse em amostras de água e particulado da coluna d'água, consistindo na concentração das amostras por extração em fase sólida (SPE) e/ou extração ultrassônica, seguido de quantificação por cromatografia gasosa acoplada a detector de espectrometria de massa (GC/MS). Os resultados revelaram baixas concentrações de alguns dos compostos orgânicos estudados, derivados de atividades antrópicas nas proximidades do local. Os rios que atravessam a área do projeto de instalação apresentam a maioria dos valores abaixo de $0,05 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, normalmente em estação seca, exceto para cafeína, em outubro de 2016 ($0,80 \pm 0,03 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ a jusante do empreendimento) e outubro de 2017 ($0,22 \pm 0,01 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ a jusante do empreendimento) e para colesterol em outubro de 2017 a montante do empreendimento ($6,6 \pm 0,3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$).

Palavras chave: validação; cromatografia gasosa; interferentes endócrinos.

ABSTRACT

SILVA, L.L. **Evaluation of endocrine disruptors and anthropic activity markers in water bodies of the area of installation of the Brazilian Multipurpose Reactor EBMR.** 2018. 201 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) . Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares . IPEN - CNEN/SP. São Paulo.

The study of pollutants with organic and inorganic characteristics in groundwater and surface waters of a region is an important tool in the assessment of pollution. Endocrine disruptors are synthetic or natural chemicals that have ability to act in endocrine system of humans and animals mimicking natural hormones stimulating responses different from those originally generated, and can produce adverse effects on organisms even at concentrations of μg and ng L^{-1} . Anthropogenic activities are the main source of input of endocrine disruptors into the environment. The objective of this research was to determine 13 organic compounds (diethyl phthalate, dibutyl phthalate, nonylphenol, bisphenol A, caffeine, androstane, estrone, estradiol, ethinyl estradiol, progesterone, coprostanol, cholesterol and cholestanol) that may be present in the groundwater and surface Brazilian Multipurpose Reactor (RMB). This is an unprecedented and important study for the evaluated region, as it will provide guidance on the local water degree contamination prior to the start of the construction project. The study will also allow verifying if the construction project of the reactor will offer some environmental damage to the area in its surroundings. For the determination of the compounds of interest, an analytical method developed and validated for the determination of the compounds of interest in samples of water and particulate of the water column, consisting of the concentration of the samples by solid phase extraction (SPE) followed by quantification by gas chromatography coupled to mass spectrometry detector (GC/MS). By the results were observed low concentrations of some of the organic compounds studied, derived from anthropic activities near the site. The rivers that cross the installation project area show values below $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$, usually in the dry season, except for caffeine, in October 2016 ($0.80 \pm 0.03 \mu\text{g L}^{-1}$ downstream of the project) and October 2017 ($0.22 \pm 0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ downstream of the enterprise) and for cholesterol in October 2017 ($6.6 \pm 0.3 \mu\text{g L}^{-1}$ upstream).

Keywords: validation; gas chromatography; endocrine disruptors.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas

ADA: Área Diretamente Afetada

AID: Área de Influência Direta

All: Área de Influência Indireta

ANA: Agência Nacional de Águas

AND: Androstano

ANOVA: *Analysis of variance* . Análise de Variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI: *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* . Ionização Química à pressão Atmosférica

API: *Atmospheric Pressure Ionization* . Ionização à Pressão Atmosférica

APPI: *Atmospheric Pressure Photo Ionization* . Fotoionização à Pressão Atmosférica

BPA: Bisfenol-A

CAF: Cafeína

CATI: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral

CDTN: Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear

CETESB: Companhia de Tecnologia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo

CG: Cromatografia gasosa

CHOA: Colestanol

CHOE: Colesterol

CI: *Chemical Ionization* . Ionização Química

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

COP: Coprostanol

CQMA: Centro de Química e Meio Ambiente (IPEN)

CV: Coeficiente de Variação

DBP: Dibutilftalato

DCM: Diclorometano

DDT: Diclorodifeniltricloroetano

DEP: Dietilftalato

DIC: Dissociação Induzida por Colisão

DL50: Dose letal à 50%

DP: Desvio Padrão

DRX: Difractometria de Raios-X

E1: Estrona

E2: Estradiol

EE2: Etinilestradiol (17α -etinilestradiol)

EEA: *European Environmental Agency* . Agência Européia de Meio Ambiente

EEAT: Estação Elevatória de Água Tratada

EI: *Electron Impact* . Impacto de Elétrons

EIA-RIMA: Estudo e Relatório de Impacto Ambiental

EM: Espectrômetro de massas

EPA: *Environmental Protection Agency* . Agência de Proteção Ambiental

ESI: Electrospray Ionization

ETA: Estação de Tratamento de Água

FAB: *Fast Atom Bombardment* . Ionização por Átomos Rápidos

FAPESP: Fundação para o Amparo da Pesquisa no Estado de São Paulo

FRX: Espectrometria de Fluorescência de Raios-X

FWHM: *Full Width to Half Maximum* . Largura do pico à meia altura

GC/MS: *Gas Chromatography/Mass Spectrography* - Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas

GUS: *Groundwater Ubiquity Score* . Índice de Vulnerabilidade de Água Subterrânea

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography* . Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IAP: Índice da Qualidade da Água Bruta para fins de Abastecimento Público

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICMBio: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IDH: Índice de Desenvolvimento Humano

IEs: Interferentes endócrinos

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IPEN: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

IRD: Instituto de Radioproteção e Dosimetria

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

K_d: Coeficiente de Distribuição

LC: *Liquid Chromatography* . Cromatografia Líquida

LD: Limite de Detecção

Log K_{ow} : Coeficiente de partição octanol/água

LQ: Limite de Quantificação

LUPA: Levantamento das Unidades de Produção Agropecuária

m/z: relação massa:carga

MALDI: *Matrix-assited Laser Dessorption Ionization* - Ionização por Dessorção a Laser Assistida pela Matriz

MeOH: Metanol

MS: Ministério da Saúde

NBR: Normas Brasileiras (ABNT)

NNP: Nonilfenol

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPP: Office of Pesticide Programs

PARA: Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos

PNDU: Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento

POPs: Poluentes orgânicos persistentes

PROG: Progesterona

RMB: Reator Multipropósito Brasileiro

SABESP: Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo

SPE: *Solid Phase Extraction* . Extração em fase sólida

SPME: *Solid phase micro extraction* . Micro extração em fase sólida

THM: Trihalometano

TSP: *Thermospray* - Termospray

UGRHI: Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos

USEPA: United States Environmental Protection Agency

UTM: Universal Transversa de Mercator

VMP: Valor Máximo Permitido

WHO: *World Health Organization* . Organização Mundial da Saúde

WTP: *Water Treatment Plant* . Estação de Tratamento de Água

ZPE: Zona de Planejamento de Emergência

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físico-químicas dos compostos estudados	32
Tabela 2 . Descrição das Sub-bacias e municípios integrantes da UGRHI . 10.....	63
Tabela 3 - Temperatura do ar e precipitação da chuva em Iperó, SP	72
Tabela 4 - Identificação dos pontos de coleta na área do RMB.....	81
Tabela 5 . Propriedades da coluna cromatográfica utilizada neste trabalho de mestrado.....	95
Tabela 6 - Relação massa/carga dos fragmentos mais intensos de cada composto	97
Tabela 7 - Concentrações das soluções de trabalho dos compostos estudados	98
Tabela 8 . Resultados do teste de seletividade (teste F de Snedecor e t de Student, n=7) na matriz de material em suspensão na coluna d'água para os compostos Dietilftalato, Nonilfenol, Cafeína, Dibutilftalato, Androstano e Bisfenol A. Adição de padrão na matriz e sem matriz. Considerando $F_{\text{tabelado}} = 4,28$	116
Tabela 9 - Resultados do teste de seletividade (teste F de Snedecor e t de Student, n=7) na matriz de material em suspensão na coluna d'água para os compostos Estrona, Estradiol, Etinilestradiol, Progesterona, Coprostanol, Colesterol e Colestanol. Adição de padrão na matriz e sem matriz. Considerando $F_{\text{tabelado}} = 4,28$	117
Tabela 10 - Resultados obtidos para os testes de inclinação e paralelismo e do intercepto aplicando t-Student na matriz de material em suspensão na coluna d'água, considerando os dois conjuntos (com e sem matriz) de dados, com 7 graus de liberdade e 95% de confiança, onde 2,179 é o valor crítico	118
Tabela 11 - Valores de coeficiente de determinação dos compostos estudados para a matriz de material em suspensão na coluna d'água na faixa de trabalho estabelecida.....	121
Tabela 12 - Valores obtidos no Teste t-Student para a verificação do desvio da linearidade de cada ponto da curva para os compostos Dietilftalato, Nonilfenol, Cafeína, Dibutilftalato, Androstano e Bisfenol A, onde o valor de $t_{\text{tab}} = 2,365$ para 7 graus de liberdade com 95% de confiança	125
Tabela 13 - Valores obtidos no Teste t-Student para a verificação do desvio da linearidade de cada ponto da curva para os compostos Estrona, Estradiol, Etinilestradiol, Progesterona, Colesterol e Colestanol, onde o valor de $t_{\text{tab}} = 2,365$ para 7 graus de liberdade com 95% de confiança	126
Tabela 14 - Resumo dos resultados da análise de variância (ANOVA) para os compostos estudados no ensaio com a matriz de material em suspensão na coluna d'água	132
Tabela 15 - Valores de z (Score) para os compostos estudados no ensaio com matriz de material em suspensão na coluna d'água das amostras coletadas no entorno do RMB	136
Tabela 16 - Resumo dos resultados do teste de Reprodutibilidade, Repetibilidade e Coeficiente de Variação para os compostos estudados na matriz do material em suspensão da coluna d'água da região do RMB	137
Tabela 17 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método para cada composto em matriz do material em suspensão da coluna d'água de amostras coletadas no entorno do RMB.....	138

Tabela 18 - Valores de recuperação obtidos para concentração baixa no método final estabelecido.....	139
Tabela 19 - Valores de recuperação obtidos para concentração média no método final estabelecido.....	139
Tabela 20 - Valores de recuperação obtidos para concentração alta no método final estabelecido.....	140
Tabela 21 - Valores de coeficiente de determinação (r^2) dos compostos estudados para a matriz de água da região estudada (RMB).....	148
Tabela 22 - Valores de z Score para os compostos estudados no ensaio com matriz de água da região do RMB para três níveis de concentração	149
Tabela 23 - Resumo dos resultados do teste de Repetibilidade, Reprodutibilidade e coeficiente de variação para os compostos estudados na matriz de água da região do RMB.....	150
Tabela 24 - Resultados das análises das amostras águas coletadas em outubro de 2016 na área de instalação do RMB e seu entorno.	153
Tabela 25 - Resultados das análises das amostras do material em suspensão, coletados em outubro de 2016, na área de instalação do RMB.	154
Tabela 26- Resultados das análises das amostras águas coletadas em junho de 2017 na área de instalação do RMB e seu entorno.	156
Tabela 27 - Resultados das análises das amostras do material em suspensão, coletados em junho de 2017, na área de instalação do RMB.....	157
Tabela 28 - Tabela 28 - Resultados das análises das amostras águas coletadas em outubro de 2017 na área de instalação do RMB e seu entorno.....	159
Tabela 29 - Resultados das análises das amostras do material em suspensão, coletados em outubro de 2017, na área de instalação do RMB.	161

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das principais glândulas do sistema endócrino humano.....	25
Figura 2 - Modo de ação dos interferentes endócrinos.....	27
Figura 3 - Processo da exposição dos hormônios humanos ao meio ambiente.....	29
Figura 4 - Fórmula estrutural dos compostos de interesse	30
Figura 5 - Esquema de um sistema cromatográfico constituído por: 1) gás de arraste, 2) controlador de vazão e regulador de pressão, 3) sistema de injeção da amostra, 4) coluna cromatográfica, 5) detector e 6) registrador	41
Figura 6 - Mecanismo de derivatização.....	42
Figura 7 - Modelo de cromatograma no registrador.....	42
Figura 8 - Demarcação de Iperó e limites com demais municípios e sua localização no estado e no Brasil.	61
Figura 9 - Áreas próximas a FLONA de Ipanema e Zona de amortecimento.....	64
Figura 10 - Características gerais do projeto do RMB	68
Figura 11 - Terrenos do sítio do RMB em ARAMAR, Iperó.....	69
Figura 12 - Esquema de avaliação das áreas de Influência.....	70
Figura 13 - Topografia da área de implantação do reator.....	71
Figura 14 - Limite e quebras de relevo da ADA na área de construção do RMB	73
Figura 15 - Limite e zonas homólogas da ADA na área de construção do RMB.....	74
Figura 16 - Cromatógrafo gasoso (A) acoplado a um espectrômetro de massas (B)....	76
Figura 17 - Sistema de filtração a vácuo com membranas filtrantes em PTFE de 0,45 µm.....	77
Figura 18 - Sistema de extração em fase sólida.....	77
Figura 19 - Banho de ultrassom	78
Figura 20 - Rotoevaporador	78
Figura 21 - Mapeamento dos pontos de amostragem	82
Figura 22 - Fotos da área de amostragem do ponto PC2 (001RMB).....	83
Figura 23 - Fotos da área de amostragem do ponto P6 (002RMB)	84
Figura 24 - Fotos da área de amostragem do ponto P8 (003RMB)	84
Figura 25 - Fotos da área de amostragem do ponto P7 (004RMB)	85
Figura 26 - Fotos da área de amostragem do ponto IBAMA (006RMB).....	86
Figura 27 - Fotos da área de amostragem do ponto PC3-120m (007RMB).....	86
Figura 28 - Fotos da área de amostragem do ponto PC3-VIVEIRO 130 (008 RMB).....	87
Figura 29 - Fluxograma do procedimento de preparação da amostra de água.....	89
Figura 30 - Fluxograma do procedimento de preparação da amostra do material em suspensão da coluna de água	93
Figura 31 - Programação da rampa de temperatura do GC.....	96

Figura 32 - Diagrama de Causa e Efeito da metodologia aplicada para avaliação dos interferentes endócrinos	103
Figura 33 - Cromatograma de mistura de padrão com os 13 compostos estudados, modo SIM	109
Figura 34 - Cromatograma do Dietilftalado obtido no modo SIM	110
Figura 35 - Cromatograma do Nonilfenol obtido no modo SIM	110
Figura 36 - Cromatograma da Cafeína obtido no modo SIM	111
Figura 37 - Cromatograma do Dibutilftalato obtido no modo SIM.	111
Figura 38 - Cromatograma do Androstano obtido no modo SIM.....	112
Figura 39 - Cromatograma do Bisfenol A obtido no modo SIM.....	112
Figura 40 - Cromatograma da Estrona e Estradiol obtido no modo SIM	113
Figura 41 - Cromatograma da Etinilestradiol obtido no modo SIM.....	113
Figura 42 - Cromatograma da Progesterona obtido no modo SIM.....	114
Figura 43 - Cromatograma da Coprostanol obtido no modo SIM.....	114
Figura 44 - Cromatograma do Colesterol e Colestanol obtido no modo SIM	115
Figura 45 - Representação gráfica da seletividade para matriz de amostras de água e no ensaio sem matriz dos compostos Dietilftalato, Nonilfenol, Cafeína, Dibutilftalato, Androstano e Bisfenol A	119
Figura 46 - Representação gráfica da seletividade para matriz de amostras de água e no ensaio sem matriz dos compostos Estrona, Estradiol Etinilestradiol, Progesterona, Coprostanol, Colesterol e Colestanol	120
Figura 47 - Representação gráfica da linearidade para os compostos Dietilftalato,Nonilfenol, Cafeína, Dibutilftalato, Androstano e Bisfenol A.....	123
Figura 48 - Representação gráfica da linearidade para os compostos Estrona, Estradiol, Etinilestradiol, Progesterona, Coprostanol, Colesterol e Colestanol.....	124
Figura 49 - Gráficos de resíduos absoluto e normalizado para os compostos Dietilftalato, Nonilfenol e Cafeína	127
Figura 50 - Gráficos de resíduos absoluto e normalizado para os compostos: Dibutilftalato, Androstano e Bisfenol A	128
Figura 51 - Gráficos de resíduos absoluto e normalizado para os compostos: Estrona, Estradiol, Etinilestradiol.....	129
Figura 52 - Gráficos de resíduos absoluto e normalizado para os compostos: Progesterona e Coprostanol	130
Figura 53 - Gráficos de resíduos absoluto e normalizado para os compostos: Colesterol e Colestanol.....	130
Figura 54 - Gráficos da faixa de intervalo de confiança no ensaio com matriz para os compostos Dietilftalato, Nonilfenol, Cafeína, Dibutilftalato, Androstano e Bisfenol A	133
Figura 55 - Gráficos da faixa de intervalo de confiança no ensaio com matriz para os compostos Estrona, Estradiol, Etinilestradiol Progesterona, Coprostanol, Colesterol e Colestanol.....	134

Figura 56 - Representação gráfica das incertezas envolvidas na metodologia desenvolvida para determinação dos compostos Dietilftalato, Nonilfenol e Cafeína em matriz de material em suspensão da região do RMB	141
Figura 57 - Representação gráfica das incertezas envolvidas na metodologia desenvolvida para determinação dos compostos Dibutilftalato, Androstano e Bisfenol A em matriz do material em suspensão da região do RMB	142
Figura 58 - Representação gráfica das incertezas envolvidas na metodologia desenvolvida para determinação dos compostos Estrona, Estrradiol e Etinilestradiol em matriz do material em suspensão da região do RMB	143
Figura 59 - Representação gráfica das incertezas envolvidas na metodologia desenvolvida para determinação dos compostos Progesterona, Coprostanol e Colesterol em matriz do material em suspensão da região do RMB	144
Figura 60 - Representação gráfica das incertezas envolvidas na metodologia desenvolvida para determinação de Colestanol em matriz do material em suspensão da região do RMB	145
Figura 61 - Representação gráfica dos resultados do estudo da eficiência dos cartuchos Strata C ₁₈ e Strata X na metodologia desenvolvida para determinação de Dietilftalato, Dibutilftalato, Nonilfenol, Bisfenol-A, Androstano, Estrona, Estradiol, Etinilestradiol, Progesterona, Coprostanol, Colesterol e Colestanol em água ...	146
Figura 62 - Distribuição espacial dos compostos estudados em amostras de água e material em suspensão do ponto de coleta PC2 nas coletas de outubro de 2016, junho e outubro de 2017	162
Figura 63 - Distribuição espacial dos compostos estudados em amostras de água e material em suspensão do ponto de coleta P6 nas coletas de outubro de 2016, junho e outubro de 2017	163
Figura 64 - Distribuição espacial dos compostos estudados em amostras de água e material em suspensão do ponto de coleta P7 nas coletas de outubro de 2016, junho e outubro de 2017	164
Figura 65 - Distribuição espacial dos compostos estudados em amostras de água e material em suspensão do ponto de coleta P8 nas coletas de outubro de 2016, junho e outubro de 2017	165
Figura 66 - Distribuição espacial dos compostos estudados em amostras de água e material em suspensão do ponto de coleta P9 nas coletas de outubro de 2016, junho e outubro de 2017	167
Figura 67 - Distribuição espacial dos compostos estudados em amostras de água e material em suspensão do ponto de coleta LAGO nas coletas de outubro de 2016, junho e outubro de 2017	168
Figura 68 - Distribuição espacial dos compostos estudados em amostras de água e material em suspensão do ponto de coleta PC3-120m nas coletas de outubro de 2016, junho e outubro de 2017	169
Figura 69 - Distribuição espacial dos compostos estudados em amostras de água e material em suspensão do ponto de coleta PC3-130m nas coletas de outubro de 2016, junho e outubro de 2017	170
Figura 70 - Distribuição espacial dos compostos estudados em amostras de água e material em suspensão do ponto de coleta Córrego IBAMA nas coletas de outubro de 2016, junho e outubro de 2017	172

Figura 71 - Distribuição espacial dos compostos estudados em amostras de água e material em suspensão do ponto de coleta SABESP Sarapuí nas coletas de outubro de 2016, junho e outubro de 2017	173
Figura 72 - Dendrograma de linkagem <i>cluster</i> para todos os resultados obtidos nesta dissertação	174
Figura 73 - Resultados da Análise de Cluster para Dietilftalato em água, em material em suspensão e total, para cada ponto de amostragem, considerando as três coletas	193
Figura 74 - Resultados da Análise de Cluster para Cafeína em água para cada ponto de amostragem, considerando as três coletas	194
Figura 75 - Resultados da Análise de Cluster para Dibutilftalato em água, em material em suspensão e total, para cada ponto de amostragem, considerando as três coletas	195
Figura 76 - Resultados da Análise de Cluster para Androstano em água, em material em suspensão e total, para cada ponto de amostragem, considerando as três coletas.	196
Figura 77 - Resultados da Análise de Cluster para Bisfenol-A em água, em material em suspensão e total, para cada ponto de amostragem, considerando as três coletas.	197
Figura 78 - Resultados da Análise de Cluster para Estrona em água, em material em suspensão e total, para cada ponto de amostragem, considerando as três coletas.	198
Figura 79 - Resultados da Análise de Cluster para Estradiol em água, em material em suspensão e total, para cada ponto de amostragem, considerando as três coletas.	199
Figura 80 - Resultados da Análise de Cluster para Coprostanol em água, em material em suspensão e total, para cada ponto de amostragem, considerando as três coletas.	200
Figura 81 - Resultados da Análise de Cluster para Colesterol em água, em material em suspensão e total, para cada ponto de amostragem, considerando as três coletas.	201
Figura 82 - Resultados da Análise de Cluster para Colestanol em água, em material em suspensão e total, para cada ponto de amostragem, considerando as três coletas.	202

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVO GERAL	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	25
3.1	SISTEMA ENDÓCRINO	25
3.2	INTERFERENTES ENDÓCRINOS (IEs)	26
3.2.1	<i>Fonte de entrada dos IEs no meio ambiente</i>	<i>28</i>
3.2.2	<i>Características dos Compostos Estudados</i>	<i>29</i>
3.2.3	<i>Legislações sobre os interferentes endócrinos</i>	<i>32</i>
3.2.4	<i>Outros estudos avaliando interferentes endócrinos</i>	<i>34</i>
3.3	CICLO HIDROLÓGICO E QUALIDADE DA ÁGUA	39
3.3.1	<i>Características das águas subterrâneas e superficiais.....</i>	<i>39</i>
3.4	CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS	39
3.4.1	<i>Extração em fase sólida - SPE.....</i>	<i>43</i>
3.5	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA O MATERIAL EM SUSPENSÃO	46
3.5.1	<i>Seletividade.....</i>	<i>47</i>
3.5.2	<i>Faixa de Trabalho e Faixa Linear</i>	<i>50</i>
3.5.3	<i>Linearidade</i>	<i>51</i>
3.5.4	<i>Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)</i>	<i>52</i>
3.5.5	<i>Exatidão.....</i>	<i>53</i>
3.5.6	<i>Precisão.....</i>	<i>54</i>
3.5.7	<i>Recuperação.....</i>	<i>56</i>
3.5.8	<i>Cálculo de incerteza.....</i>	<i>56</i>
4	ÁREA DE ESTUDO	60
4.1	REATOR MULTIPROPÓSITO BRASILEIRO – RMB	62
4.2	FLORESTA NACIONAL DE IPANEMA.....	63
4.3	JUSTIFICATIVA LOCACIONAL	65
4.3.1	<i>Critério para instalação</i>	<i>65</i>
4.3.2	<i>Escolha da área do Centro Experimental de ARAMAR.....</i>	<i>66</i>
4.3.3	<i>Aspectos Econômicos, Sociais e Ambientais de Iperó</i>	<i>67</i>
4.3.4	<i>Planta Geral do Empreendimento</i>	<i>68</i>
4.3.5	<i>Áreas de Influência do RMB</i>	<i>69</i>
4.3.6	<i>Topografia da área do RMB.....</i>	<i>71</i>

4.4	CLIMA DA REGIÃO DO RMB	71
4.4.1	<i>Meio Físico</i>	72
4.4.2	<i>Meio Biótico</i>	74
4.4.3	<i>Hidrologia</i>	75
5	PARTE EXPERIMENTAL	76
5.1	EQUIPAMENTOS E MATERIAIS	76
5.2	REAGENTES E SOLUÇÕES	79
5.3	AMOSTRAGEM	80
5.3.1	<i>Características dos pontos de coleta</i>	82
5.4	COLETA E PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS	87
5.5	METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS ESTUDADOS EM MATRIZ DE ÁGUAS	88
5.5.1	<i>Estudos para a otimização da metodologia</i>	90
5.6	METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS ESTUDADOS EM MATRIZ DO MATERIAL EM SUSPENSÃO NA COLUNA D'ÁGUA.	91
5.6.1	<i>Histórico do desenvolvimento da metodologia para matriz do material em suspensão</i>	91
5.6.2	<i>Análise por GC/MS</i>	94
5.6.3	<i>Preparação para estudo de validação</i>	97
5.7	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA O MATERIAL EM SUSPENSÃO	98
5.7.1	<i>Seletividade</i>	99
5.7.2	<i>Faixa de Trabalho e Faixa Linear</i>	99
5.7.3	<i>Linearidade</i>	100
5.7.4	<i>Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)</i>	101
5.7.5	<i>Exatidão</i>	101
5.7.6	<i>Precisão</i>	101
5.7.7	<i>Recuperação</i>	101
5.7.8	<i>Cálculo de Incerteza</i>	102
5.8	REVALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA ÁGUA	106
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
6.1	RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS ESTUDADOS NA MATRIZ DE MATERIAL EM SUSPENSÃO NA COLUNA D'ÁGUA	107
6.1.1	<i>Seletividade – matriz de material em suspensão</i>	108
6.1.2	<i>Linearidade – matriz de material em suspensão</i>	121
6.1.3	<i>Exatidão – matriz de material em suspensão</i>	135
6.1.4	<i>Precisão – matriz de material em suspensão</i>	136
6.1.5	<i>Limites de detecção e quantificação – matriz de material em suspensão</i>	137
6.1.6	<i>Recuperação – matriz de material em suspensão</i>	138
6.1.7	<i>Estimativa das incertezas de medição – matriz de material em suspensão</i>	140

6.2	RESULTADOS DOS TESTES PARA OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA A MATRIZ ÁGUA	145
6.2.1	<i>Resultados do estudo para avaliação da eficiência dos cartuchos Strata C₁₈ e Strata X.....</i>	<i>146</i>
6.2.2	<i>Estudo da afinidade dos compostos estudados com a parte sólida da coluna d'água.</i>	<i>147</i>
6.3	RESULTADOS DA REVALIDAÇÃO DE PARÂMETROS PARA A MATRIZ ÁGUA.....	148
6.3.1	<i>Linearidade – matriz água</i>	<i>148</i>
6.3.2	<i>Exatidão – matriz água.....</i>	<i>149</i>
6.3.3	<i>Precisão – matriz água</i>	<i>150</i>
6.4	RESULTADOS DAS ANÁLISES DAS AMOSTRAS COLETADAS NA ÁREA DE ESTUDO	151
6.4.1	<i>Resultados para a coleta realizada em outubro de 2016.....</i>	<i>151</i>
6.4.2	<i>Resultados para a coleta realizada em junho de 2017</i>	<i>155</i>
6.4.3	<i>Resultados para a coleta realizada em outubro de 2017.....</i>	<i>158</i>
6.4.4	<i>Avaliação dos resultados por ponto de coleta.....</i>	<i>162</i>
7	CONCLUSÃO.....	176
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	178
	ANEXO 1 RESULTADOS DOS CÁLCULOS DAS CONTRIBUIÇÕES DE CADA GRANDEZA DE ENTRADA	185
	ANEXO 2 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE CLUSTERS (DENDROGRAMAS)	192

1 INTRODUÇÃO

A água doce é essencial para a preservação dos seres vivos, sendo assim, são necessários cuidados quanto sua qualidade e acessibilidade. Uma pequena taxa, cerca de 2,7%, no planeta Terra é de água doce, porém disponível em três estados (sólido, líquido e gasoso). Dentre a pequena porcentagem de água própria para utilização e consumo, 77,2% destes encontra-se em forma sólida distribuídas nas calotas polares, 22,4% como água subterrânea, 0,35% em lagos e pântanos, 0,04% no ar e apenas 0,01% em rios (TUNDISI, 2003; SMA, 2008). O ciclo hidrológico representa o movimento da água, processo no qual a água existente no planeta Terra se renova, e considera-se não haver alterações significativas para este ciclo há 500 milhões de anos, exceto na sua distribuição, e o estado físico em que se encontra (SMA, 2008).

Já o desenvolvimento econômico necessita de recursos energéticos e hídricos em funcionamento, relacionando com economias regionais, nacionais e internacionais, mas sempre necessitando preservar o meio ambiente. A utilização mais comum da água é para uso doméstico, industrial, agricultura, e para eletricidade, porém à medida que as atividades econômicas vão se diversificando, os usos múltiplos consequentemente aumentam em todas as regiões, continentes e países, para sustentar o consumo excessivo de água na sociedade (TUNDISI, 2003).

Relacionado com a alteração da qualidade da água, as atividades antrópicas, decorrentes da ação humana em um determinado ambiente, agem de forma contrária ao que é esperado pelo processo natural. No estudo desta dissertação, essa atuação tem o poder de alterar as principais fontes de distribuição e qualidade da água, assim como a composição do esgoto doméstico e industrial, pois mesmo sob o tratamento nas estações, ainda é possível a presença da concentração de poluentes orgânicos, sendo eles os responsáveis pela degradação dos corpos hídricos. Sendo assim, é fundamental a solicitação do licenciamento ambiental para empresas e indústrias, já que as mesmas são as

principais responsáveis pelo grande uso de água em seus processos, e também por gerar cargas poluidoras ao meio ambiente. No Brasil, tanto os recursos hídricos superficiais como os subterrâneos são de grande importância para o desenvolvimento econômico e social, visando a sustentabilidade tanto do setor público como o privado (BRAGA et al., 2005; LIBÂNIO, 2008; OTOMO, 2015; BARBIERO, 2015).

Devido as grandes consequências geradas pelo mau uso dos recursos naturais, a sociedade contemporânea vem requerendo cada vez mais mecanismos rápidos e eficientes no controle dos processos de contaminação ambiental. Devido ao uso inadequado da água e falta de atenção quanto aos corpos hídricos, o número de doenças geradas tende a aumentar, assim como a elevação no custo no tratamento de efluentes ou até mesmo a ocorrência da escassez de água de qualidade. Neste contexto, a proteção ao meio ambiente se torna mais importante a cada dia que passa (BRAGA et al., 2005; BICUDO et al., 2010; STELLATO, 2018).

Diversos agentes podem impactar a qualidade dos corpos hídricos, assim como, matéria orgânica e nutrientes, responsáveis pelo efeito da eutrofização. O excesso de poluentes orgânicos e inorgânicos induz a multiplicação de micro-organismos na superfície da água, gerando a proliferação de algas, e impedindo a penetração de luminosidade, ocasionando déficit de O₂. Logo, oferecem riscos à saúde, os nutrientes como o fósforo e nitrogênio, compostos inorgânicos como os metais tóxicos, e orgânicos como, agrotóxicos e produtos de uso comum como detergentes, cosméticos, descartes de indústrias e fármacos.

As fontes poluidoras podem se classificar em cargas pontuais, ou cargas difusas. No caso das cargas pontuais, em acidentes com derramamento da substância ou pela descarga de efluentes, e na carga difusa, pela lixiviação de produtos finais que contenham liberação dos compostos por defluência de áreas urbanas e rurais (TUCCI *et al.*, 2001; FERNANDES NETO e FERREIRA, 2007; SANTOS *et al.*, 2007).

As atividades industriais e o uso de novas substâncias são processos mais dinâmicos que a atuação da legislação, que não contempla a grande maioria dos compostos orgânicos lançados diariamente nos corpos d'água, muitos dos quais podem apresentar efeito tóxico aos seres humanos, sobretudo os classificados como interferentes endócrinos. Os interferentes endócrinos (IE) e os

poluentes orgânicos persistentes (POP_s) são classes de substâncias importantes e investigadas devido aos seus efeitos nos seres vivos e no meio ambiente. Essas classes de compostos são uma grande preocupação para a saúde pública, pois podem produzir efeitos adversos aos organismos expostos mesmo em concentrações de μg e ng L^{-1} (BILA e DEZOTTI, 2007).

Os interferentes endócrinos são substâncias químicas, sintetizadas ou naturais, que atuam sobre o sistema endócrino de seres humanos e animais, bloqueando ou interferindo no funcionamento das células (KAVLOCK et al., 1996; GOETTLICH, 2006).

No ser humano, o controle do metabolismo, crescimento e reprodução é feito através do sistema endócrino. Por ser um sistema bastante sensível e preciso, as glândulas secretam apenas a quantidade necessária de hormônios. Na fase embrionária, é onde há a principal atuação, agindo no sistema nervoso e imunológico. Quando por diversos fatores há alteração na produção de hormônios, é comum ocorrer o desequilíbrio no volume produzido e tempo de resposta, podendo ocasionar graves consequências ao indivíduo (USEPA, 1997; ISTAS, 2002; REIS FILHO, 2006).

Para o monitoramento dessas substâncias é necessário o desenvolvimento de técnicas analíticas, e a metodologia aplicada deve ser sensível e seletiva, a ponto de detectar limites baixíssimos. Para este trabalho de pesquisa, foi utilizada a técnica de cromatografia gasosa acoplada com a espectrometria de massas (GC/MS), que proporciona uma elevada seletividade, separação e identificação das substâncias em níveis de traço (RICHARDSON, 2009).

Neste contexto este estudo tem a intenção de examinar as consequências que um novo empreendimento pode ocasionar ambientalmente no entorno de sua instalação, considerando a preservação das águas superficiais e subterrâneas. Esta pesquisa tem como foco avaliar as características das águas superficiais e subterrâneas, quanto à compostos orgânicos considerados interferentes endócrinos, na área de influência de um novo empreendimento, o Reator Multipropósito Brasileiro (RMB), a ser instalado na área contígua ao Centro Experimental de Aramar do Centro Tecnológico da Marinha em São Paulo (CTMSP) localizado no município de Iperó, São Paulo. O RMB é um reator nuclear tipo piscina aberta com potência de 30 MW, onde serão realizadas pesquisas e

produção de radioisótopos. Este estudo é inédito e importante para a região, pois fornece orientação sobre o grau de contaminação dos corpos hídricos quanto às substâncias químicas estudadas, além de subsidiar o Plano de Monitoramento Químico Ambiental para obtenção da Licença de Operação do RMB. Será possível avaliar se a obra em si não oferecerá prejuízo ambiental, utilizando este estudo da região antes da construção do empreendimento e futuramente comparando os resultados com os obtidos nos monitoramentos durante a construção e após a finalização e operação do RMB.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo principal determinar 13 compostos orgânicos (Dietilftalato, Dibutilftalato, Cafeína, Nonilfenol, Bisfenol-A, Androstano, Estrona, Estradiol, Etinilestradiol, Progesterona, Coprostanol, Colesterol e Coletanol), considerados interferentes endócrinos e marcadores de atividade antrópica nos corpos d'água da área de instalação do RMB, a fim de auxiliar no Programa de Monitoramento Químico Ambiental.

2.2 Objetivos específicos

- i. Validação de metodologia para determinação dos interferentes endócrinos e marcadores de atividade antrópica por GC/MS para utilização nas amostras da área de estudo;
- ii. Revalidação dos parâmetros básicos necessários da metodologia para águas e utilização nas matrizes avaliadas;
- iii. Determinação dos compostos estudados por extração em fase sólida SPE e detecção por GC/MS em matriz de água superficial e água subterrânea da área do RMB;
- iv. Avaliação da área estudada antes do início das obras, quanto aos compostos estabelecidos nas matrizes de água superficial, água subterrânea e material em suspensão da coluna d'água.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Sistema endócrino

As funções do organismo são controladas pelo sistema endócrino, como diferenciação e maturidade sexual, antes do nascimento e na puberdade, respectivamente, e está ligado também ao metabolismo e excreção (JOHNSON et al., 2000).

Como pode ser observado na Figura 1, o sistema endócrino possui diversas glândulas ao longo do corpo humano, e é constituído por: hipotálamo, hipófise ou glândula pituitária, glândula tireoide, glândulas paratireoides, glândulas suprarrenais ou adrenais, glândula pineal, ilhotas de Langerhans (pâncreas endócrino) e gônadas. O hipotálamo é uma glândula hormonal, situada no centro do cérebro, onde controla o sistema neuro vegetativo, como o controle da hipófise e da glândula pituitária. São chamadas de glândulas endócrinas as que secretam os hormônios, sendo que essas substâncias operam em tecidos alvos ligando-se a receptores específicos.

Figura 1 . Representação das principais glândulas do sistema endócrino humano.

Fonte: modificada de Biologia II Apostila de Fisiologia IFCS USP.

Cada órgão apresenta funções e características centrais, sendo elas:

- Para o hipotálamo, a produção de hormônio antidiurético e regulador hormonal;
- Para a glândula pineal, a melatonina;
- Para a glândula paratireoide, o hormônio da paratireoide;
- Para glândula tireoide, a tiroxina, triiodotironina e calcitonina;
- Para o timo, as timosinas; para o rim, a eritropoietina, calcitriol e renina; para o pâncreas, a insulina e glucagon; para testículos, a testosterona;
- Para os ovários, os estrógenos e progesterona (IOMC, 2012).

3.2 Interferentes endócrinos (IEs)

No princípio, o termo utilizado para essa classe de substâncias era **disruptores endócrinos**, e assim foi denominado a partir da conferência de Wingspread realizada em 1991 nos Estados Unidos. A intenção desta conferência foi de reunir trabalhos que tratavam desse assunto, a fim de obter conclusões de como os disruptores endócrinos teriam ação no meio ambiente. Logo o assunto tomou proporções maiores devido à publicação, em 1996, da obra intitulada **O futuro roubado**, escrita por Theo Colborn, Dianne Dumanoski e John Myers (COLBORN et al., 2002; MATTHIESSEN, 2003; SOUZA, R.R., 2011).

Atualmente, para designar essa classe de compostos, são utilizados os termos **interferentes endócrinos** ou **desreguladores endócrinos** (GHISELLI e JARDIM, 2007; OTOMO, 2015; MARTINI, 2018).

Os IEs têm a capacidade de interferir na síntese, secreção, transporte, recepção, ação ou eliminação dos hormônios naturais do corpo. Essas ações são responsáveis pela manutenção da homeostase (preservação da constância interna), reprodução, desenvolvimento e comportamento (USEPA, 1997; REIS FILHO et al., 2006).

Os compostos orgânicos citados na literatura são amplamente aplicados pela sociedade moderna em diversos campos, sendo encontrados em produtos farmacêuticos, produtos de uso pessoal (por exemplo, as fragrâncias, shampoos, desodorantes, cremes), agrotóxicos, antioxidantes, plásticos, produtos industrializados, tensoativos entre outros, que acabam sendo dispostos no

ambiente por intermédio do lançamento de efluentes e esgotos clandestinos de atividades industriais. (LIBÂNIO, 2008).

Os efeitos desses interferentes na vida das pessoas já perduram por muitos anos, porém o estudo deste assunto ainda é considerado atual.

As principais atuações dos IEs são mimetizar e bloquear os hormônios endógenos. Com a ligação da substância ao receptor celular, este é entendido como um hormônio natural, sendo capaz de produzir uma resposta. Portanto, a função biológica pode ser afetada, e esse efeito chama-se agonista. Já o efeito antagonista, não resulta em resposta alguma, atuando como um bloqueador (LINTELMANN et al., 2003). Os IEs, por meio da mimetização, podem se conectar a alguns receptores, fazendo com que estímulos desnecessários sejam considerados, bloqueando as células e impossibilitando respostas certas. Devido a esse comportamento, algumas funções são afetadas, como o metabolismo, transporte e síntese (BIRKETT E LESTER, 2003). Na Figura 2 pode-se observar a ação de ligação nos IEs.

Figura 2 . Modo de ação dos interferentes endócrinos.

Fonte: Otomo, 2010, adaptado de Bila, 2003.

3.2.1 Fonte de entrada dos IEs no meio ambiente

É importante relatar que há inúmeras atividades que contribuem para que os IEs entrem em contato com o meio ambiente, assim como a influência de diversas atividades desenvolvidas pelo homem.

Há duas fontes que permitem esse contato, as fontes pontuais e as difusas. As fontes pontuais podem ser de fácil detecção, sendo possível o estabelecimento de controle adequado. Essas fontes estão basicamente disseminadas através dos cursos d'água, como o descarte inadequado de efluentes contendo essas substâncias. Já as fontes difusas apresentam dificuldade na sua identificação, por não apresentarem pontos de entradas característicos. O escoamento de água da chuva está fortemente ligado a essa fonte (GHISELLI & JARDIM, 2007; SODRÉ, 2007).

Conforme identificado por diversos autores, os hormônios como estrona, estradiol e etinilestradiol, podem ser excretados pelo corpo humano e estes podem entrar em contato com o meio ambiente por meio do descarte de efluente doméstico (SODRÉ, 2007). Na Figura 3, é apresentada uma ilustração do processo pelo qual os hormônios normalmente são disponibilizados no meio ambiente.

Figura 3 . Processo da exposição dos hormônios humanos ao meio ambiente.

Fonte: adaptado de Sodré, 2006.

3.2.2 Características dos Compostos Estudados

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 testes ecotoxicológicos, é importante também para compreender qual a causa das concentrações encontradas em diferentes compartimentos do ecossistema (ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006).

Há duas classes de substâncias onde os IEs podem ser associados. A classe natural, inclui hormônios naturais e vegetais, e a classe sintética, inclui hormônios sintéticos, representados pelos fármacos, produtos agrotóxicos e industriais (SOUZA, 2011). Na Figura 4 é apresentada a fórmula estrutural dos 13 compostos estudados nesta dissertação de mestrado.

Figura 4 . Fórmula estrutural dos compostos de interesse.

Os compostos apresentam diferentes aplicações essenciais e relevantes. O dietilftalato e dibutilftalato têm aplicações similares, como utilização em medicamentos e cosméticos. A entrada dos ftalatos no meio ambiente normalmente ocorre por meios industriais, como o descarte de efluentes não tratados (LOUREIRO, 2002).

Nonilfenol, utilizado em aditivos plásticos, detergentes, pesticidas, óleos lubrificantes, entre outros, tem como principal fonte de entrada no meio ambiente a degradação do nonilfenol etoxilado nas estações de tratamento de esgotos (OTOMO, 2015).

A cafeína pode ser aplicada na farmacologia e indústrias alimentícias, sendo a principal fonte de entrada no meio ambiente por meio do descarte de efluente doméstico e industrial (SALDANHA, 2012).

O bisfenol A é aplicado em resinas epóxi e policarbonato, seja para revestimento de latas, embalagens de fármacos, adesivos, entre outros. É possível que o bisfenol A entre em contato com o meio ambiente através acidentes, como derramamento da substância, ou pela descarga de efluentes industriais (OTOMO, 2015).

O androstano, estradiol, estrona e progesterona, são hormônios naturais, sendo encontrados no meio ambiente devido ao descarte de efluentes domésticos. O etinilestradiol é um hormônio sintético, sendo usado na composição de contraceptivos, e a entrada no meio ambiente se dá pelo descarte de efluente doméstico (OTOMO, 2015; CHAVES, 2016).

O coprostanol, colesterol e colestanol, são encontrados em esteroides naturais. O coprostanol e colestanol entram em contato com o meio ambiente por meio do descarte de efluente doméstico, e o colesterol além do descarte doméstico, também através do descarte pecuário (OLIVEIRA, 2012; OTOMO, 2015).

Normalmente as substâncias orgânicas consideradas interferentes endócrinos têm maior afinidade com sedimento, pois apresentam baixa solubilidade em água e coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow}$) elevado (BIRKETT e LESTER, 2003; SILVA, 2015; OTOMO, 2015). As características físico-químicas ajudam a entender o transporte dessas substâncias nos diferentes compartimentos

do meio ambiente e a probabilidade de acumulação destes em determinadas matrizes (BILA, 2005; REIS FILHO, et al., 2006; OTOMO, 2015).

Na Tabela 1 são apresentadas as propriedades físico-químicas dos compostos estudados neste trabalho.

Tabela 1. Características físico-químicas dos compostos estudados.

Composto	Peso Molecular (g mol⁻¹)	Solubilidade em água (mg L⁻¹)	Coefficiente de partição (log K_{ow})
Dietilftalato	222,24	1100 (T°C n.e.)	2,38
Nonilfenol	220,35	5,43 (20°C)	4,48
Cafeína	194,19	21600 (20°C)	-0,07
Dibutilftalato	278,34	11,2 (T°C n.e.)	4,45 ¹
Androstano	260,46	1,25×10 ⁻² (25°C)	6,65 ⁴
Bisfenol A	228,29	301 (T°C n.e.)	3,4
Estrona	270,37	30 (T°C n.e.)	3,13
Estradiol	272,38	3,6 (T°C n.e.)	4,01
Etinilestradiol	296,40	11,3 (T°C n.e.)	3,67
Progesterona	314,46	8,81 (25°C)	3,87
Coprostanol	388,67	3,4×10 ⁻⁴ (25°C)	6-8
Colesterol	386,65	4,13×10 ⁻⁴ (25°C)	8,74
Colestanol	388,67	3,4×10 ⁻⁴ (25°C)	8,82

n.e.= não especificada

Fonte: adaptado de OTOMO, 2015

3.2.3 Legislações sobre os interferentes endócrinos

O monitoramento ambiental vem ganhando força a fim de garantir a qualidade dos corpos d'água, porém a presença dos IEs vem sendo evidenciada há anos, e por diversos estudos, e ainda assim, essas substâncias não são

contempladas de forma efetiva nas legislações, tanto nacionais como internacionais.

Para as diretrizes ambientais dos corpos d'água do Brasil, o país segue as Resoluções nº 357 de 2005, e nº 397 de 2008, regulamentadas pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente . CONAMA. Já para o controle da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público, é seguida a Portaria nº 2914 de 2011, regulamentada pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2008; BRASIL, 2011; SOUZA, 2011). No Brasil, os compostos de estudo monitorados neste trabalho não possuem legislações que estabeleçam valores máximos permissíveis (VMP).

A legislação Canadense estabelece um valor máximo permitido de $19 \mu\text{g L}^{-1}$ para dibutilftalato e $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para nonilfenol em águas com classificação semelhante à classe 2 brasileiras (CCME, 2015).

A fim de ter em sua legislação valores que indiquem boa qualidade dos corpos d'água para todos os países membros, a União Europeia estabelece critérios de qualidade das águas brutas e tratadas publicadas na Diretiva Quadro da Água, porém o único composto estudado neste trabalho que é contemplado nessa legislação é o nonilfenol com valor de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (EC, 2008).

Já os Estados Unidos estabelecem para o nonilfenol o valor de $28 \mu\text{g L}^{-1}$ como critérios de concentração máxima e $6,6 \mu\text{g L}^{-1}$ como concentração contínua do critério (U.S. EPA, 2015; OTOMO, 2015).

Embora a legislação seja precária em relação aos compostos estudados, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), após realização em 2012 de um programa de *screening*, estabeleceu uma lista das substâncias potencialmente estrogênicas. Não é uma legislação, mas sim uma tentativa de identificar substâncias com potencial estrogênico que possam apresentar riscos para a biota. A União Europeia, por meio da Diretiva 2015/495 do Parlamento Europeu, estabeleceu uma lista de vigilância para o acompanhamento da União quanto à política da água. Nesta lista de vigilância europeia estão incluídos o etinilestradiol (EE2) com concentração máxima permitida de $0,035 \text{ ng L}^{-1}$, o estradiol (E2) com $0,4 \text{ ng L}^{-1}$ e a estrona (E1) com $3,6 \text{ ng L}^{-1}$ (EC, 2012; USEPA, 2012; MARTINI, 2018).

3.2.4 Outros estudos avaliando interferentes endócrinos

Há algum tempo os interferentes endócrinos passaram a ser estudados e o cuidado com esse assunto passou a ter grande importância. Bila & Dezotti (2003) estudaram fármacos no meio ambiente. Foi então destacado neste estudo o preocupante aumento de fármacos nos corpos d'água. Foi mencionado o desenvolvimento de técnicas analíticas cromatográficas a fim de identificar e quantificar estes compostos, para posteriormente serem estabelecidos limites considerados seguros para o descarte adequado de efluentes com esses compostos.

Ghiselli & Jardim (2006) fizeram um estudo sobre os interferentes endócrinos no meio ambiente. Concluíram que no meio aquático, o resultado da concentração de hormônios sexuais apresentava-se com valores fisiológicos, significando que esses resultados são muito próximos aos encontrados dentro do organismo.

Hao (2007) analisou produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal em matrizes ambientais, utilizando os equipamentos GC/MS e HPLC/MS. O estudo mostra que há a ocorrência do efeito da matriz, e que no futuro pudessem ser desenvolvidos métodos possíveis de minimizar a incerteza dos resultados.

Sodré e colaboradores (2007) estudaram a ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos presentes em águas superficiais da região metropolitana de Campinas, em São Paulo. O estudo constatou que devido ao aumento da densidade populacional da região, e ao péssimo cuidado com o tratamento de esgoto, foram observadas alterações na qualidade da água, tanto qualitativas como quantitativas.

Arditsoglou & Voutsas (2008) determinaram interferentes endócrinos, como compostos fenólicos e esteroides, em matrizes ambientais. Foi possível obter resultados eficientes e precisos na determinação simultânea dos compostos em amostras sólidas e aquosas, da região norte da Grécia.

Penteado (2008) apresenta um estudo didático sobre a cromatografia gasosa. O experimento apontado mostrou-se capaz de ser implantado facilmente em laboratórios de química, inclusive em laboratórios de graduação. Neste estudo

foi possível observar como a cromatografia gasosa se comporta, podendo ser aplicada na determinação de compostos em uma mistura.

Silva (2009) apresentou em sua tese um estudo de caso sobre interferentes endócrinos em amostras de água *in natura*, além de efluentes da estação de tratamento de esgoto. Este trabalho avaliou a qualidade da água da represa do Guarapiranga, a qual abastece uma parte da população presente na região metropolitana do estado de São Paulo. Avaliou também os efluentes da estação de tratamento de esgoto de Barueri, SP. Foi constatado pelas análises a não presença de estrógenos nos corpos d'água nesses dois sistemas.

Otomo (2010) desenvolveu e validou uma metodologia analítica capaz de determinar compostos orgânicos, na época chamados de disruptores endócrinos. Esse estudo foi realizado na região do Rio Paraíba do Sul, localizado no estado de São Paulo. Foi então estabelecida com o auxílio do guia Eurachem (2002), uma metodologia eficaz, com controle das incertezas, sendo futuramente adequada por Silva (2012) para o uso no trabalho desta dissertação. A metodologia de validação para a maioria dos compostos também se mostrou seletiva, linear, exata e precisa.

Bianco (2010) fez a revisão da literatura para o papel dos desreguladores endócrinos na fisiopatologia da endometriose. No trabalho foi concluído que os desreguladores endócrinos, como os ftalatos e estrógenos, são capazes de interagir com os receptores hormonais, podendo bloquear ou modificar a resposta do receptor, gerando mudanças no processo natural. Bianco também indicou outro problema devido à incerteza sobre o tempo entre a exposição e o efeito causado no organismo.

Fontanele (2010) mostrou um estudo sobre contaminantes ambientais e interferentes endócrinos. É informado no referido trabalho sobre o intuito da Convenção de Estocolmo (CE), no qual é necessário barrar e/ou controlar atividades onde haja procedimentos que produzam poluentes orgânicos persistentes, e em 2005, a CE foi declarada no Brasil. Ficou esclarecido também, que países ricos devam ajudar financeiramente países que não possuam recursos suficientes para colocar em prática essas ações. Logo, é necessário que a comunidade científica produza e reporte cada vez mais trabalhos sobre esses assuntos, com resultados cada vez mais confiáveis.

Peres (2011) realizou em sua dissertação de mestrado, um estudo sobre a remoção de compostos que também são estudados nesta dissertação, sendo eles, o etinilestradiol, estradiol e nonilfenol. A remoção foi realizada por adsorção em carvão ativado em pó, e a matriz foi de água de abastecimento público. O estudo concluiu a remoção desses 3 compostos de forma satisfatória, nas condições que foram estabelecidas para o trabalho.

Souza (2011) desenvolveu e validou uma metodologia analítica, a fim de determinar interferentes endócrinos em matrizes de água bruta e tratada. O estudo foi realizado na região do Rio Paraíba do Sul, situado no estado de São Paulo. O trabalho demonstrou metodologia eficaz para análise de compostos orgânicos, na faixa de concentração de $\mu\text{g L}^{-1}$, e resultados confiáveis obtidos por meio do processo de validação.

Oliveira (2012) desenvolveu e validou uma metodologia analítica para estudo de marcadores químicos em águas destinadas ao abastecimento público na região do rio Paraíba do Sul, em São Paulo. Este trabalho demonstrou uma metodologia qualificada para análise dos esteróis, coprostanol, colesterol e colestanol, os mesmos estudados nesta dissertação. Este estudo também demonstrou a importância da etapa de derivatização no processo da análise das amostras, deixando os compostos com sensibilidade elevada para melhor determinação no GC/MS.

Sodré (2012) fez um estudo sobre como os interferentes endócrinos estão relacionados a questões de saúde pública. Sodré apontou a fragilidade das políticas públicas e também o baixo investimento e cuidados com o saneamento básico. O fato de que o aumento populacional está se avançando a cada dia mais, também se torna um fator para a diminuição da qualidade da água. Um ponto preocupante é apontado quando concentrações de substâncias que interferem no sistema endócrino dos seres vivos, aparece nas estações de tratamento de água, logo também detectando essas concentrações, nas águas que são destinadas ao consumo humano.

Gonschorowski (2013) realizou a caracterização química de hormônios sexuais, como a estrona, estradiol, etinilestradiol e progesterona, os mesmos estudados neste trabalho, por meio de cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas. As amostras eram de águas de poços do IPEN, na

região da Universidade de São Paulo. Foi concluído que a qualidade das águas dos poços era satisfatória por não apresentarem concentrações destes compostos nas amostras.

Silva (2013) realizou um estudo sobre interferentes endócrinos. Foi apontada uma quantidade significativa na concentração de alguns compostos orgânicos, e o entendimento da dinâmica dos mesmos. Sendo assim, foi aconselhado um estudo mais aprofundado sobre os IEs, visto que eles podem trazer risco à saúde dos seres vivos.

Foi apontado no estudo o aumento da concentração de compostos orgânicos nas áreas de industrialização e urbanização. Com o meio ambiente cada vez mais contaminado, foi constatado a necessidade da presença de mecanismos regulatórios.

Otomo (2015) realizou um estudo de contribuição antrópica na qualidade das águas da represa do Guarapiranga. Foi realizado um estudo com 14 compostos considerados interferentes endócrinos e marcadores antrópicos. Por meio de resultados de validação, foi verificada a possibilidade de avaliar simultaneamente 14 compostos orgânicos. Foi demonstrado também que apesar de alguns compostos não estarem contemplados na legislação, podem ser considerados uma ameaça para a saúde ambiental pelo fato de apresentarem concentrações em todos os pontos de amostragem.

Pontelli & Nunes (2015) estudaram o impacto dos disruptores (interferentes) endócrinos na saúde humana, em relação a presença destes compostos nos corpos hídricos. Foram determinadas alterações no sistema endócrino do ser humano, associando estes interferentes com a obesidade, porém constataram que ainda são necessários outros estudos, a fim de preencher lacunas sobre quais são as outras consequências que podem ocorrer ao ser humano, devido a exposição a longo prazo.

Chaves (2016) determinou quatro compostos que são estudados nesta dissertação, sendo eles, bisfenol A, estrona, estradiol e etinilestradiol. O local de amostragem foi no rio Paraíba do Sul. O estudo concluiu que o desenvolvimento da metodologia foi adequado para determinação dos compostos. Chaves adverte que mesmo em baixas concentrações, a exposição destes compostos pode ser nociva,

não apenas ao corpo humano, como também ao desequilíbrio da vida aquática. Este estudo também indicou que em comparação a outros países, o Brasil ainda não possui leis regulamentadoras para descartes desses compostos, apontando assim, maior dificuldade no controle dessas concentrações nos corpos d'água.

Montagner (2017) apresentou um estudo sobre contaminantes emergentes em matrizes aquáticas no Brasil. Esta pesquisa também mencionou a consequência da exposição dos interferentes endócrinos ao corpo humano, resultando na capacidade de alteração das funções do sistema endócrino no organismo. Foi concluído que há diversos compostos diferentes apresentando concentrações de $\mu\text{g L}^{-1}$. Logo, apesar de apresentarem concentrações baixas, as consequências podem ser potencializadas devido a mistura de vários compostos em amostras complexas.

Bicudo & Bicudo junto com seus coautores (2017) em seu livro *100 anos da represa Guarapiranga: Lições e desafios*, fizeram uma série de estudos sobre a qualidade ecológica da represa, incluindo os IEs. Foi considerado que substâncias presentes nos corpos d'água e apontadas como nocivas à saúde estão relacionadas com a degradação ambiental, mesmo em concentrações baixas. Logo, estudos como estes trazem informações importantes sobre o local de abastecimento público para a região metropolitana de São Paulo.

Lima & Tonucci (2017) relataram em seu estudo a ocorrência e as técnicas de remoção para substâncias desregulares endócrinas e para os fármacos. Outros estudos mostram que no processo de cloração nas estações de tratamento, pode ocorrer a remoção dessas substâncias, mas ao mesmo tempo, a interação do cloro com o composto alvo, pode acarretar na formação de subprodutos, os quais ainda não se sabe ao certo sobre sua toxicidade.

Martini (2018) investigou a atividade estrogênica e o comportamento dos interferentes endócrinos em águas superficiais do estado de São Paulo. Neste trabalho foi apresentada também a caracterização química das amostras ambientais. Foi considerada a possibilidade de avaliação da atividade estrogênica de uma amostra, por meio da combinação de análises químicas e biológicas.

3.3 Ciclo hidrológico e qualidade da água

O ciclo natural da água é composto pela precipitação, evaporação, transpiração, infiltração, percolação e drenagem. O ciclo ocorre da mesma forma em todo globo terrestre, mas há diferença nos volumes de água gerados em diferentes partes do planeta Terra. A distribuição não acontece de forma homogênea, o consumo e os impactos também apresentam variações, pois não há a possibilidade de ocorrer um fluxo comum e contínuo (PIELOU, 1998; TUNDISI, 2006). Esses impactos estão associados às atividades como produção agrícola, abastecimento público, hidroelétrica, uso para recreação, pesca, transportes como navegação, entre outros (TUNDISI, 2006).

3.3.1 Características das águas subterrâneas e superficiais

Existem diferenças entre águas subterrâneas e águas superficiais, e para entender melhor, são descritas a seguir suas principais características.

Os corpos d'água subterrâneos possuem contato direto com o solo e rochas, apresentam pouca atividade biológica, baixa capacidade de depuração e baixa capacidade de suporte. Possuem recuperação lenta, e não estão diretamente ligados a preservação da vida aquática. Esses corpos d'água, por mais protegidos que estejam em relação a águas superficiais, também podem apresentar concentrações significativas de diversos tipos de poluentes.

As águas superficiais possuem diferentes usos, tanto para a preservação da vida aquática como usos diretos do corpo d'água para consumo humano, dessedentação de animais, irrigação e recreação. Apresentam alta capacidade de atividade biológica, alta capacidade de depuração e suporte. Após o controle do ciclo hidrológico, as recuperações de águas superficiais por autodepuração são relativamente rápidas (UMBUZEIRO, 2005).

3.4 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

A cromatografia é uma técnica de análise, que compreende a separação e quantificação de espécies químicas, e quando acoplada a um detector, torna-se possível a identificação dessas substâncias. Para esse trabalho o detector utilizado foi o espectrômetro de massas.

A separação dessas substâncias ocorre pelo comportamento dos analitos apresentados em duas fases, uma móvel e outra estacionária. A fase móvel desta técnica corresponde a um gás, recebendo assim o nome de cromatografia gasosa (CG), logo as soluções devem estar nesta mesma fase. Mesmo as amostras apresentadas na forma líquida, quando introduzidas no equipamento, transformam-se em gás (BONATO et al., 1995; OTOMO, 2010).

O cromatógrafo gasoso é composto pelo gás de arraste, um controlador de vazão, e reguladores de pressão. O sistema de injeção da amostra também incorpora o equipamento. Assim como, um forno que acomoda a coluna cromatográfica, um detector, e um registrador de dados (COLLINS et al., 2006; SOUZA, 2011).

Os gases de arraste (fase móvel) regularmente utilizados no equipamento são o hélio ou nitrogênio, por apresentarem características mais inertes. Esses gases devem ser compatíveis com o detector adotado, apresentar alto grau de pureza, e não devem interagir com a fase estacionária. Como a amostra estudada é carregada pelo gás de arraste, tais cuidados devem ser atendidos, a fim de evitar alterações nas análises. Através do material que compõe a coluna, podemos indicar a fase estacionária como líquida ou sólida. A composição líquida é mais comumente utilizada, e a sólida é mais indicada para separações apolares, e de baixa massa molecular (BONATO et al, 1995; COLLINS et al., 2006, OTOMO, 2010).

Na Figura 5 é apresentado o esquema do sistema de cromatografia gasosa.

Figura 5 . Esquema de um sistema cromatográfico constituído por: 1) gás de arraste, 2) controlador de vazão e regulador de pressão, 3) sistema de injeção da amostra, 4) coluna cromatográfica, 5) detector e 6) registrador.

Fonte: adaptado de COLLINS, 1997.

Para análises eficientes, os compostos estudados devem apresentar-se voláteis e termicamente estáveis. Caso a substância não atenda essa característica, uma etapa chamada derivatização deve ser aplicada. A derivatização consiste em modificar a estrutura da molécula tornando-a mais estável, a fim de possibilitar características compatíveis para com a análise no CG. Visto que, compostos que possuam o grupo hidroxila em sua estrutura molecular apresentam-se com baixa volatilidade. O mesmo ocorre com os grupos funcionais -COOH , -NH , e -SN . (CIOLA, 1985; COLLINS et al., 2006, ADAME, 2016). Na Figura 6 é demonstrado como ocorre o mecanismo da derivatização através do agente ativo N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida/trimetilclorosilano (BSTFA/TMCS).

Figura 6 . Mecanismo de derivatização.

Fonte: adaptado de SUPELCO, 2003.

As injeções das amostras no equipamento é uma etapa que requer atenção. A temperatura do injetor deve estar de acordo quanto ao estado físico da amostra para que a injeção seja absoluta e de rápida volatilização (LANÇAS, 1993; ADAME, 2016). Cromatogramas considerados bons apresentam seus picos bem separados e simétricos, como mostra a Figura 7.

Figura 7 . Modelo de cromatograma no registrador

Fonte: COLLINS, 1997.

A coluna cromatográfica tem papel importantíssimo, pois carrega a função da separação dos compostos analisados. É necessária atenção quanto a escolha da coluna, pois ela deve ser eficiente para o trabalho proposto, assim como a escolha do gás de arraste, e a composição do tubo onde a mesma será acomodada, podendo ser do tipo empacotada ou capilar. (LANÇAS, 1993; OTOMO, 2010).

O espectrômetro de massas (EM) funciona como um detector do sistema cromatográfico. A função deste é evidenciar a presença da substância e medir a quantidade do componente, ocorrendo assim a determinação e quantificação da análise (LANÇAS, 1993). A técnica de EM é baseada na produção de íons através da ionização causada nas moléculas das substâncias de estudo, visto que estes são separados pelo analisador quadrupolo em relação a razão massa/carga (m/z). A ionização por impacto de elétrons é a mais utilizada, fazendo com que as moléculas sejam bombardeadas por elétrons com energias de 70 eV, instabilizando e fragmentando-as (BUSTILLOS et al., 2003; TSIPI et al., 2015).

3.4.1 Extração em fase sólida - SPE

A extração em fase sólida (SPE) é uma das técnicas mais utilizadas para extração e concentração de compostos orgânicos em amostras aquosas. De acordo com a literatura podem ser utilizados discos, porém os cartuchos são mais comumente empregados. O de cartucho consiste de uma seringa de polipropileno preenchida com cerca de 50 a 500 mg de material absorvente, de 40 a 60 μ m de tamanho de partícula. É uma técnica de separação líquido-sólido com base nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão (RICHARDSON, 2009; BRITO, 2009; SOUZA, 2011; QUEIROZ, 2011; OLIVEIRA, 2012; GONSCHOROWSKI, 2013; SHIHOMATSU, 2015).

Os principais objetivos da técnica SPE são descritos a seguir (LANÇAS, 2004; BRITO, 2009; GONSCHOROWSKI, 2013).

- Concentração dos analitos: processo muito utilizado em amostras ambientais que tem o intuito de reduzir um grande volume de amostra aprisionando exclusivamente o analito de interesse que normalmente encontra-se em baixa concentração para posteriormente eluir com pequena quantidade de solvente em concentração bem maior que na solução original;

- Isolamento dos analitos: o foco é isolar o analito de interesse dos interferentes da matriz e normalmente é efetuado juntamente com o item anterior;
- Isolamento da matriz: neste caso o procedimento não é utilizado para concentração de amostras, mas para *clean-up*;
- Armazenamento de amostras: utilizado para análise de amostras quando o laboratório está a grande distância. Realiza-se a extração em campo ou em local próximo e armazena-se o cartucho a baixa temperatura para envio ao laboratório, com a vantagem de evitar o transporte de grande volume e maior tempo de preservação dos analitos de interesse na amostra.

O material absorvente a ser utilizado depende do analito que se quer separar e normalmente são considerados os mesmos critérios de seleção usados na escolha da fase estacionária na cromatografia líquida. Os critérios de seleção comumente utilizados são a estrutura química do analito, as propriedades do material absorvente e a composição da matriz da amostra (JARDIM, 2010).

Os cartuchos de SPE, de diferentes fabricantes, disponíveis no mercado possuem uma variedade de materiais absorventes e vasta gama de seletividade para atender as mais diversas aplicações. Entre os disponíveis, os cartuchos mais utilizados para extrair e concentrar composto orgânicos considerados interferentes endócrinos são o C₁₈, HLB Oasis® e o Strata™ X (LANÇAS, 2004; JARDIM, 2010; SOUZA, 2011; OLIVEIRA, 2012; SHIHOMATSU, 2015).

O material absorvente do cartucho C₁₈ é composto por uma cadeia alifática de 18 carbonos em suporte de sílica, denominado Octadecil. O grupo octadecilsilano (-C₁₈H₃₇) quimicamente ligado à sílica, possui caráter apolar, portanto a extração é de fase reversa, onde a fase estacionária (material absorvente) é menos polar que a fase móvel e os mecanismos de separação observados na SPE C₁₈ são adsorção e partição. Este tipo de material absorvente é recomendado para extração de uma gama de compostos orgânicos como ácidos graxos, glicerídeos, ésteres, esteroides, aminoácidos e HPAs (LANÇAS, 2004; CIOLA, 2006).

Nos cartuchos Oasis e Strata™ X, são utilizados copolímeros, também de fase reversa, para extração de analitos polares e não polares, com capacidade de adsorção de compostos lipofílico e hidrofílico simultaneamente, permitindo a

extração de compostos em um intervalo amplo de pH, portanto sem a necessidade de ajuste do pH da amostra (GROS, et al., 2006).

O recheio do cartucho Strata-X é um polímero de estireno-divinilbenzeno de superfície modificada, que possui capacidades superiores de ligação de hidrogênio e ligação π - π para maior retenção de analitos polares e aromáticos. Essa característica pode ser muito poderosa para aplicações que exigem extração simultânea de analitos polares e compostos não-polares. Strata-X é muito em extração de esteróis e fármacos (PHENOMENEX, 2018).

Na extração em fase sólida, é importante também a escolha da composição da fase móvel (solventes) e suas proporções a fim de se obter um rendimento eficiente. Para a seleção dos solventes ideais, é importante que sejam considerados alguns fatores como os descritos a seguir (CIOLA, 2006).

- Propriedades físico-químicas que não comprometam a solubilidade, a adsorção e a partição;
- Propriedades físicas que não afetem a capacidade de detecção;
- Propriedades que não impliquem na segurança como a toxicidade e inflamabilidade;
- Alto grau de pureza ou de fácil purificação;
- Capacidade de dissolver a amostra sem decompor seus componentes para que possa ser transportada pela fase estacionária (cartucho);
- Não decompor ou dissolver a fase estacionária;
- Ter baixa viscosidade, pois influi na transferência entre a fase estacionária e a fase móvel e na vazão;
- Ser compatível com o tipo de detector a ser utilizado;
- Possuir polaridade adequada para a separação dos componentes da amostra.

Os principais mecanismos de separação envolvidos na técnica de extração são a adsorção, a partição (fase normal ou reversa), a troca iônica e a exclusão por tamanho. Todos ligados a processos físico-químicos que agem durante a separação como forças iônicas, ligações de hidrogênio e interações do tipo dipolo (COLLINS et al., 2006; CIOLA, 2006; GROS, et al., 2006)

3.5 Validação da metodologia analítica para o material em suspensão

Validar um método consiste em dar confiabilidade aos resultados por meio de diversos parâmetros, portanto esta etapa é fundamental ao desenvolver ou adaptar uma metodologia. Como não existe um modelo específico a ser seguido, é necessário fazer adaptações coerentes para validar a metodologia estudada. É importante que o laboratório onde se realiza o ensaio atenda aos requisitos da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 (LEITE, 2002; VIM, 2012; INMETRO, 2016; 2017).

O Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), define validação como sendo: *“a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos”*. O VIM define como: *“a verificação na qual os requisitos especificados são adequados para o uso pretendido”*. (INMETRO, 2016)

Em análises químicas, sempre que os resultados são baseados em dados quantitativos, é importante comprovar a qualidade dos resultados, isto é, o quanto há de confiabilidade neles para cada propósito desejado. Na química analítica instrumental, a precisão de resultados obtidos por meio de um método específico tem alcançado grande importância. E assegurar a confiança em um resultado é necessário que haja rastreabilidade de medição (LANÇAS, 2004; LEITE, 2008; INMETRO, 2016; 2017).

A fim de se assegurar de que as características de desempenho do método atendam aos requisitos para as operações analíticas pretendidas, é necessário seguir uma série de parâmetros a serem avaliados para garantir a adequação do método ao uso pretendido. O analista deve definir os parâmetros de validação que seja mais adequado para concluir o procedimento de validação, e por meio de estudos estatísticos comparar resultados obtidos.

Neste trabalho os parâmetros estudados foram: Seletividade, Linearidade, Exatidão, Precisão, Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ), Recuperação e Cálculo de Incerteza. Todos os ensaios foram realizados conforme o documento do INMETRO DOQ-CGCRE-008 para validação da metodologia para matriz do material em suspensão e revalidação de alguns

parâmetros do método para determinação dos interferentes endócrinos em matriz de águas.

3.5.1 Seletividade

A seletividade corresponde à capacidade do método em quantificar o analito na presença de outros analitos, matrizes ou de outro material onde não haja a possibilidade de interferência na determinação. A interferência de uma matriz pode resultar em alterações, pois tais interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração. Em relação às espécies analisadas, o sinal de interesse deverá ser isento de interferências que possam prejudicar ou confundir sua identificação. Experimentos para avaliação da seletividade, normalmente, envolvem ensaios com padrões ou materiais de referência, amostras com e sem o analito, além da avaliação da capacidade de identificação do analito de interesse na presença de interferentes (LEITE, 2002; BRITO, 2009; INMETRO, 2016).

Normalmente são preparados dois grupos de amostras, um com a matriz e o outro sem (apenas no solvente), em que ambos os grupos tenham as mesmas concentrações do analito de interesse em cada nível de concentração a ser estudado. O número de amostras paralelas em cada nível de concentração deve ser maior ou igual a 6 (seis) para permitir o uso adequado dos modelos estatísticos e proporcionar uma comparação válida (BRITO, 2009; OTOMO, 2010; 2015; SOUZA, 2011; ADAME, 2016; INMETRO, 2016).

Inicialmente, aplica-se o teste F (*Snedecor*) para verificar a hipótese de que as variâncias das duas populações são iguais, isto é, homogeneidade das variâncias. E estabelece-se o nível de significância (α), normalmente $\alpha = 5\%$, que representa 95% de confiança e depois, calcula-se a variância de cada grupo. A variância é calculada pelo quadrado do desvio padrão para cada nível considerando o número de replicatas (n_1 e n_2) adotado. O F associado a $(n_1 - 1)$ graus de liberdade no numerador e $(n_2 - 1)$ graus de liberdade no denominador.

O valor de F é dado pela razão entre a maior e a menor variância, conforme equação 1.

$$F = \frac{\text{maior valor de variância} - s^2}{\text{menor valor variância} - s^2}$$

equação 1

Neste teste, o critério de avaliação é:

- se $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}} \rightarrow$ as variâncias são iguais e para este estudo, a matriz não tem efeito sobre o método na faixa de concentração considerada;
- se $F_{\text{calculado}} \geq F_{\text{tabelado}} \rightarrow$ as variâncias não são iguais ao nível de significância estabelecido e, para este estudo, a matriz tem efeito sobre o método e deve-se aplicar o teste t *Student* conforme a equação 2.

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

equação 2

Onde:

$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|$ = diferença da média das áreas obtidas nas 7 replicatas de uma concentração no ensaio com matriz e da média das áreas obtidas nas 7 replicatas sem matriz;

n_1 e n_2 = tamanho das amostras com e sem matriz;

S^2 = variância, calculada pela equação 3.

$$S^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

equação 3

Onde:

n_1 e n_2 = tamanhos do conjunto de amostras com e sem matriz.

O valor de $t_{\text{calculado}}$ é então comparado com o valor de t_{tabelado} , em nível de significância estabelecido e com $(n_1 + n_2 - 2)$ graus de liberdade.

- se $t_{\text{calculado}} \geq t_{\text{tabelado}} \rightarrow$ as médias não são iguais no nível de significância estabelecido, portanto a matriz tem efeito sobre o método;
- se $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}} \rightarrow$ as médias são iguais no nível de significância estabelecido e assim não há efeito matriz.

O número de graus de liberdade associado ao valor de t, que é a parte inteira do número ν , deve ser calculado de acordo com a equação 4:

$$\nu = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1 + 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2 + 1}} - 2 \quad \text{equação 4}$$

Onde:

ν = variância das replicatas nas soluções com e sem a matriz, respectivamente;

S_1^2 e S_2^2 = variância das replicatas nas soluções com e sem a matriz, respectivamente;

n_1 e n_2 = tamanho do conjunto de soluções com e sem a matriz, respectivamente.

A seletividade também pode ser avaliada aplicando-se o teste t *Student* para inclinação e paralelismo, e intercepto das retas com e sem matriz, de acordo com as equações equação 5 e equação 6.

$$t = \frac{b_1 - b_2}{\bar{S}_{xy} \sqrt{\frac{1}{\sum (x_{1i} - \bar{x})^2} + \frac{1}{\sum (x_{2i} - \bar{x})^2}}} \quad \text{equação 5}$$

Onde:

b_1 = coeficiente linear da equação da reta do ensaio com matriz;

b_2 = coeficiente linear da equação da rela do ensaio sem matriz.

$$t = \frac{a_1 - a_2}{\bar{S}_{xy} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{\bar{x}_1^2}{\sum (x_{1i} - \bar{x}_1)^2} + \frac{1}{n_2} + \frac{\bar{x}_2^2}{\sum (x_{2i} - \bar{x}_2)^2}}} \quad \text{equação 6}$$

Onde:

a_1 = coeficiente angular da equação da reta do ensaio com matriz;

a_2 = coeficiente angular da equação da rela do ensaio sem matriz.

Para ambas equações, 5 e 6, considera-se a a equação 7 para o cálculo de $\bar{S}_{xy}$.

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

equação 7

Onde:

S^2 = variância do conjunto de soluções com e sem matriz;

n_1 e n_2 = tamanhos do conjunto de amostras com e sem matriz.

3.5.2 Faixa de Trabalho e Faixa Linear

A Faixa de Trabalho consiste no intervalo de concentrações do analito, onde em um método quantitativo esse valor possa ser aplicado e seu resultado correspondido linearmente. Dentro da faixa de trabalho há dois limites que deverão ser observados, o limite superior e o limite inferior. Para o limite inferior, os valores apresentados serão os limites de detecção e quantificação, e já para o limite superior, os valores dependem do sistema de resposta do equipamento em questão (BRITO, 2009).

A Faixa Linear de Trabalho de um método consiste no intervalo entre os níveis de menor e maior concentração do analito. Para estudos de impacto ambiental, por exemplo, esse intervalo deve se empregar na faixa de aplicação. Se um resultado possuir concentrações muito baixas, é fundamental que os valores sejam diferentes dos brancos analisados, para expressar os resultados apurados próximos ao limite inferior (INMETRO, 2003; BRITO, 2009).

Na avaliação e determinação do parâmetro Linearidade foi considerado o coeficiente de determinação (r^2) das curvas analíticas (curva da matriz da amostra de água, matriz da amostra do material em suspensão e sem matriz), o teste t para a verificação do desvio da linearidade de cada ponto de concentração e a avaliação dos gráficos de distribuição espacial dos resíduos absolutos em função da concentração e em função da probabilidade normalizada de cada resíduo. Os dados utilizados nos cálculos estatísticos para verificação da linearidade foram os mesmos utilizados na avaliação do parâmetro seletividade.

3.5.3 Linearidade

A Linearidade representa a correlação da resposta obtida por sinais analíticos e a concentração do analito, e é determinada em um intervalo de concentração adequado. No eixo horizontal (eixo x) da curva, normalmente são expressas as concentrações do analito, e no eixo vertical (eixo y) o sinal do detector para cada concentração, sendo assim possível a determinação da correlação desses resultados. Este parâmetro possibilita que se mensure, por meio dessas curvas, um analito em uma matriz cuja concentração é desconhecida (LEITE, 2008; OTOMO, 2010; ADAME, 2016). Para obter a curva de calibração, são necessários no mínimo de 5 pontos de concentrações conhecidas, onde de 50% a 150% seja esperado encontrar de resultado na amostra (LANÇAS, 2004).

Para realizar os cálculos da concentração dos analitos, é utilizada uma relação matemática descrita pela equação da reta (equação 8), uma vez que a determinação dos mínimos quadrados se ajuste linearmente, o princípio é de que se obtenha uma curva onde a soma dos quadrados seja mínima.

$$y = ax + b \quad \text{equação 8}$$

Onde:

y = resposta medida ou sinal analítico (altura ou área do pico), variável dependente

x = concentração do analito, variável independente

a = inclinação da curva analítica (coeficiente angular)

b = interseção da curva com a ordenada, quando x = 0 (coeficiente linear)

Sujeitas a variações, as medições podem ser realizadas com estimativas em relação aos pontos duvidosos, por meio da análise de resíduos, aplicando-se o cálculo de t *Student*, utilizando a equação 9.

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\text{resíduo}}{s_r / \sqrt{n}} \quad \text{equação 9}$$

Onde:

resíduo = | x_{medido} - x_{calculado} |

S_r = desvio padrão dos resíduos

n = número de pontos da curva.

Para cada ponto da curva ou somente para os duvidosos, o valor de $t_{\text{calculado}}$ sendo menor ou igual ao valor de $t_{\text{unilateral}}$ com $(n - 1)$ graus de liberdade, considera-se que o ponto faz parte da curva, no intervalo de confiança desejado (normalmente 95%) e a faixa até ele é linear. Também podem ser utilizados os gráficos de distribuição espacial resíduos absolutos pela concentração e pela probabilidade normalizada de cada resíduo para avaliação de valores discrepantes (outliers) (BRITO, 2009; OTOMO, 2010; SOUZA, 2011; ADAME, 2016).

Para estimar a qualidade da curva de calibração, pode-se utilizar o coeficiente de determinação (r^2), que é o quadrado do coeficiente de Pearson. O coeficiente de Pearson, também chamado de coeficiente de correlação (r), expressa a relação entre x e y , e permite avaliar a qualidade da curva analítica. É estabelecido que quanto mais próximo de 1 o r^2 for, haverá menor a dispersão dos valores da curva em relação aos valores esperados para um comportamento linear.

O coeficiente de determinação indica a porcentagem de variação explicada ou o ajuste do modelo, portanto, se um modelo de regressão apresenta $r^2 = 0,95$, tem-se um modelo com coeficiente de determinação igual a 95%. O INMETRO recomenda para um coeficiente de determinação ser aceitável valores acima de 0,90, já a ANVISA recomenda que os valores deverão ser acima de 0,99 (INMETRO, 2003; RIBANI et al., 2004; BRITO, 2009; SOUZA, 2011; OTOMO, 2015).

A escolha da regressão pelo modelo linear e a verificação do ajuste em virtude dos valores experimentais da curva podem ser avaliados pela análise da variância (*Analysis Of Variance*, ANOVA). Calcula-se a porcentagem máxima de variação explicável para os dados experimentais e a porcentagem de variação explicada (r^2). A partir do teste F, verifica-se se a regressão é significativa e se há ou não evidência de falta de ajuste ao modelo linear obtido (BRITO, 2009; OTOMO, 2010; 2015; SOUZA, 2011; ADAME, 2016).

3.5.4 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O limite de detecção tem como definição o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado, desde que esse valor seja atestado com um

limite de confiabilidade através de um determinado procedimento. Conforme recomendado pela IUPAC, o valor deve ser associado a uma probabilidade, calculado na prática e ser correspondente a um valor de concentração que seja 3 vezes superior ao que foi medido no branco (LEITE, 2002). Para fins práticos, o limite de detecção com 95% ou 99% de confiança atende à maior parte das aplicações.

O LD pode ser calculado pela média das medidas de 7 replicatas da concentração mais baixa, mais o valor da abscissa t (*Student*) para $(n-1)$ graus de liberdade com 95% de confiança multiplicado pelo desvio padrão obtido para essa concentração, conforme a equação 10 (SOUZA, 2011; OTOMO, 2015; ADAME, 2016; INMETRO, 2016).

$$LDM = t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot (s)$$

equação 10

Onde:

$t_{(n-1, 1-\alpha)}$ = valor de t Student considerando 95% de confiança e 6 $(n-1)$ graus de liberdade

s = desvio padrão das replicatas

O limite de quantificação é representado pelo menor valor do analito que pode ser quantificado, apresentando confiabilidade na precisão e exatidão através de um equipamento analítico. Podem ser calculados pela média dos brancos das matrizes mais cinco vezes o desvio padrão dessas determinações. Quando o branco da matriz não apresentar valor de área suficiente para aplicação do cálculo, são consideradas as médias da menor concentração do analito (LEITE, 2009; BRITO, 2009; Souza, 2011; INMETRO, 2016).

3.5.5 Exatidão

A exatidão mede quanto um valor obtido experimentalmente é semelhante ao valor tido como verdadeiro. Para avaliação deste parâmetro é importante a utilização de material de referência, técnicas analíticas adequadas para cada tipo de análise, calibrações, e ensaios de recuperação; tudo levando em conta a exatidão dos resultados obtidos (LEITE, 2002; BRITO, 2009)

Este parâmetro normalmente é avaliado pelo índice z (z Score), o qual é calculado de acordo com a 11.

$$Z = \frac{(X_{\text{laboratório}} - X_{\text{verdadeiro}})}{S}$$

equação 11

Onde:

$X_{\text{laboratório}}$ = valor obtido pelo laboratório;

$X_{\text{verdadeiro}}$ = valor aceito como verdadeiro (concentração nominal definida para este ensaio);

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

O valor de z deve permanecer menor que 2 para que a exatidão do método seja considerada satisfatória e é considerado questionável, mas ainda aceitável, quando se encontra entre 2 e 3 (FURUSAWA, 2007; INMETRO, 2011).

3.5.6 Precisão

A precisão é a avaliação da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos em uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições pré-estabelecidas. Este parâmetro pode ser avaliado em termos de desvio. padrão (DP) ou coeficiente de variação (CV), limite de repetibilidade e limite de reprodutibilidade (BRITO, 2009; SOUZA, 2011; OTOMO, 2015; ADAME, 2016; INMETRO, 2016).

Na equação 12 é apresentado o cálculo do coeficiente de variação:

$$CV\% = \left(\frac{s}{\bar{x}} \right) \times 100$$

equação 12

Onde:

$\bar{x}$ = média aritmética das medições;

s = desvio padrão das medições;

Para este parâmetro também podem ser avaliados os valores de repetibilidade, reprodutibilidade e precisão média, sendo que quanto menor a amplitude de variação das medidas, maior a precisão do método (LEITE, 2002).

Repetitividade: representa a diferença máxima considerável entre duas repetições realizadas sob as mesmas condições, ou seja, indica a concordância dos resultados obtidos por medições contínuas. Tais medições devem apresentar as mesmas condições, sejam elas como a mesma amostra, o mesmo procedimento, o mesmo analista, mesmo local de trabalho, mesmo instrumento utilizado, mesmo ajuste, mesma calibração, e em um curto espaço de tempo. A avaliação dos resultados pode ser feita utilizando o cálculo do limite de repetitividade, r , conforme equação 13. O valor de r permite verificar se há diferença significativa entre as análises realizadas. Se a diferença entre valores das replicatas seja maior que r , algum valor deve ser descartado (OTOMO, 2010; OTOMO, 2015; ADAME, 2016; INMETRO, 2016).

$$r = 2,8 \cdot S_r$$

equação 13

Onde:

$t(n-1, 1-\alpha)$ = valor da estatística t de Student para $n-1$ graus de liberdade no intervalo de confiança estabelecido

S = desvio padrão para as n replicatas executadas.

Reprodutibilidade: representa a diferença máxima considerável entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas por analista, laboratório ou equipamentos diferentes e período estendido. Utilizando os valores de desvios padrão obtidos sob condições de reprodutibilidade é possível calcular o limite de reprodutibilidade (R) pela equação 14. Assim como para o limite de repetitividade, a diferença entre valores das replicatas não deve ser maior que o limite de reprodutibilidade (OTOMO, 2010; OTOMO, 2015; ADAME, 2016; INMETRO, 2016).

$$R = 2,8 \cdot \sqrt{S_R^2}$$

equação 14

Onde:

S_R^2 = variância de reprodutibilidade associada aos resultados de diferentes dias.

3.5.7 Recuperação

Quando uma amostra sofre um processo que altere seu estado inicial, como diluição, concentração, cristalização, etc, a mesma passa a apresentar perdas. Logo, para um valor apresentar resultados próximos da realidade, deve-se calcular os erros e as perdas no processo por meio do parâmetro recuperação (LEITE, 2002). Para realizar este estudo, é necessário que sejam adicionadas concentrações conhecidas de padrões ou materiais de referência para os compostos estudados, fortificação (spike) das amostras, antes do início do procedimento de análise (BRITO, 2009). É importante que sejam avaliadas as recuperações em pelo menos 3 níveis de concentração. Portanto, normalmente as adições são feitas com adição inicialmente próxima ao limite de detecção, a segunda adição próximo à concentração máxima da faixa de trabalho e a terceira adição próxima ao intervalo previsto de se encontrar os resultados para as amostras. Em geral, os procedimentos analíticos de validação têm a recuperação aceita na faixa de 70% a 120% para compostos orgânicos (LANÇAS, 2004).

Para realizar o cálculo da recuperação do analito utiliza-se a equação 15.

$$R(\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad \text{equação 15}$$

Onde:

C_1 = concentração determinada na amostra com adição de padrão;

C_2 = concentração determinada na amostra;

C_3 = concentração do padrão adicionado.

3.5.8 Cálculo de incerteza

O cálculo de incerteza tem papel fundamental na hora de reportar resultados, e conhecer todas as fontes de incertezas associadas é de responsabilidade do analista. Na química analítica esses cálculos são úteis a fim de fornecer precisão do que se obtém através de um método específico, portanto é de qualidade laboratorial minimizar os erros às medições.

No Guia Eurachem (2002) a incerteza de medição é definida como: *“Um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão que poderiam ser razoavelmente atribuídas ao mensurado”*.

As incertezas podem estar associadas a possíveis fontes, como: a pureza dos materiais de referência, o efeito/ interferência da matriz na amostra, as condições ambientais, os equipamentos laboratoriais, os métodos utilizados, entre outros (EURACHEM, 2000; GUIA EURACHEM, 2002).

A Incerteza Padronizada é referente a estimativa da incerteza total quando a mesma é definida individualmente como desvio padrão. A Incerteza Padrão Combinada se refere à incerteza total sob os resultados de uma medição, e pode ser obtida pela lei de propagação. Logo, cada componente de incerteza está associado a cada grandeza de entrada. E a Incerteza Expandida se refere ao fornecimento do intervalo mais provável com alto teor de confiabilidade. E segundo o Guia Eurachem (2002) a Incerteza Expandida está inserida no valor do mensurando, onde pode ser encontrado um intervalo mais provável e com alto nível de confiança.

Para cada fonte de incerteza associada a uma grandeza de entrada pode-se obter a Incerteza Padronizada (u), sendo do Tipo A (desvio padrão de medições sucessivas) ou do Tipo B (informada pelo fabricante). Para cada grandeza de entrada pode ser obtida a Incerteza Padronizada Combinada, u_c , por meio do cálculo da raiz quadrada da soma quadrática das incertezas a ela associada.

Na equação 16 pode-se observar um exemplo para o cálculo da incerteza associada à grandeza de entrada *“Massa (padrão)”* onde foram identificadas as seguintes fontes de incerteza: gráfico de controle da balança analítica (incertezas do Tipo A), calibração da balança (incertezas do Tipo B) e peso padrão (incertezas do Tipo B).

$$u_{\text{Massa Padrão}} = \sqrt{(u_{\text{gráfico controle}})^2 + (u_{\text{balança}})^2 + (u_{\text{peso padrão}})^2} \quad \text{equação 16}$$

Na equação 17 é apresentado um exemplo para o cálculo da incerteza associada à grandeza de entrada *“Volume”* onde foram identificadas as seguintes

fontes de incerteza: à informação do fabricante, repetições, variação de temperatura e coeficiente de dilatação do vidro.

$$u_{vol. bal\tilde{a}o} = \sqrt{(u_{repe})^2 + (u_{fabricante})^2 + (u_{\Delta t})^2 + (u_{coef. dilata\tilde{c}ao})^2} \quad \text{equa\tilde{c}ao 17}$$

É possível estimar as fontes de incertezas associadas a uma metodologia por meio de um diagrama de causa e efeito, estabelecendo as grandezas de entrada com o propósito de incluir todas as fontes nos cálculos.

Para incertezas associadas à solução padrão, as grandezas de entrada envolvidas no cálculo são referentes à preparação da solução, como a massa obtida pela balança, pureza do material de referência e ao volume do balão utilizado. Quanto aos balões volumétricos para diluição, consideram-se informações do fabricante, variações de temperatura do laboratório, e coeficiente de dilatação do vidro, são grandezas que estão associadas a incerteza deste.

Para o preparo das soluções de trabalho, o volume da pipeta e o volume dos balões estão envolvidos nas grandezas de entradas para as incertezas associadas. Para esses dois materiais utilizados, as informações fornecidas pelo fabricante devem ser consideradas. Assim como cada diluição realizada deve ser considerada nos cálculos.

A incerteza associada à resposta do equipamento é considerada no cálculo de incertezas quanto em relação à área obtida para cada composto nos cromatogramas. Para distribuição irregular, considera-se 95% de segurança e no cálculo a fim de que fiquem compreendidos os possíveis erros cometidos pelo equipamento e pelo analista durante o procedimento (OTOMO, 2010).

Para avaliar a incerteza combinada e expandida, são consideradas as incertezas de todas as fontes de entrada, conforme demonstrado na equação 18.

$$u(C) = C \sqrt{\left(\frac{u(C_x)}{C_x}\right)^2 + \left(\frac{u(V_f)}{V_f}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{amostra})}{V_{amostra}}\right)^2 + \left(\frac{u(R)}{R}\right)^2} \quad \text{equa\tilde{c}ao 18}$$

O cálculo da incerteza expandida do método deve representar a incerteza global do processo, portanto devem ser considerados os graus de liberdade efetivos (ν), e utilizá-lo para estabelecer o fator de abrangência (k) a ser multiplicado pela incerteza combinada, conforme apresentado na equação 19.

$$U = u_c \cdot k$$

equação 19

4 ÁREA DE ESTUDO

A região selecionada para a instalação do Reator Multipropósito Brasileiro, está localizada no município de Iperó, estado de São Paulo, em uma área considerada zona rural, de aproximadamente 2 milhões de metros quadrados, nas coordenadas 23° 23'33,5" Sul e 47° 37'12,4" Oeste, a 125 km da capital do estado, obtidas por UTM e corrigidas para o Sistema de Coordenadas Geográficas Datum WGS84.

O município de Iperó faz fronteira com as seguintes cidades: Boituva, Porto Feliz, Sorocaba, Araçoiaba da Serra, Capela do Alto e Tatuí, localizados dentro do estado de São Paulo em território brasileiro (Figura 8). Ocupando uma área de cerca de 200 hectares, o empreendimento encontra-se no planalto, aproximadamente 580 metros acima do nível do mar. Dos 200 hectares pertencentes ao RMB, 121 km foram cedidos à CNEN pelo Centro de Tecnologia da Marinha (CTMSP), sendo que os 79 hectares restante ainda se encontra em processo de desapropriação pelo Governo do Estado de São Paulo, para posterior disponibilização.

Figura 8 - Demarcação de Iperó e limites com demais municípios no estado e no Brasil.

Fonte: Adaptado de Google Earth, 2018.

As mais relevantes rodovias que ligam a cidade de São Paulo ao município de Iperó são a Raposo Tavares (SP 270) e a Castelo Branco (BR 374), sendo que a principal via de acesso ao RMB consiste na Estrada Municipal Bacaetava-Sorocaba. Também existe o caminho que liga Iperó a Campinas, onde as principais rodovias são a BR 374 e SP 079.

4.1 Reator Multipropósito Brasileiro É RMB

Para o projeto de construção foram seguidos os termos de referência exigidos pelo IBAMA, onde são estabelecidas diretrizes e especificações para elaboração de estudos ambientais para a fundamentação de grandes empreendimentos e análises de viabilidade ambiental (IBAMA, 2017). O Relatório de Impacto Ambiental (EIA/RIMA) foi preparado a partir do processo de licenciamento ambiental que começou em 2012. O EIA/RIMA do RMB foi analisado e aprovado pelo IBAMA, e com essa licença foi possível o início do projeto de infraestrutura para o empreendimento em todas as etapas para construção, e a permissão para o uso da água de um rio posicionado próximo ao local de necessidades operacionais industriais e água subterrânea para consumo humano (MRS, 2013).

A área do RMB está inserida na Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos Tiête/Sorocaba, UGRHI-10, (Tabela 2), e sua principal bacia é a do Médio-Sorocaba. O principal curso de água é o rio Sorocaba e os afluentes mais próximos ao empreendimento são o Ribeirão do Ferro e rio Ipanema.

Na Tabela 2 podem ser observados os dados referentes às sub-bacias da UGRHI-10.

Tabela 2 - Descrição das Sub-bacias e municípios integrantes da UGRHI . 10.

Sub-bacia	Área (Km ²)	Municípios
Média Tietê Superior	2.550	Araçariguama, Boituva, Cabreúva, Itu, Jumirim, Porto Feliz, São Roque, Tietê, Salto
Média Tietê Inferior	4.280	Anhembi, Bofete, Botucatu, Conchas, Pereiras, Porangaba, Torre de Pedra
Sub-total	6.830	
Alto Sorocaba	851	Ibiúna e Vargem Grande Paulista, Alumínio, Araçoiaba da Serra, Iperó, Mairinque
Sorocaba/ Pirajibu	1.309	Sorocaba, Votorantim
Baixo Sorocaba Ë SarapuÍ/ Pirapora - TatuÍ	3.109	Alambari, Capela do Alto, Cerquilha, Cesário Lange, Laranjal Paulista, Piedade, Salto de Pirapora, SarapuÍ, Quadra TatuÍ
Total	12.099	

A ocupação urbana predominante e mais próxima encontra-se no centro urbano de Iperó, localizada a noroeste do RMB. Porém, no entorno do empreendimento, são encontradas ocupações espaçadas, destacando o assentamento Ipanema . Floresta Nacional (FLONA) de Ipanema.

4.2 Floresta Nacional de Ipanema

A FLONA se refere a uma Unidade de Conservação e está aberta ao público desde 1998. Esta região é conservada e protegida pelo Instituto Chico Mendes (ICMBIO), distancia-se aproximadamente 800 metros do RMB, e é um dos poucos redutos florestais no interior da cidade de São Paulo.

Apesar de ser uma área protegida, é possível realizar atividades que envolvam a visitação, como caminhadas e trilhas, a fim de promover o interesse e divulgação sobre fatos históricos. As visitas costumam estar associadas a visitas aos monumentos do Sítio Histórico. O local também é utilizado para recreação, onde os visitantes ocupam-se na área de lazer, quiosques e playground (ICMBIO).

Os municípios que integram parte da área da FLONA são: Iperó, Araçoiaba da Serra e Capela do Alto, e os municípios que integram a Zona de Amortecimento são: Boituva, Iperó, Salto de Pirapora, Votorantim, Sorocaba, TatuÍ,

Sarapuí, Alambari e Porto Feliz, ilustrados na Figura 9. A zona de amortecimento é uma área ao redor de onde a unidade de conservação foi estabelecida. Esta zona tem como finalidade proteger e filtrar os possíveis impactos negativos que possam ocorrer naquela região (MRS, 2013).

Figura 9 - Áreas próximas a FLONA de Ipanema e Zona de amortecimento.

Fonte: modificada: ICMBIO

A FLONA foi criada dia 20 de maio de 1992 pelo Decreto Federal nº 530, e tem como objetivo preservar, resguardar, e restaurar os remanescentes de vegetação nativa de domínio da Mata Atlântica. Outros objetivos de preservação da FLONA de Ipanema são: proteger atributos naturais, históricos e culturais, a fim de ser referência promovendo integração socioambiental. No local pode ser encontrado variado testemunho histórico.

Na FLONA abrigam-se cerca de 69 espécies de mamíferos, 343 espécies de aves, 27 espécies de répteis, 36 espécies de anfíbios e 37 espécies de peixes. Devido à presença de diferentes tipos de animais, a região ganha importância por estar posicionada em uma zona de tensão ecológica (ICMBIO).

Outra importante unidade de Conservação próxima é a Área de proteção Ambiental do Tietê, a qual se encontra a 20 km do empreendimento. Porém a FLONA é a unidade de conservação mais próxima da região do RMB (EIA-RIMA, 2013).

4.3 Justificativa locacional

Não há problema em instalar reatores de pesquisas próximos a grandes centros urbanos, desde que sua potência o permita. De acordo com as especificações da Zona de Planejamento de Emergência . ZPE, a norma ANSI/ANS-15.16 . recomenda um raio de 800 m, ao entorno de empreendimentos do porte do RMB (entre 20 e 50 MW). Este domínio deve ser estabelecido dentro do sítio do empreendimento, para que não haja a extensão da ZPE, evitando assim que outras pessoas que não o público alvo tenha acesso à área.

4.3.1 Critério para instalação

- Possuir área suficiente para que a ZPE não ultrapasse o limite do sítio escolhido. No caso do RMB, o reator possui potência superior a 20 MW, logo o raio de 800 metros requer a extensão de 1.600 metros para cada extensão do sítio;
- O local deve estar próximo aos laboratórios de radiofármacos (IPEN/CNEN . SP), a fim de garantir a redução de perdas na atividade dos radioisótopos, devido ao seu decaimento radioativo acontecerá no decorrer do transporte;
- Rodovias de fácil acesso e aeroportos devem estar próximo ao local escolhido para envio de material radioativo, evitando assim diminuir ao máximo problemas no transporte;
- Boas condições de alcance aos pesquisadores de instituições nacionais para acesso às aplicações do RMB;
- O sítio deve estar próximo de centros de tecnologia e indústrias, a fim de simplificar técnicas e insumos ao reator.

4.3.2 Escolha da área do Centro Experimental de ARAMAR

A CNEN/ MCTI juntamente com o Centro Tecnológico da Marinha (CTMSP), estabeleceu o sítio do Centro Experimental de ARAMAR, em Iperó, São Paulo, como área de instalação do RMB, seguindo as principais condições:

- O sítio possui instalações nucleares que envolvem um reator nuclear de potência de teste para propulsão (LABGENE), e instalações do ciclo do combustível nuclear;
- Montagem do Laboratório de Geração de Energia Núcleo-Elétrica (LABGENE), para incluir operações conjuntas de inúmeros sistemas eletromecânicos, em escala 1:1;
- O sítio atende as extensões de seu terreno dentro da área necessária para ZPE, possuindo raio de 800 metros e fora da região densamente povoada;
- Para auxílio do licenciamento do empreendimento RMB, o sítio possui EIA/RIMA, licença ambiental, audiências públicas, e laboratórios de monitoração ambiental;
- Com a execução do licenciamento da LABGENE, há a facilidade também em aspectos de aprovação para o licenciamento nuclear;
- A comunidade local já aceita bem as instalações e atividades nucleares, devido ao programa de informação realizado pelo CTMSP;
- Possibilitando fácil acesso, o sítio de ARAMAR encontra-se próximo a Sorocaba, com boas rodovias e aeroporto em sua proximidade;
- Devido a localização da área do empreendimento ser próxima às cidades de Sorocaba, Campinas e São Paulo, o sítio garante acesso a centros tecnológicos, indústrias e centros universitários;
- Para facilitar o início da construção, o Centro Experimental de ARAMAR possui ótima infraestrutura, onde dispõe de energia elétrica, plano diretor, oficinas de apoio, arruamento interno, etc;
- O terreno possui extensa área desocupada para que no futuro sejam possíveis novas instalações para desenvolvimento de pesquisas na área nuclear;

4.3.3 Aspectos Econômicos, Sociais e Ambientais de Iperó

O domínio adotado em ARAMAR é parte de uma área nuclear já licenciada pelo IBAMA e também anteriormente estudada como possibilidade locacional. O local encontra-se a aproximadamente 110 km do IPEN, em São Paulo, lugar onde o CTMSP se originou, junto de estudos laboratoriais da tecnologia do enriquecimento isotópico de urânio, tecnologia de reatores, e instalações do ciclo do combustível.

Para o projeto de instalação em ARAMAR e justificativa ao RMB, foram seguidos alguns critérios e para a seleção de áreas potenciais foi importante ver a disponibilidade de universidades, centros de pesquisas e parques tecnológicos. Já para selecionar regiões potenciais, além do primeiro critério seguido, também foi aplicado o fator $\frac{1}{\text{distância}}$ para os centros de interesse, disponibilidade do espaço, terrenos, facilidade de acesso, etc. Para selecionar as sub-regiões potenciais, estudos que foram levados em conta foram: estudos demográficos, geológicos, hidrológicos, meteorológicos, sismológicos, fontes de energias e linhas de transmissão, localização de matérias primas, suprimentos, disponibilidade de transportes, disponibilidade de recursos hídricos, envolvimento e responsabilidade com os recursos naturais do local, mão de obra para o plano de planta industrial, disponibilidade de serviços municipais, atendimento diverso à população, uso do solo atual e esperado, gerando o total de 7 sub-regiões, sendo elas: Sub-região 1 . Tietê, Sub-região 2 . Boituva, Sub-região 3 . Iperó, Sub-região 4 . Sorocaba A e B, Sub-região 5 . Porto Feliz, Sub-região 6 . Indaiatuba, e Sub-região 7. Salto.

Ao verificar e avaliar as sub-regiões, ocorreu a exclusão das sub-regiões 2, 4A, 4B, 5 e 6, devido a avaliação desses locais quanto ocupação e uso do solo, recursos hídricos e elétricos, estado de conservação dos acessos, etc. A justificativa para essa exclusão foi a de apresentar seus entornos fortemente ocupados por sítios e chácaras, o que disporia de densidade populacional indesejável.

As sub-regiões 1, 3 e 7, foram analisadas pelos critérios de acessibilidade, custos de implantação em cada área, aspectos meteorológicos, hidrológicos, uso do solo e socioeconômicos. Logo, através de criteriosa análise, a

sub-região 3 . Iperó, foi escolhida como local ideal para instalação do empreendimento.

Para entender melhor como funcionará o empreendimento, a Figura 10 apresenta quais os itens foram discutidos no Escopo do Reator. O lado esquerdo retrata os %produtos+ da operação do RMB, evidenciando a produção de radioisótopos, irradiação e teste de combustíveis e materiais, e aplicações com feixes de nêutrons. O lado direito apresenta as %necessidades+para o programa, construção, licenciamento e operação do RMB. No centro o reator e sua infraestrutura física (EIA-RIMA, 2013).

Figura 10 . Características gerais do projeto do RMB.

Fonte: EIA-RIMA

4.3.4 Planta Geral do Empreendimento

Através do plano diretor apresentado na Figura 11, são apresentados os prédios previstos e as áreas de conservação e expansões futuras.

Figura 11 . Terrenos do sítio do RMB em ARAMAR, Iperó.

Fonte: EIA/RIMA

O sítio do empreendimento é composto por dois terrenos. O primeiro terreno contém 1,2 milhões de metros quadrados, e é uma fração do Centro Experimental de Aramar. O segundo terreno é constituído por pequenas propriedades particulares, onde em algumas delas são criados gados, e plantio de cana e milho. O segundo terreno foi relatado como área para desapropriação, e de acordo com o Estado de São Paulo, esse sítio será cedido à CNEN, gerando uma área total de 2,054 milhões de metros quadrados para o RMB (EIA-RIMA, 2013).

4.3.5 Áreas de Influência do RMB

Quando um novo empreendimento atua, o mesmo passa a interferir na sua área de instalação e em outras áreas, consideradas áreas de influência, sendo elas: Área Diretamente Afetada (ADA), Área de Influência Direta (AID), e Área de Influência Indireta (AII). Essas áreas passam muitas vezes por alterações ambientais, pois os limites estão relacionados diretamente com o empreendimento. Essas mudanças podem ser temporárias ou definitivas, podendo ser estabelecida previamente a suposição das causas e danos. Mas os impactos ocorridos nas áreas só podem ser avaliados após a previsão dos mesmos (FOGLIATTI *et al*, 2004).

Na Figura 12, é apresentado um esquema de como as áreas de influência estão relacionadas. (EIA-RIMA, 2013).

Figura 12 . Esquema de avaliação das áreas de Influência.

Fonte: EIA/RIMA (2013).

Para a definição das áreas de influência foram estabelecidas algumas informações:

Para estabelecer as áreas de estudos, avaliações prévias concluíram que essas áreas são passíveis de sofrer influências devido ao novo empreendimento;

Na extensão de terra onde será estabelecido o empreendimento ocorrerá impactos de forma indireta e direta, correspondente a Área de Influência Indireta, e a Área de Influência Direta, respectivamente, podendo modificar meios físicos, bióticos e socioeconômicos;

Área Diretamente Afetada é o local onde será a implantação do empreendimento;

Os municípios que estão totalmente ou parcialmente integrados a Área de Influência Indireta são: Araçoiaba da Serra, Boituva, Capela do Alto, Iperó, Porto Feliz, Sorocaba, Tatuí.

4.3.6 Topografia da área do RMB

A topografia é utilizada para descrever o local apontado para construção do RMB. O território encontra-se em platô, e sua área é caracterizada por vales e montanhas, encontrando-se a 580 metros acima do nível do mar. No entorno do empreendimento, Iperó, Capela do Alto e Araçoiaba da Serra, são os municípios que apresentam as maiores altitudes, enquanto as menores são encontradas pela região dos rios Sorocaba e Ipanema. Na Figura 13 pode ser observada a visão aérea do mapa onde indica a topografia da área de implantação do RMB (EIA-RIMA, 2013).

Figura 13 . Topografia da área de implantação do reator.

Fonte: EIA/RIMA (2013)

4.4 Clima da região do RMB

Iperó possui latitude de 23°12'q longitude 47°24'q e altitude de 580 metros. Definido como verão quente e segundo a classificação de Köppen, o clima na região de Iperó é caracterizado como clima temperado subtropical úmido. E as estações de verão e inverno são bem definidas, possuindo temperatura média do mês mais quente sendo superior a 22 °C. Pela Tabela 3, pode-se entender melhor

o clima da região, com informações sobre a temperatura do ar e precipitação no município.

Tabela 3 . Temperatura do ar e precipitação da chuva em Iperó, SP CEPAGRI/ UNICAMP).

Mês	Temperatura do ar			Chuva (mm)
	Mínima média	Máxima média	Média	
JANEIRO	18.6	29.9	24.2	226.4
FEVEIRO	18.8	30.0	24.4	165.0
MARÇO	18.0	29.6	23.8	141.0
ABRIL	15.3	27.6	21.4	58.8
MAIO	12.6	25.5	19.0	69.5
JUNHO	11.0	24.3	17.7	56.1
JULHO	10.4	24.5	17.5	39.2
AGOSTO	11.7	26.5	19.1	36.0
SETEMBRO	13.7	27.3	20.5	74.0
OUTUBRO	15.4	28.1	21.7	116.0
NOVEMBRO	16.4	28.9	22.6	116.3
DEZEMBRO	17.8	29.0	23.4	190.3
ANO	15.0	27.6	21.3	1288.6
MÍNIMA	10.4	24.3	17.5	36.0
MÁXIMA	18.8	30.0	24.4	226.4

4.4.1 Meio Físico

Na Figura 14 é apresentado o limite da área diretamente afetada (ADA), caracterizando quebras positivas no relevo. As quebras positivas estão associadas a maiores cotas do terreno, alinham serras e montes. Já as quebras negativas também caracterizadas no estudo cartográfico, requer maior atenção, pois podem expor regiões de vales e menores cotas e depressões topográficas. A topografia da região é importante para se entender o curso das águas.

Figura 14 . Limite e quebras de relevo da ADA na área de construção do RMB.

Fonte: EIA-RIMA, 2013.

As zonas homólogas apresentadas na Figura 15 foram situadas por algumas características apresentadas a seguir. A zona homóloga 1 foi definida nas altitudes superiores inseridas na área diretamente afetada devido à ausência de rios, e ausência de áreas consideradas de atividade antrópica. Já a zona homóloga 2, está inserida em uma região de cotas topográficas menores, onde nelas se encontram a presença de rios e vegetações. (EIA-RIMA, 2013).

Figura 15 - Limite e zonas homogêneas da ADA na área de construção do RMB.

Fonte: SMA, 2013.

4.4.2 Meio Biótico

Para entender o meio biótico, três etapas foram concluídas para o levantamento de dados no processo de diagnóstico ambiental. A primeira etapa consistiu em um levantamento de dados, contendo as seguintes informações:

- A cobertura vegetal apresentada descreve e mapeia as espécies arbóreas e identifica as fitofisionomias, tanto de interesses ecológicos, como econômico e científico;
- A respeito do estado de conservação da comunidade, é descrita e apresentada à fauna de vertebrados terrestres e aquáticos;
- Associação entre fauna e flora, e determinação de espécies em risco;
- Indicação de espécies bioindicadoras de radionuclídeos.

A segunda etapa consistiu na coleta de dados para aquisição de informações, pelo período de 23 a 28/04/2012 e 17 a 20/09/2012. A primeira coleta foi realizada em estação chuvosa, e a segunda em estação seca.

Com a consolidação de todos os dados adquiridos nas duas primeiras etapas, foi obtido o diagnóstico da fauna e flora do local, e apresentada a caracterização de todas as unidades de conservação a uma distância de 3 km do empreendimento, encerrando assim a terceira e última etapa (EIA-RIMA, 2013).

4.4.3 Hidrologia

O IBGE e a Agência Nacional de Águas (ANA) são responsáveis pela divisão das bacias hidrográficas. No estado de São Paulo, as bacias pertencem à Bacia Hidrográfica do Rio Paraná ou do Atlântico Sul-Leste e Atlântico Sudeste.

Atualmente essa divisão consiste em 22 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHs). Pelo artigo 20 da Lei Estadual 7663 de 30/12/1991, as UGRHs têm pelas quais a constituição de unidades territoriais, sendo normalmente formadas por parcelas de bacias hidrográficas ou pelo conjunto delas.

A Bacia Hidrográfica do Rio Sorocaba está contida na Área de Influência Indireta do RMB, e para o empreendimento, a UGRHI de referência é a 10, Sorocaba/ Médio Tietê (EIA/RIMA, 2013). O rio Sorocaba é o afluente mais importante da margem do médio Tietê, drenado de uma área de 5269 m², com trecho superior no Planalto Atlântico. É constituído pelos rios Sorocabuçu e Sorocamirim, onde suas nascentes se encontram em Ibiúna, Cotia, Vargem Grande Paulista e São Roque (SIGRH, 2016). As águas e afluentes do Rio Sorocaba são utilizados na área de irrigação, resfriamento de caldeiras, como matéria-prima e como diluidor de despejos. Todos os usos provocam carga poluidora no rio (FERNANDES, 2012).

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Equipamentos e materiais

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Cromatógrafo a gás, *Shimadzu* . GC 2010 Plus, acoplado ao detector de espectrometria de massas, *Shimadzu* - QP 2010 SE; microprocessador de dados equipado com o programa GCMS Solution, *Shimadzu* (Figura 16).

Figura 16 - Cromatógrafo gasoso (A) acoplado a um espectrômetro de massas (B).

Fonte: a autora

- Sistema de filtração *Sartorius* a vácuo (Figura 17).

Figura 17 - Sistema de filtração a vácuo com membranas filtrantes em PTFE de 0,45 μm .

Fonte: a autora

- Sistema de extração em fase sólida, desenvolvido nos laboratórios do CQMA, e sistema de extração do particulado sólido (Figura 18).

Figura 18 - Sistema de extração em fase sólida.

Fonte: a autora

- Ultrassom . sistema de extração das membranas (Figura 19).

Figura 19 . Banho de ultrassom.

Fonte: autora.

- Rotoevaporador . sistema de evaporação do solvente (Figura 20).

Figura 20 . Rotoevaporador.

Fonte: autora.

- Outros equipamentos

Alguns equipamentos de uso comum em laboratórios também foram utilizados para a realização do procedimento, sendo:

- Equipamento de purificação de Água - Osmose reversa, ELIX 3, Millipore;
- Equipamento de purificação de Água . Gehaka, MASTER P&D;
- Balança analítica OHAUS, PA214CP;
- Compressor/Aspirador FANEM, Dia Pump (089-CAL);
- Centrífuga de bancada, Nova Técnica, NT 810.
- Pipetas EPPENDORF, 100 a 1000 μ L, 10 a 100 μ L e 20 a 200 μ L;
- Vidrarias básicas de laboratório;

Foram utilizados dois tipos de cartuchos de extração em fase sólida (SPE):

- Cartuchos C-18 (octadecyl), das marcas Phenomenex e Supelco, para todos os ensaios de validação e quantificação;
- Cartucho Strata-X (styrene divinylbenzene), da marca Phenomenex, utilizado para estudo de otimização da metodologia apenas.

5.2 Reagentes e Soluções

Todos os reagentes e solventes utilizados são de grau analítico, cromatográfico ou compatível. Padrões analíticos foram utilizados para a confecção das curvas analíticas e desenvolvimento da metodologia e possuem certificados de pureza de procedência *Aldrich Chemical Co.* As soluções padrões estoque foram preparadas em meio metanol, mantidas sob refrigeração e ausência de luz.

- Água ultrapura (tipo 1) de baixa condutância;
- Metanol (MeOH), Diclorometano (DCM), Acetona, Hexano e Acetonitrila;
- Padrões de referência com certificado dos compostos: Dietilftalato, Dibutilftalato, Nonilfenol, Bisfenol-A, Androstano, Estrona, Estradiol, Etinilestradiol, Progesterona, Coprostanol, Colesterol e Coletanol;
- Solução de Nitro Sulfônica;

- Ácido clorídrico.

5.3 Amostragem

As amostras de água superficial e subterrânea foram coletadas no entorno da área de construção do RMB, na região da cidade de Iperó, interior de São Paulo. As coletas foram realizadas por uma equipe, constituída de funcionários e alunos do IPEN, CDTN e coordenada pelo IRD.

A seleção dos pontos de amostragem foi estabelecida de acordo com os critérios Programa de Monitoração Radiológica Ambiental Pré-Operacional do RMB-PMRA (CNEN, 2012). Foram utilizados 10 pontos de amostragem, sendo 6 pontos de águas superficiais e 4 pontos de águas subterrâneas.

Na Tabela 4 é apresentado um resumo dos pontos com a identificação do local da amostra (identificação antiga/inicial), a identificação nova (código do ponto no projeto), as coordenadas geográficas (UTM) e a referência padrão do local da coleta.

Tabela 4 . Identificação dos pontos de coleta na área do RMB.

Tipo	Código do ponto no projeto	Identificação do local da amostra	Localização	Coordenadas Geográficas Datum WGS84
Água de Superfície	001RMB	PC2	Ribeirão do Ferro, a montante do empreendimento	23°24'17.49"S 47°37'30.19"W
	002RMB	P6	Ribeirão do Ferro, a jusante do empreendimento	23°23'18.71"S 47°37'0.93"W
	003RMB	P8	Rio Sorocaba, a montante do ponto de descarga do ribeirão do Ferro	23°21'55.76"S 47°36'54.27"W
	004RMB	P7	Rio Sorocaba, a jusante do ponto de descarga do ribeirão do Ferro, depois do rio Ipanema	23°21'39.40"S 47°36'1.05"W
	005RMB	LAGO	Fazenda São Benedito (Lago)	23°22'00.03"S 47°37'24.43"W
	006RMB	IBAMA	Nascente Córrego Ibama	23°23'25.00"S 47°37'30.59"W
Água Subterrânea	007RMB	PC3-120m	Ponto de Controle a montante do empreendimento, Fazenda Ipanema - Poço Lago ($\pm 120m$)	23°25'40.78"S 47°35'51.46"W
	008RMB	PC3-130m	Ponto de Controle a montante do empreendimento, Fazenda Ipanema - Poço Viveiros ($\pm 130m$)	23°25'36.55"S 47°35'59.03"W
	009RMB	P9	Fazenda São Benedito - a jusante do empreendimento	23°22'8.56"S 47°37'22.05"W
	010RMB	SABESP	Entrada de água na SABESP/ Sarapuí	23°38'35.76"S 47°49'40.47"W

Na Figura 21 pode ser observado um mapeamento com a localização dos 10 pontos de amostragem na área de estudo. Em destaque o ponto 010RMB (SABESP), o ponto de coleta mais distante do empreendimento, que é um ponto de controle do Programa de Monitoração Radiológica Ambiental Pré-Operacional do RMB-PMRA (CNEN, 2012).

Figura 21 . Mapeamento dos pontos de amostragem.

Fonte: Google Imagens.

5.3.1 Características dos pontos de coleta

A seguir é apresentada uma breve descrição dos pontos e suas principais características.

5.3.1.1 Águas Superficiais

O ponto PC2 (001RMB) está localizado no Ribeirão do Ferro, a montante do empreendimento. Esta região apresenta-se com vasta vegetação, e proximidades a algumas residências. Os tráfegos de carros pelas ruas de terra são frequentes, porém não são intensos. Na Figura 22, é possível observar o ponto de coleta isolado dentro da mata.

Figura 22 . Fotos da área de amostragem do ponto PC2 (001RMB)

Fonte: a autora.

O ponto P6 (002RMB) está localizado no Ribeirão do Ferro, a jusante do empreendimento. Esta região já apresenta proximidade de estradas com intensos tráfegos de carros. Também é um ponto cercado por mata densa, como pode ser observado na Figura 23, porém não tão isolado como no ponto PC2.

Figura 23 . Fotos da área de amostragem do ponto P6 (002RMB)

Fonte: a autora.

O ponto P8 (003RMB), apresentado na Figura 24, está localizado no rio Sorocaba, a montante do ponto de descarga do Ribeirão do Ferro. Esta região apresenta proximidade com plantações, principalmente de cana, laranja e milho. É possível encontrar com facilidade fezes de animais, como a capivara, e diferentes tipos de lixos em toda extensão deste ponto, ocasionando a presença de um mau cheiro e uma coloração mais escura para a água.

Figura 24 . Fotos da área de amostragem do ponto P8 (003RMB)

Fonte: a autora.

O ponto P7 (004RMB), apresentado na Figura 25, está localizado no rio Sorocaba, a jusante do ponto de descarga do rio Ribeirão do Ferro. Esta região apresenta-se com vasta área de pastagem e algumas residências em seu entorno. Veículos e animais domésticos, como cães, também são encontrados com facilidade nessa área.

Figura 25 . Fotos da área de amostragem do ponto P7 (004RMB)

Fonte: a autora.

O ponto LAGO (005RMB) está localizado no lago da Fazenda São Benedito e apenas a equipe do IRD teve acesso à área durante as campanhas.

O ponto IBAMA (006RMB), mais precisamente a Nascente do Córrego IBAMA, apresentado na Figura 26, está localizado próximo à área do RMB, é cercado por vegetação e pastagem, fica muito próximo a estradas de terra, sem residências no entorno.

Figura 26 . Fotos da área de amostragem do ponto IBAMA (006RMB)

Fonte: a autora.

5.3.1.2 Águas subterrâneas

O ponto PC3-120m (007RMB), apresentado na Figura 27, está localizado dentro da fazenda da Floresta Nacional Ipanema (FLONA), muito próximo ao lago. Esta água subterrânea vem de um poço com aproximadamente 120 m de profundidade e a água é captada por meio de bombas.

Figura 27 . Fotos da área de amostragem do ponto PC3-120m (007RMB)

Fonte: STELATTO, 2017.

A água do ponto PC3-130m (008RMB), cuja área é apresentada na Figura 28, também conhecido como VIVEIRO, é um poço de aproximadamente 130 m de profundidade, fica dentro da fazenda da FLONA e possui cultivo de hortaliças no local de coleta.

Figura 28 . Fotos da área de amostragem do ponto PC3-VIVEIRO 130 (008 RMB)

Fonte: STELATTO, 2017.

O ponto P9 (009RMB) está localizado na Fazenda São Benedito, a jusante do empreendimento e apenas a equipe do IRD teve acesso à área durante as campanhas.

E o ponto SABESP (010RMB), localizado na cidade de Sarapuí, que é abastecido pelo lençol freático. Este ponto de controle trata-se da entrada de água abastecimento da cidade, sendo o local de amostragem que apresenta a maior distância do empreendimento.

5.4 Coleta e preservação de amostras

Conforme já citado anteriormente, o procedimento de coleta e a determinação dos parâmetros de campo foram realizados com auxílio da equipe do IRD e do CDTN. Os parâmetros físico químicos medidos em campo são parte integrante do Programa de Monitoração Radiológica Ambiental - Fase: Pré-Operacional . Reator Multipropósito Brasileiro . RMB, coordenado pela Dra. Sueli da Silva Peres do IRD.

Para as amostras de água para determinação dos interferentes endócrinos e marcadores antrópicos avaliados nesta dissertação de mestrado, foram seguidas as diretrizes do Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras da ANA/CETESB (ANA/CETESB, 2011).

Foram utilizados frascos de vidro âmbar, previamente descontaminados para acondicionamento de amostras para análise de orgânicos, onde foram conservadas por refrigeração em prazo pré-estabelecido para a realização das análises.

5.5 Metodologia para determinação dos compostos estudados em matriz de águas

A parte experimental deste trabalho consiste em etapas que iniciam com a preparação das amostras de água e do material em suspensão, e finaliza com a análise das amostras no equipamento e interpretação dos dados gerados.

O desenvolvimento da metodologia para determinação dos compostos estudados em matriz de água, bem como sua validação foi realizado por Otomo (2015). Neste trabalho de mestrado foram revalidados os parâmetros: linearidade, exatidão e precisão.

Na Figura 29 é apresentado um fluxograma de todas as etapas para a determinação dos compostos estudados nas matrizes de água.

Figura 29 - Fluxograma do procedimento de preparação da amostra de água.

Fonte: autora

Na primeira etapa da preparação das amostras é feita a filtração a vácuo, utilizando membranas PTFE de 0,45µm. O pH foi ajustado para 3 com HCl diluído antes de realizar a extração em fase sólida (SPE).

Os cartuchos de SPE foram previamente condicionados com 5 mL de MeOH e em seguida, 5 mL da mistura de MeOH/Água ultrapura a pH 3 na proporção de 1:9 v/v, deixando a solução em contato com o recheio do cartucho

por 2 minutos, para que se faça a ativação do material adsorvente. Nesta etapa é importante que não se deixe passar todo o solvente de uma vez, evitando que esse material seque.

A percolação de uma alíquota de um litro da amostra foi realizada em fluxo de aproximadamente 5 mL min^{-1} , para que as substâncias de interesse da amostra pudessem ser adsorvidas neste processo, pelo material de preenchimento do cartucho. Ao final desta etapa, o cartucho é submetido a um *Clean Up*, utilizando 5 mL da mistura de MeOH/Água ultrapura na proporção de 1:9 v/v, para eliminação de algum possível composto que não seja o de interesse. Em seguida, o cartucho foi centrifugado por 25 minutos a 2500 rpm para eliminação da água residual.

A eluição foi feita duas vezes com 5 mL da mistura de DCM/MeOH na proporção de 6:4 v/v, inicialmente deixando o solvente em contato com o material de recheio do cartucho por 2 minutos com a solução extratora e facilitar a extração dos compostos retidos no cartucho. O extrato sendo recolhido foi transferido para um frasco (vial), aonde foi seco em fluxo suave de N_2 ($< 30 \text{ mL min}^{-1}$). Em seguida, a amostra foi submetida a etapa de derivatização.

Ao vial com o extrato seco foram adicionados 100 μL do agente derivatizante BSTFA/TMCS (99:1) e levado à estufa durante 30 minutos a 100°C . A amostra foi retomada a 1 mL, com adição de DCM. Todo o processo acarreta uma concentração com redução do volume em mil vezes. Por fim, foi feita a injeção da solução final no GCMS no método estabelecido.

5.5.1 Estudos para a otimização da metodologia

Diferentes trabalhos na literatura reportam a eficiência de cartuchos específicos para a determinação de hormônios e esteróis (GHISELLI, 2006; OTOMO, 2015; SHIHOMATSU, 2015).

Neste trabalho, foi avaliada a eficiência dos cartuchos Strata C_{18} e Strata X na determinação dos compostos estudados visando um melhor desempenho do método proposto, visto que o Strata X é um cartucho mais indicado para extração de hormônios e estrógenos, conforme já comentado no item 3.4.1 desta dissertação de mestrado.

O procedimento de preparação da amostra de água para o estudo da otimização da metodologia foi realizado com base no fluxograma da Figura 29, porém com duas diferenças, a fortificação da amostra e o volume de amostra de 500 mL invés de 1 L originalmente.

Para avaliação da eficiência dos cartuchos, foram percoladas alíquotas de 500 mL de amostra de água, fortificadas com concentração conhecida dos padrões dos compostos de estudo. Iniciando pelo do cartucho Strata X. Em seguida, o eluato da amostra já percolada, foi novamente percolado pelo cartucho Strata C₁₈ o qual já é uma metodologia consagrada e validada, utilizando-se o mesmo procedimento de extração. Os resultados foram avaliados a fim de determinar os compostos que não foram totalmente adsorvidos pela Strata X, os quais foram retidos pelo C₁₈.

Foram feitas modificações na metodologia cromatográfica, nos parâmetros do espectrômetro de massas, com acerto dos intervalos de monitoramento SIM para determinação dos compostos estudados.

5.6 Metodologia para determinação dos compostos estudados em matriz do material em suspensão na coluna de água.

A metodologia para determinação dos compostos estudados em matriz do material em suspensão da coluna de água foi desenvolvida no projeto de iniciação científica desta autora em 2012, porém não havia sido validado. Neste trabalho de mestrado, a metodologia previamente desenvolvida foi adaptada e validada para utilização na área de estudo proposta (SILVA, 2015).

5.6.1 Histórico do desenvolvimento da metodologia para matriz do material em suspensão

No período de 2012 a 2014, por ocasião do desenvolvimento da metodologia para determinação dos compostos orgânicos considerados interferentes endócrinos em matriz do material em suspensão da coluna de água, foram considerados diferentes tipos de solventes e mistura destes. Foram realizados ensaios para avaliar a influência do tempo de extração e do tempo necessário para adsorção dos compostos no material em suspensão, utilizando adição dos padrões. Os resultados obtidos nos ensaios preliminares foram bem

satisfatórios e ajudaram a entender a dinâmica dos compostos estudados em relação à afinidade com a parte sólida das amostras de água (SILVA, 2015).

Observou-se nesses primeiros estudos que um dia é pouco tempo para adsorção dos compostos ao sedimento, ou nas partículas sólidas da coluna de água, isto é, contaminações recentes tendem a ficar no corpo de água.

Com relação ao tempo necessário para extração dos compostos da matriz do material em suspensão, concluiu-se que a partir de 1h de extração, no ultrassom já se obtém a extração total, portanto estabeleceu-se 1h30 como segurança para o método.

Foi realizado um estudo para determinação da melhor mistura de solventes para extração dos compostos estudados e, com base nos resultados obtidos por Silva (2012), foi possível observar que para alguns compostos, como por exemplo, o Dietilftalato, Cafeína, Androstano, Progesterona, Nonilfenol e Dibutilftalato, a extração é possível em qualquer solvente. Porém, alguns compostos são melhor extraídos em solventes específicos. Concluiu-se que a melhor condição para extração, em banho de ultrassom, dos compostos estudados das membranas de filtração foi utilizando uma mistura em partes iguais dos solventes: hexano, acetona e acetonitrila.

Além do estudo dos solventes, foi feita a avaliação da afinidade de cada composto com a parte sólida da amostra. Foi possível observar que dietilftalato, bisfenol-A, progesterona e etinilestradiol apresentaram baixíssima ou nenhuma afinidade com a parte sólida. O coprostanol e colesterol apresentaram forte afinidade com a parte sólida. Já para os demais compostos estudados foi observada uma afinidade moderada com a parte sólida (material em suspensão). Os resultados obtidos nestes ensaios ajudaram a entender a dinâmica dos compostos estudados em relação à afinidade com a parte sólida das amostras de água (SILVA, 2015).

Após todos os ensaios realizados, a metodologia final para extração dos IEs das membranas em ultrassom foi estabelecida conforme fluxograma apresentado na Figura 30, onde podem ser observadas todas as etapas para determinação dos compostos estudados em amostras do material em suspensão (SILVA, 2015).

Figura 30 - Fluxograma do procedimento de preparação da amostra do material em suspensão da coluna de água.

Fonte: autora

Na primeira etapa da extração do material em suspensão, as membranas equivalentes à filtração de 1L de água foram colocadas em um *erlenmeyer*, e foram adicionados 15 mL de ACN. O recipiente foi coberto/tampado para evitar perdas e/ou contaminação da solução. Em seguida, inicia-se a extração no banho de ultrassom por 45 minutos.

Em seguida, ao mesmo recipiente, adiciona-se 15 mL da mistura de Acetona/Hexano, na proporção de 1:1 v/v, submetendo-se novamente à extração por 45 minutos em banho de ultrassom.

Após a extração, o sobrenadante foi filtrado com auxílio de um microfiltro Millex com membrana modificada em PTFE de 0,45 μm , para um balão de fundo redondo.

O solvente foi evaporado até a aproximadamente 0,5 mL em rotoevaporador à temperatura de 50 °C. Foram adicionados 250 mL de água ultrapura para realização da etapa de *Clean Up* por SPE, seguindo o mesmo procedimento de extração das amostras de água. Para por fim, a injeção da solução final no GCMS.

5.6.2 Análise por GC/MS

Os parâmetros do método cromatográfico dependem de variáveis que podem ser modificadas de acordo com o tipo de análise a ser realizada. Inicialmente foi testado o método cromatográfico desenvolvido por Otomo (2015), porém, algumas pequenas alterações foram feitas no método para otimizar os resultados para este trabalho, tendo realizado vários testes para se obter cromatogramas com picos devidamente separados uns dos outros, como determina a seletividade na análise. As alterações foram apenas em tempos de corte e fluxo, não prejudicando em nada a validação inicial. Mesmo assim os parâmetros essenciais foram revalidados para as amostras de água.

Para a definição do método no GC foram explorados os parâmetros 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.

Foi utilizada uma coluna capilar equity DB (5% difenil e 95% dimetilsiloxano) de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura do filme da fase estacionária, cujas propriedades podem ser observadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Propriedades da coluna cromatográfica utilizada neste trabalho de mestrado

Categorias relacionadas	Analítica/ Cromatografia, Colunas Capilares de GC e Colunas de Proteção/ Retenção, Equity-5, Cromatografia Gasosa (GC)
Marca	SUPELCO
Material	Sílica fundida
Temperatura máxima	300 °C
Valor beta	250
Espessura da fase	0,25 µm
Aplicações	Cromatografia gasosa (GC)
Comprimento X diâmetro	30 m x 0,25 mm
Grupo ativo de matriz	Ligado; fase poli (5% difenil/ 95% dimetilsiloxano)
Indústria em destaque	Ambiental, Forense e Toxicologia, Farmacêutica
Tipo de coluna	Capilar não polar

Os parâmetros definidos para o GC, com os quais foram obtidos os resultados desejados foram os seguintes:

- Volume de injeção: 1 µL;
- Modo de injeção: *Splitless*;
- Temperatura do injetor: 300°C;
- Rampa de temperatura do forno de acordo com o gradiente (Figura 31):

Taxa de aquecimento	Temperatura final	Tempo de permanência
-	80 °C	1 minutos
20 °C min ⁻¹	210 °C	2 minutos
30 °C min ⁻¹	300 °C	7,5 minutos

- Fluxo na coluna: 1,86 mL min⁻¹;
- Fluxo total: 11,8 mL min⁻¹;
- Pressão total: 128,3 kPa;
- Velocidade Linear: 50,2 cm sec⁻¹;
- Gás de arraste: gás Hélio.

Figura 31 - Programação da rampa de temperatura do GC

Fonte: autora

Os parâmetros definidos para o MS, com os quais foram obtidos melhores resultados foram os seguintes:

- Temperatura da interface: 300°C;
- Temperatura da fonte de íons: 230°C;
- Energia de ionização dos fragmentos: 70 eV;
- Modo de aquisição dos dados: SIM;
- Tempo de corte do solvente: 4,5 minutos;
- Voltagem do detector: relativo ao *Tuning*;
- Relações massa/carga selecionadas para os 13 compostos (Tabela 6).

Tabela 6 - Relação massa/carga dos fragmentos mais intensos de cada composto.

Composto	Intervalo de tempo (minutos)	Ch1-m/z	Ch2-m/z	Ch3-m/z	Ch4-m/z
Dietilftalato	5,00 a 8,75	149*	176	177	
Nonilfenol	8,75 a 10,00	207*	221	235	
Cafeína	10,00 a 10,75	193*	194		
Dibutilftalato	10,75 a 11,48	104	149*	150	
Androstano	11,48 a 12,00	135*	203	245	
Bisfenol A	12,00 a 13,00	357*	358	372	
Estrona	13,00 a 15,35	218	257	342*	285
Estradiol	13,00 a 15,35	218	257	342*	285
Etinilestradiol	15,35 a 15,75	105	135	285	286
Progesterona	15,75 a 17,00	124	147*	314	
Coprostanol	17,00 a 18,80	215	355	370	
Colesterol	18,80 a 19,80	107	129*	215	
Colestanol	18,80 a 19,80	107	129*	215	

Para a determinação dos compostos propostos, foram utilizadas curvas preparadas com padrões analíticos com certificado de pureza da *Aldrich Chemical Co.* Soluções estoques individuais foram preparadas para cada composto, e posteriormente foi preparada a solução mista/mix de acordo com as concentrações apresentadas na Tabela 6. As soluções estoque foram preparadas a partir de 1 mg dos padrões sólidos diluídos a 10 mL com MeOH, resultando em soluções de aproximadamente 100 µg mL⁻¹. Para as soluções padrão na forma líquida, foram feitas diluições diretas para obtenção das soluções estoque de concentrações semelhantes.

5.6.3 Preparação para estudo de validação

Uma solução padrão mista foi preparada retirando-se uma alíquota de cada solução estoque dos compostos, e somente a partir desta foram preparadas 8 diluições de concentrações diferentes para a confecção da curva de calibração e para os ensaios de validação com e sem matriz. Os solventes utilizados são de grau analítico. Na Tabela 7 são apresentadas as concentrações estabelecidas para a faixa de trabalho utilizada nos estudos.

Tabela 7 - Concentrações das soluções de trabalho dos compostos estudados.

Compostos	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
	Concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$							
Dietilftalato	0,002	0,004	0,008	0,016	0,020	0,024	0,032	0,040
Nonilfenol	0,002	0,004	0,008	0,024	0,032	0,040	0,060	0,080
Cafeína	0,050	0,100	0,200	0,250	0,300	0,400	0,500	1,000
Dibutilftalato	0,002	0,004	0,008	0,016	0,020	0,024	0,032	0,040
Androstano	0,009	0,018	0,036	0,072	0,090	0,108	0,144	0,180
Bisfenol A	0,001	0,003	0,005	0,015	0,020	0,025	0,038	0,050
Estrona	0,005	0,025	0,050	0,100	0,120	0,150	0,200	0,250
Estradiol	0,005	0,025	0,050	0,100	0,120	0,150	0,200	0,250
Etinilestradiol	0,050	0,100	0,200	0,250	0,300	0,400	0,500	1,000
Progesterona	0,100	0,200	0,400	0,500	0,600	0,800	1,000	2,000
Coprostanol	0,006	0,030	0,060	0,120	0,144	0,180	0,240	0,300
Colesterol	0,011	0,055	0,110	0,220	0,264	0,330	0,440	0,550
Colestanol	0,005	0,025	0,050	0,100	0,120	0,150	0,200	0,250

5.7 Validação da metodologia analítica para o material em suspensão

Neste trabalho, pelo fato de não haver uma matriz padrão nem uma matriz de referência com as características desejadas e isenta dos analitos de interesse nem para águas e nem para o material em suspensão, foi utilizada uma mistura de amostras de águas coletadas nos pontos P7, LAGO, IBAMA e PC3. 130m, em outubro de 2016, por serem considerados os mais limpos da presença de interferentes nos tempos de retenção dos compostos estudados e que representam as condições das amostras como um todo.

O procedimento de preparação das amostras para o ensaio foi o mesmo citado no item 5.5 deste Capítulo. A eluição dos 4 extratos foi realizada no mesmo recipiente coletor, obtendo assim uma única amostra representativa dos quatro pontos. Essa amostra foi dividida em 10 partes iguais para a adição de padrão em 8 níveis de concentração, com injeções em setuplicata. Os ensaios foram realizados em matriz e sem matriz, onde se utilizou a mistura de eluição da extração. Os resultados obtidos foram utilizados nos cálculos dos testes F e t, com o auxílio da ferramenta %Ensaio de Validação Química+desenvolvida por Furusawa (2007). Nesses testes estatísticos calcularam-se os valores de F e t para cada

composto e em cada uma das concentrações. Os valores obtidos foram comparados com valores de F e t tabelados, a fim de verificar se valores calculados estão acima ou abaixo dos valores tabelados, significando se a matriz interfere ou não no ensaio afetando a precisão das medidas.

5.7.1 Seletividade

Preparam-se dois grupos de amostras de teste, um com a matriz e o outro sem, ambos os grupos com a concentração do analito idêntica em cada nível de concentração de interesse.

Com base no cromatograma gerado pela injeção dos compostos analisados, o parâmetro seletividade foi avaliado baseado na análise do cromatograma e pelo teste de homogeneidade das variâncias (teste F. Snedecor) e teste de significância da diferença das médias (teste t . Student).

Para este estudo, como não há uma matriz de referência, foi utilizada uma mistura de pontos que fosse mais representativa da área de estudo. O procedimento de preparação das amostras para o ensaio foi o mesmo citado no item 5.5.1 deste Capítulo. A eluição dos 4 extratos foi realizada no mesmo recipiente coletor, obtendo assim uma única amostra representativa dos quatro pontos. Essa amostra foi dividida em 10 partes iguais para a adição de padrão em 8 níveis de concentração, com injeções em setuplicata. Os ensaios foram realizados em matriz e sem matriz, onde se utilizou a mistura de eluição da extração. Os resultados obtidos foram utilizados nos cálculos dos testes F e t, com o auxílio da ferramenta %Ensaio de Validação Química+desenvolvida por Furusawa (2007). Nesses testes estatísticos calcularam-se os valores de F e t para cada composto e em cada uma das concentrações. Os valores obtidos foram comparados com valores de F e t tabelados, a fim de verificar se valores calculados estão acima ou abaixo dos valores tabelados, significando se a matriz interfere ou não no ensaio afetando a precisão das medidas.

5.7.2 Faixa de Trabalho e Faixa Linear

A Faixa de Trabalho consiste no intervalo de concentrações do analito, onde em um método quantitativo sejam obtidos resultados lineares. A faixa de trabalho compreende dois limites, o limite superior e o limite inferior. Para o limite

inferior, os valores apresentados serão os limites de detecção e quantificação, e para o limite superior, os valores dependem do sistema de resposta do equipamento em questão ou das necessidades de análise (BRITO, 2009).

A Faixa Linear de Trabalho de um método consiste no intervalo entre os níveis de menor e maior concentração do analito. Devem ser utilizadas faixas de trabalho dentro das quais os valores que se esperam ser obtidos nas amostras ensaiadas. Se um resultado possuir concentrações muito baixas, é fundamental que os valores sejam diferentes dos brancos analisados, para expressar os resultados apurados próximos ao limite inferior (BRITO, 2009; INMETRO, 2003).

Para avaliação deste parâmetro, foram utilizados os mesmos conjuntos de dados utilizados para Seletividade.

5.7.3 Linearidade

Na avaliação e determinação do parâmetro Linearidade foi considerado o coeficiente de determinação (r^2) das curvas analíticas (curva da matriz da amostra de água, matriz da amostra do material em suspensão e sem matriz), o teste t para a verificação do desvio da linearidade de cada ponto de concentração e a avaliação dos gráficos de distribuição espacial dos resíduos absolutos em função da concentração e em função da probabilidade normalizada dos resíduos para cada composto avaliado na matriz do material em suspensão. Os dados utilizados nos cálculos estatísticos para verificação da linearidade foram os mesmos utilizados na avaliação do parâmetro seletividade.

Para realizar os cálculos da concentração dos analitos, foi utilizada a equação da reta (equação 8) apresentada no item 3.5.3 desta dissertação.

A linearidade foi avaliada pelos coeficientes de determinação, r^2 , e por meio dos gráficos de distribuição espacial de resíduos absolutos pela concentração e pela probabilidade normalizada de cada resíduo.

Foram verificados os ajustes ao modelo linear pela análise da variância (*Analysis Of Variance*, ANOVA), onde calculou-se a porcentagem máxima de variação explicável para os dados experimentais e a porcentagem de variação explicada (r^2). A regressão e ajuste ao modelo linear foi verificada pelo teste F.

5.7.4 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O LD foi calculado pela média das medidas de 7 replicatas da concentração mais baixa do ensaio com matriz, mais o valor da abscissa t (*Student*) para $(n-1)$ graus de liberdade com 95% de confiança multiplicado pelo desvio padrão obtido para essa concentração (OTOMO, 2010).

O LQ foi obtido por meio das médias geradas pelas 7 replicatas da menor concentração dos experimentos realizados com matriz, mais cinco vezes o desvio padrão que foi obtido pelas mesmas.

5.7.5 Exatidão

A exatidão foi verificada por meio do teste Z e pelos ensaios de recuperação com utilização de material de referência, aplicando a metodologia estabelecida.

5.7.6 Precisão

A precisão foi verificada por meio do coeficiente de variação e pelo cálculo dos limites de repetibilidade (r) e de reprodutibilidade (R), utilizando os resultados de ensaios independentes, realizados pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, em dias diferentes, em triplicata e em três níveis de concentração: baixa (primeiro ponto da faixa de trabalho), média (concentração no meio da faixa) e alta (último ponto da faixa de trabalho).

5.7.7 Recuperação

Os testes de recuperação foram realizados por adição de padrão nas amostras antes da extração em fase sólida, seguindo-se o procedimento estabelecido, descrito no item 5.6 (Figura 30), em triplicata e em três níveis de concentração: baixa (primeiro ponto da faixa de trabalho), média (concentração no meio da faixa) e alta (último ponto da faixa de trabalho). O cálculo de recuperação foi realizado segundo equação 15 do item 3.5.7 desta dissertação.

5.7.8 Cálculo de Incerteza

A fim de estimar as fontes de incertezas associadas, é possível através do diagrama de causa e efeito fazer um controle das grandezas de entrada com o propósito de incluir todas as fontes nos cálculos. As fontes de incertezas associadas a metodologia deste trabalho são apresentadas pela Figura 32.

Após a determinação das grandezas de entrada por meio do Diagrama de Causa e Efeito (Espinha de Peixe ou Ishikawa) e Incertezas Associadas, de acordo com a Figura 32, observou-se que as principais fontes de incertezas foram as associadas ao volume final, à curva analítica e à recuperação.

As fontes envolvidas no cálculo de incerteza para curva analítica estão associadas à preparação da solução com material de referência utilizado, considerando todas as diluições do processo, assim como as incertezas para cada área de resposta obtida pelos analitos.

O Cálculo de Incerteza para as amostras analisadas pela metodologia estabelecida foi realizado com auxílio de uma planilha desenvolvida por Martins (2010), a qual é baseada no Guia Eurachem (2002).

Figura 32 . Diagrama de Causa e Efeito da metodologia aplicada para avaliação dos interferentes endócrinos

Fonte: adaptado de OTOMO, 2015 e ADAME, 2016.

5.7.8.1 Incerteza associada ao volume final

Para o cálculo da incerteza associada ao volume final, $u(V_{amostra})$, foram consideradas as incertezas referentes ao balão volumétrico de 1 mL, isto é, as incertezas associadas à informação do fabricante, repetições, variação de temperatura e coeficiente de dilatação do vidro de acordo com a equação 17 apresentada no item 3.5.8 desta dissertação de mestrado.

5.7.8.2 Incerteza associada à recuperação

A incerteza associada à recuperação, $u(Rec)$, para os estudos de acordo com o procedimento estabelecido foi calculada dividindo-se o valor de desvio padrão pela raiz de n replicatas, e foram considerados o desvio padrão das replicatas e o número de ensaios de recuperação, de acordo com a equação 20.

$$u_{Rec} = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

equação 20

5.7.8.3 Incertezas associadas à curva de calibração

As grandezas de entrada das incertezas associadas à curva de calibração, conforme diagnosticado no diagrama de Ishikawa, são: Incertezas associadas à solução padrão e todas as suas diluições e as Incertezas associada à resposta do equipamento.

Incertezas associadas à solução padrão

As fontes de incerteza envolvidas no cálculo da incerteza para preparação da solução padrão foram a massa, pureza do padrão e volume do balão, conforme identificado no diagrama de causa e efeito (Ishikawa) da Figura 32.

Associado à massa, tem-se a incerteza da balança, do peso padrão e de repetitividade, calculada de acordo com a equação 16 apresentada no item 3.3.8 desta dissertação de mestrado.

Em relação ao volume do balão volumétrico, foram consideradas as incertezas associadas à informação do fabricante, repetições, variação de temperatura e coeficiente de dilatação do vidro, e a incerteza para este volume foi

calculada de acordo com a equação 17 apresentada no item 3.3.8 desta dissertação de mestrado. A incerteza combinada para a solução de trabalho foi calculada pela equação 21.

$$u_{\text{Padrão}} = \sqrt{(u_{\text{Massa do Padrão}})^2 + (u_{\text{Volume do Balão}})^2 + (u_{\text{Pureza do Padrão}})^2}$$

equação 21

Incertezas associadas à preparação das soluções de trabalho

Para a o cálculo das incertezas associadas às diluições para preparação das soluções de trabalho, as grandezas de entrada envolvidas foram: o volume da pipeta e o volume dos balões. As incertezas para dos volumes utilizados foram calculadas de acordo com a equação 17 apresentada no item 3.3.8 desta dissertação de mestrado. Em ambos foram consideradas as informações do fabricante, repetições, variação de temperatura e coeficiente de dilatação. Para o cálculo da incerteza combinada da preparação das soluções de trabalho foi necessário considerar todas as incertezas envolvidas em cada uma das diluições.

Incerteza associada à resposta do equipamento

No cálculo da incerteza da área (resposta) dos cromatogramas foi considerada a combinação das incertezas da repetitividade e as incertezas associadas à resolução do equipamento. O cálculo de resolução foi realizado pela divisão do valor da resolução do GC/MS à meia altura base do pico cromatográfico por raiz de 3, considerando-se uma distribuição retangular (MARTINS et al., 2014; ADAME, 2016). A resolução do equipamento foi calculada de acordo com a equação 22 e a incerteza do equipamento de acordo com a equação 23.

$$R_s = \frac{2 (Tr_2 - Tr_1)}{W_{b1} + W_{b2}} \cong \frac{\Delta Tr_1}{W_{b2}}$$

equação 22.

Onde:

Tr1 e Tr2 = Tempos de retenção de dois picos adjacentes;
Wb2 e Wb1 = Largura da base de cada pico.

$$\mu_{Rs} = \frac{Rs}{\sqrt{3}}$$

equação 23

Onde:

Rs = resolução do equipamento a meia altura base do pico cromatográfico.

5.7.8.4 Incerteza combinada e expandida

A incerteza combinada de todas as fontes envolvidas foi calculada pela equação 18 apresentada no item 3.3.8 desta dissertação de mestrado, e a incerteza expandida foi calculada pela equação 19, considerando-se $k=2$.

5.8 Revalidação da metodologia analítica para água

Da mesma forma que para material em suspensão, não há uma matriz padrão nem de referência com as características desejadas e isenta dos analitos de interesse para a matriz de água. Portanto foi utilizada uma mistura de amostras de águas coletadas nos pontos P7, LAGO, IBAMA e PC3. 130 m, em outubro de 2016, por serem considerados os mais limpos em relação à presença de interferentes nos tempos de retenção estudados e que representam as condições das amostras como um todo.

A linearidade foi avaliada pelos coeficientes de determinação (r^2), a precisão foi avaliada pelo coeficiente de variação (CV) e pelo limite de repetibilidade e a exatidão foi avaliada pelo índice Z (Score), de acordo com os mesmos parâmetros e equações utilizadas para a matriz do material em suspensão.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia para determinação de compostos orgânicos em águas, conforme já citado no item 5.5 do capítulo 5 desta dissertação, foi previamente desenvolvida e validada por Otomo (2015) e a metodologia para determinação dos mesmos compostos no material em suspensão, desenvolvida por esta autora, durante a iniciação científica e validada no decorrer deste trabalho (SILVA, 2015).

Neste Capítulo são apresentados os resultados da validação do método para extração dos compostos estudados na matriz de material em suspensão na coluna d'água, no item 6.1.

No item 6.2, são apresentados os resultados dos testes para otimização da metodologia para a matriz água.

No item 6.3, são apresentados os resultados da revalidação da metodologia utilizada para águas aplicada na área de estudo.

Os resultados das análises das amostras coletadas na área de estudo estão apresentados no item 6.4.

Conforme já citado no item 5.6 do Capítulo 5 desta dissertação de mestrado (Validação da metodologia analítica para o material em suspensão), não há uma matriz de referência para os compostos estudados, para os ensaios de validação e para a quantificação dos analitos foram utilizadas curvas de calibração na própria matriz.

6.1 Resultados da validação do método para extração dos compostos estudados na matriz de material em suspensão na coluna d'água

A seguir, nos itens 6.1.1 a 6.1.6, são apresentados os resultados da validação do método para extração dos compostos estudados na matriz de material em suspensão proveniente da coluna d'água.

6.1.1 Seletividade . matriz de material em suspensão

A seletividade da metodologia, entendida como a capacidade do método em distinguir a resposta de um analito de outros (INMETRO, 2003; 2016), foi primeiramente avaliada pela análise cromatográfica da solução mista no método definido. Na Figura 33 pode-se observar a separação cromatográfica dos compostos, cujas concentrações estão entre 0,05 e 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, dependendo da sensibilidade de cada um deles.

Figura 33 - Cromatograma de mistura de padrão com os 13 compostos estudados, modo SIM.

Fonte: autora.

Nas Figuras 34 a 44, podem ser observados os cromatogramas dos compostos separadamente, obtidos no modo de aquisição SIM (*Simple Ion Monitoring*).

Figura 34 - Cromatograma do Dietiltalado obtido no modo SIM.

Fonte: autora.

Figura 35 - Cromatograma do Nonilfenol obtido no modo SIM.

Fonte: autora.

Figura 36 - Cromatograma da Cafeína obtido no modo SIM.

Fonte: autora.

Figura 37 - Cromatograma do Dibutilftalato obtido no modo SIM.

Fonte: autora.

Figura 38 - Cromatograma do Androstano obtido no modo SIM.

Fonte: autora.

Figura 39 - Cromatograma do Bisfenol A obtido no modo SIM.

Fonte: autora.

Figura 40 - Cromatograma da Estrona e do Estradiol obtido no modo SIM.

Fonte: autora.

Figura 41 - Cromatograma do Etinilestradiol obtido no modo SIM.

Fonte: autora.

Figura 42 - Cromatograma da Progesterona obtido no modo SIM.

Fonte: autora.

Figura 43 - Cromatograma do Coprostanol obtido no modo SIM.

Fonte: autora.

Figura 44 - Cromatograma do Colesterol e do Colestanol obtido no modo SIM.

Os cromatogramas apresentam, visivelmente, boa separação dos compostos estudados no modo SIM, onde são monitorados de 3 a 5 fragmentos de íons de cada composto.

Conforme descrito no item 5.6.1 do capítulo 5 desta dissertação de mestrado, o efeito das matrizes sobre o método foi avaliado por testes estatísticos específicos. Pela aplicação do teste F (Snedecor) foi analisada a homogeneidade das variâncias nas medidas de adição padrão nas soluções sem matriz (somente no solvente MeOH) e na matriz de material em suspensão na coluna de água, em um número estatisticamente significativo de replicatas ($n=7$) e 95% de confiança. Os resultados de F calculados obtidos foram maiores que o valor crítico $F_{(6,6, 95\%)} = 4,28$ evidenciando que, estatisticamente, a matriz tem efeito sobre a precisão do método.

O teste de significância das diferenças das médias, ou teste t (Student), também foi aplicado nos dois grupos de soluções (com e sem matriz) e, assim como no teste F, na matriz considerada e em quase todas as concentrações avaliadas os valores de t calculado foram maiores que o t tabelado, comprovando que para a quantificação dos analitos deve ser utilizada uma curva analítica preparada na própria amostra, ou em matriz semelhante, uma vez que existirá diferença nos resultados obtidos frente a uma curva preparada somente na solução de solventes.

Nas Tabelas 8 e 9 são apresentados os resultados dos testes F de Snedecor e t de Student para os testes realizados para os compostos estudados na matriz de material em suspensão na coluna de água da região de estudo.

Tabela 8- Resultados do teste de seletividade (teste F de Snedecor e t de Student, n=7) na matriz de material em suspensão na coluna de água para os compostos Dietilftalato, Nonilfenol, Cafeína, Dibutilftalato, Androstano e Bisfenol A. Adição de padrão na matriz e sem matriz. Considerando $F_{\text{tabelado}} = 4,28$.

Dietilftalato e t tabelado: 2,571								
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,002	0,004	0,008	0,016	0,02	0,024	0,032	0,04
F calculado (Snedecor)	0,16	0,83	1,21	2,83	17,16	49,81	1,72	5,04
t calculado (Student)	3,54	0,77	1,60	42,34	21,58	14,25	20,57	32,98
Nonilfenol e t tabelado: 2,571								
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,002	0,004	0,008	0,024	0,032	0,04	0,06	0,08
F calculado (Snedecor)	0,43	635,76	541,13	2866,05	922,54	1501,65	769,91	1941,2
t calculado (Student)	57,18	155,49	150,70	107,65	129,86	95,90	124,28	139,40
Cafeína e t tabelado: 2,571								
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,050	0,100	0,200	0,250	0,300	0,400	0,500	1,000
F calculado (Snedecor)	2,42	2,80	1,28	4,14	271,54	1,63	1,36	5,72
t calculado (Student)	3,55	27,65	39,18	34,66	9,60	37,94	38,47	36,66
Dibutilftalato e t tabelado: 2,201								
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,002	0,004	0,008	0,016	0,02	0,024	0,032	0,04
F calculado (Snedecor)	136,78	11,25	10,67	4,41	8,68	13,00	2,22	1,60
t calculado (Student)	10,56	25,79	18,16	43,47	40,03	23,13	25,63	82,18
Androstano e t tabelado: 2,447								
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,009	0,018	0,036	0,072	0,09	0,108	0,144	0,18
F calculado (Snedecor)	12,66	27,56	8,18	10,00	41,82	30,43	12,79	80,75
t calculado (Student)	27,32	37,90	64,57	129,31	60,11	92,89	155,45	85,56
Bisfenol A e t tabelado: 2,365								
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,0013	0,003	0,005	0,015	0,02	0,025	0,038	0,05
F calculado (Snedecor)	51,21	11,25	11,66	37,38	101,46	34,50	6,16	10,27
t calculado (Student)	8,04	3,57	14,96	30,84	29,92	38,20	22,92	53,25

Tabela 9 - Resultados do teste de seletividade (teste F de Snedecor e t de Student, n=7) na matriz de material em suspensão na coluna d'água para os compostos Estrona, Estradiol, Etinilestradiol, Progesterona, Coprostanol, Colesterol e Colestanol. Adição de padrão na matriz e sem matriz. Considerando $F_{\text{tabelado}} = 4,28$.

Estrona e t tabelado: 2,571								
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,005	0,025	0,05	0,1	0,12	0,15	0,2	0,25
F calculado (Snedecor)	5,47	6,22	15,94	130,92	24,78	179,08	225,55	183,08
t calculado (Student)	20,93	63,12	49,29	61,88	79,98	48,91	34,81	77,29
Estradiol e t tabelado: 2,571								
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,005	0,025	0,05	0,1	0,12	0,15	0,2	0,25
F calculado (Snedecor)	10,29	5,83	5,33	128,34	51,71	351,60	89,10	44,08
t calculado (Student)	14,55	36,52	106,54	53,83	76,52	54,24	82,49	177,03
Etinilestradiol e t tabelado: 2,571								
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,050	0,100	0,200	0,250	0,300	0,400	0,500	1,000
F calculado (Snedecor)	0,19	0,73	6,32	1,07	23,28	165,76	69,29	95,80
t calculado (Student)	7,20	25,95	22,32	75,15	31,16	18,73	69,13	65,11
Progesterona e t tabelado: 2,571								
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,100	0,200	0,400	0,500	0,600	0,800	1,000	2,000
F calculado (Snedecor)	0,01	0,35	6,98	3,50	14,89	1,00	6,06	13,64
t calculado (Student)	4,57	10,26	14,82	29,91	23,04	19,49	60,66	63,35
Coprostanol e t tabelado: 2,571								
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,006	0,03	0,06	0,12	0,144	0,18	0,24	0,30
F calculado (Snedecor)	28,78	2,03	13,90	20,11	22,31	240,95	31,24	121,58
t calculado (Student)	13,25	31,47	33,42	59,93	46,49	39,59	60,92	51,52
Colesterol e t tabelado: 2,447								
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,011	0,055	0,11	0,22	0,264	0,33	0,44	0,55
F calculado (Snedecor)	138,52	47,35	5,52	45,43	18,34	102,43	19,05	87,90
t calculado (Student)	10,78	22,39	34,70	31,73	65,40	32,25	68,19	54,83
Colestanol e t tabelado: 2,571								
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,005	0,025	0,05	0,1	0,12	0,15	0,2	0,25
F calculado (Snedecor)	16,82	21,49	6,54	2,99	53,81	5,46	30,40	51,55
t calculado (Student)	15,93	28,59	46,20	140,07	93,76	84,20	74,35	96,38

Os valores apresentados nas Tabelas 8 e 9 para o parâmetro seletividade demonstram que os resultados de F calculado são maiores que os valores para F tabelado, portanto, para todos os compostos estudados, observa-se que apesar haver seletividade, a matriz interfere na precisão do método.

Na Tabela 10 são apresentados os resultados dos testes t Student para a verificação da inclinação e paralelismo e do intercepto na análise de seletividade da matriz avaliada.

Tabela 10 Resultados obtidos para os testes de inclinação e paralelismo e do intercepto aplicando t-*Student* na matriz de material em suspensão na coluna d'água, considerando os dois conjuntos (com e sem matriz) de dados, com 7 graus de liberdade e 95% de confiança, onde 2,179 é o valor crítico.

Composto	Teste de Inclinação/ Paralelismo	Teste do Intercepto
Dietilftalato	2083	437
Nonilfenol	46547	473
Cafeína	410	35
Dibutilftalato	1675	35
Androstano	677	43
Bisfenol A	894	12
Estrona	879	6
Estradiol	879	37
Etinilestradiol	637	164
Progesterona	367	66
Coprostanol	537	5
Colesterol	332	28
Colestanol	559	4

Por meio da análise de t *Student* para o teste do paralelismo, podem ser observadas diferenças significativas entre os compostos, devido à sensibilidade de cada um em relação ao método proposto. Todos apresentaram valores bem superiores ao valor crítico tabelado de $t = 2,179$, o que significa que nenhum composto possui curvas paralelas nem inclinações próximas quando observados os testes com e sem matriz. Logo, são estatisticamente diferentes. O Teste do Intercepto avalia a intersecção no eixo y, e por meio dos cálculos, pode-se observar que para todos os compostos foram observados valores superiores ao t tabelado, que demonstra que todos têm intercepto estatisticamente diferentes com e sem matriz. Portanto, a curva deve ser preparada em matriz.

As diferenças de inclinação e de sensibilidade das curvas preparadas na matriz e apenas em solvente podem ser verificadas nas Figuras 45 e 46 onde são apresentadas as faixas lineares de trabalho dos compostos estudados, nos estudos com a matriz e sem a matriz, sem ajustes, considerando as 7 replicatas.

Figura 45 - Representação gráfica da seletividade para matriz de amostras de água e no ensaio sem matriz dos compostos Dietilftalato, Nonilfenol, Cafeína, Dibutilftalato, Androstano e Bisfenol A.

Fonte: autora.

Como pode ser observado nas Figuras 45 e 46, considerando as mesmas concentrações, estabelecidas na Tabela 7 do item 5.6.3 desta dissertação, para todos os compostos estudados, as curvas obtidas na matriz são completamente diferentes das curvas apenas no solvente.

Figura 46 - Representação gráfica da seletividade para matriz de amostras de água e no ensaio sem matriz dos compostos Estrona, Estradiol Etinilestradiol, Progesterona, Coprostanol, Colesterol e Colestanol.

Fonte: autora.

6.1.2 Linearidade . matriz de material em suspensão

O parâmetro linearidade foi avaliado pelas curvas de calibração, onde foram considerados os coeficientes de determinação das retas (r^2), a análise de resíduos pelo teste t (*Student*) e os gráficos dos resíduos. Os coeficientes de determinação (r^2) obtidos para todos os compostos foram maiores que 0,90 e podem ser observados na Tabela 11 para a faixa de trabalho estabelecida de acordo com a Tabela 7 do Capítulo 5 desta dissertação de mestrado. Nas Figuras 47 e 48 são apresentadas as representações gráficas da linearidade de todos os compostos, considerando-se o intervalo da faixa de trabalho que compreende o ponto médio da curva de calibração.

Tabela 11 - Valores de coeficiente de determinação dos compostos estudados para a matriz de material em suspensão na coluna de água na faixa de trabalho estabelecida.

Composto	r^2	Composto	r^2
Dietilftalato	0,990	Estradiol	0,998
Nonilfenol	0,998	Etinilestradiol	0,982
Cafeína	0,994	Progesterona	0,994
Dibutilftalato	0,988	Coprostanol	0,998
Androstano	0,990	Colesterol	0,995
Bisfenol A	0,999	Colestanol	0,995
Estrona	0,998		

O coeficiente de correlação linear (r) é um indicativo do quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático, porém não é conclusivo. Um coeficiente de correlação (r) maior que 0,999 pode ser considerado evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (INMETRO, 2003; RIBANI, 2014; INMETRO, 2017).

Com base nessas informações dos órgãos acreditadores e certificadores, na prática isso significa que teremos respectivamente os coeficientes de determinação (r^2) relacionados a seguir.

Recomendação ANVISA . $r = 0,99$, que corresponde a $r^2 = 0,980$;

Recomendação INMETRO . $r = 0,90$, que corresponde a $r^2 = 0,81$;

Ajuste ideal . $r > 0,999$, que corresponde a $r^2 = 0,998$ no mínimo.

Portanto, os resultados obtidos são valores que atendem as exigências tanto do INMETRO (2003) como da ANVISA para constatar a linearidade do método.

Na Figura 47 podem ser observadas as curvas de calibração, considerando a faixa que compreende o ponto médio da faixa de trabalho estudada para matriz de material em suspensão, para os compostos Dietilftalato, Nonilfenol, Cafeína, Dibutilftalato, Androstano e Bisfenol A.

Os resultados apresentados nas Figuras 47 e 48 focam a faixa de trabalho que compreende o ponto médio da faixa total estudada (Tabela 7 do item 5.6.3 desta dissertação), sendo consideradas curvas na matriz, com cinco pontos em três replicatas. Diferente das Figuras 45 e 46, onde foram utilizadas as oito concentrações de estudo e consideradas todas as sete replicatas, não sendo realizado nenhum ajuste, portanto na condição mais crítica.

Figura 47 . Representação gráfica da linearidade para os compostos Dietiltalato, Nonilfenol, Cafeína, Dibutilftalato, Androstano e Bisfenol A.

Fonte: autora.

Da mesma forma, na Figura 48 são apresentadas as curvas de calibração para a matriz de material em suspensão para os compostos Estrona, Estradiol, Etinilestradiol, Progesterona, Coprostanol, Colesterol e Colestanol, na faixa de trabalho que compreende o ponto médio da faixa total estudada, sendo consideradas com cinco pontos em três replicatas.

Figura 48 - Representação gráfica da linearidade para os compostos Estrona, Estradiol, Etinilestradiol, Progesterona, Coprostanol, Colesterol e Colestanol.

Fonte: autora.

Avaliando as curvas de calibração apresentadas nas Figuras 47 e 48, associado ao valor dos r^2 para a faixa linear que compreende o ponto médio das

respectivas faixas de trabalho estabelecidas no processo de validação, é possível afirmar que para todos os compostos estudados, o método proposto possui linearidade.

Nas Tabelas 12 e 13 são apresentados os valores de t calculado, obtidos estatisticamente para todos os compostos de interesse para análise de resíduos nas diferentes concentrações. Esse fator também assegura a linearidade do método.

Tabela 12 - Valores obtidos no Teste t-Student para a verificação do desvio da linearidade de cada ponto da curva para os compostos Dietilftalato, Nonilfenol, Cafeína, Dibutilftalato, Androstano e Bisfenol A, onde o valor de $t_{tab} = 2,365$ para 7 graus de liberdade com 95% de confiança.

Dietilftalato	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,002	0,004	0,008	0,016	0,020	0,024	0,032	0,040
	t_{calc}	3,649	1,832	2,184	2,123	2,982	2,996	2,974	1,830
Nonilfenol	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,002	0,004	0,008	0,024	0,032	0,040	0,060	0,080
	t_{calc}	0,053	2,084	3,347	2,827	3,619	0,740	2,095	3,797
Cafeína	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,050	0,100	0,200	0,250	0,300	0,400	0,500	1,000
	t_{calc}	0,757	0,105	2,701	0,502	3,592	2,217	5,369	1,107
Dibutilftalato	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,002	0,004	0,008	0,016	0,020	0,024	0,032	0,040
	t_{calc}	1,688	1,624	1,540	1,686	1,110	5,707	0,031	3,391
Androstano	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,009	0,018	0,036	0,072	0,090	0,108	0,144	0,180
	t_{calc}	0,068	0,412	1,291	2,485	0,887	3,479	5,357	2,529
Bisfenol A	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,0013	0,003	0,005	0,015	0,020	0,025	0,038	0,050
	t_{calc}	4,536	2,390	1,346	0,887	3,642	3,720	0,053	0,063

Tabela 13 - Valores obtidos no Teste t-Student para a verificação do desvio da linearidade de cada ponto da curva para os compostos Estrona, Estradiol, Etinilestradiol, Progesterona, Colesterol e Colestanol, onde o valor de $t_{\text{tab}} = 2,365$ para 7 graus de liberdade com 95% de confiança.

Estrona	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,005	0,025	0,050	0,100	0,120	0,150	0,200	0,250
	t_{calc}	0,493	1,341	1,557	2,723	1,639	1,161	4,571	4,381
Estradiol	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,005	0,025	0,050	0,100	0,120	0,150	0,200	0,250
	t_{calc}	2,428	0,461	3,635	2,925	0,469	4,205	3,130	0,652
Etinilestradiol	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,050	0,100	0,200	0,250	0,300	0,400	0,500	1,000
	t_{calc}	4,162	2,372	0,905	1,765	2,589	4,076	0,435	2,367
Progesterona	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,100	0,200	0,400	0,500	0,600	0,800	1,000	2,000
	t_{calc}	2,140	1,157	0,825	1,037	0,845	5,353	4,333	0,430
Coprostanol	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,006	0,030	0,060	0,120	0,144	0,180	0,240	0,300
	t_{calc}	0,952	0,822	1,836	3,341	2,950	5,398	0,520	1,332
Colesterol	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,011	0,055	0,110	0,220	0,264	0,330	0,440	0,550
	t_{calc}	0,513	0,234	0,104	3,660	1,468	6,146	1,480	0,390
Colestanol	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,005	0,025	0,050	0,100	0,120	0,150	0,200	0,250
	t_{calc}	0,635	1,558	0,912	4,312	3,587	4,479	0,464	0,7793

Os resultados obtidos, apresentados nas Tabelas 12 e 13, para esse teste apresentaram a maioria dos valores de t calculado abaixo do valor de t tabelado, assegurando que a maioria dos pontos são considerados como pertencentes a reta. Observa-se que alguns pontos que poderiam ser classificados como não pertencentes à curva (por exemplo, o ponto 6 da curva para 10 dos 13 compostos estudados). Porém, é importante considerar que esses valores são resultados das condições mais críticas, onde foram utilizadas todas as replicatas sem nenhum ajuste e com possíveis *outliers*. Além disso, os resultados deste teste são utilizados para auxiliar o analista na tomada de decisão, avaliando juntamente com os resultados obtidos nos demais testes e pela experiência obtida durante o desenvolvimento do método (SILVA, 2012). No presente estudo, é possível afirmar que o ajuste linear é adequado para todos os compostos. Caso haja necessidade, pode-se retirar os pontos discrepantes do conjunto que constituirá a curva analítica. Essa discrepância pode ser explicada pelo fato de o conjunto dos pontos serem

muito bem ajustáveis ao modelo e não apresentarem grandes variações entre as replicatas (precisão alta). O teste t de *Student* considera as variâncias das replicatas e qualquer variação um pouco maior em um conjunto muito estável pode ser interpretada como discrepante. Este teste pode ser utilizado para avaliação de tendências na curva que poderia ser atribuída à não linearidade no intervalo estudado, porém os dados também não mostram tendências.

Outra avaliação que normalmente é realizada no parâmetro linearidade são os comportamentos dos resíduos normalizados e absolutos para cada composto. Nas Figuras 49 a 53 são apresentadas as representações gráficas desses resultados para os compostos estudados.

Figura 49 . Gráficos de resíduos absoluto e normalizado para os compostos Dietilftalato, Nonilfenol e Cafeína.

Fonte: autora.

Figura 50 . Gráficos de resíduos absoluto e normalizado para os compostos: Dibutilftalato, Androstano e Bisfenol A.

Fonte: autora.

Figura 51 . Gráficos de resíduos absoluto e normalizado para os compostos: Estrona, Estradiol, Etinilestradiol.

Fonte: autora.

Figura 52 . Gráficos de resíduos absoluto e normalizado para os compostos: Progesterona e Coprostanol.

Fonte: autora.

Figura 53 . Gráficos de resíduos absoluto e normalizado para os compostos: Colesterol e Coletanol.

Fonte: autora.

Pela análise dos gráficos de probabilidade normalizada nota-se que a distribuição é semelhante de uma reta, o, que indica que não há tendências que depreciem o comportamento linear. Os gráficos de resíduos para os interferentes endócrinos demonstram para todos os compostos o comportamento da maioria dos pontos distribuídos no intervalo de probabilidade de -2 e +2. Logo esse resultado encontra-se dentro de ± 2 desvios padrão, com nível de confiança de 95%.

Conforme recomendado pelo DOQ-CGCRE-008 (2017), foi utilizada a análise de variância (ANOVA) para avaliar a linearidade. Na Tabela 14 são apresentados os valores do teste F de regressão e de ajuste, porcentagem de variação explicada e porcentagem máxima variação explicável para os compostos estudados na matriz de material em suspensão na coluna de água. Pelo teste F de regressão foi possível avaliar se a adequação do modelo adotado aos dados obtidos foi significativa, mostrando se o modelo linear se ajusta ao conjunto de dados obtidos, considerando 95% de confiança. Pelo teste F de ajuste foi possível verificar o quanto esse modelo (Equação da reta) se ajusta ao conjunto de dados obtidos, sempre considerando 95% de confiança. Foi avaliada também a porcentagem de variação explicada em relação à porcentagem máxima de variação explicável, ou seja, o quanto de variação pôde ser explicada dentro da porcentagem explicável pelo ajuste aplicado ao método. Para um resultado ideal, a porcentagem de variação explicada deve ter uma diferença mínima quando comparada a porcentagem de variação explicável (FURUSAWA, 2007; OTOMO, 2010; ADAME, 2016; INMETRO, 2017).

Tabela 14 . Resumo dos resultados da análise de variância (ANOVA) para os compostos estudados no ensaio com a matriz de material em suspensão na coluna d'água.

Composto	F calculado		% de variação explicada	% máxima de variação explicável
	Regressão F 1,14, 95%tab= 4,60	Ajuste F 6,8, 95%tab= 3,29		
Dietilftalato	755	36,2	98,2	99,9
Nonilfenol	6262	77,5	98,8	100,0
Cafeína	2410	7,2	99,4	99,9
Dibutilftalato	609	50,5	97,7	99,9
Androstano	538	154,6	97,1	99,9
Bisfenol A	4116	5,3	99,6	99,9
Estrona	1248	12,5	98,7	99,9
Estradiol	8730	4,6	99,8	99,9
Etinilestradiol	502	100,4	97,3	99,9
Progesterona	2583	41,2	99,4	99,9
Coprostanol	2856	6,1	99,4	99,9
Colesterol	987,60	7,1	98,4	99,7
Colestanol	1704	64,6	99,2	99,9

Avaliando-se os resultados obtidos nos testes de regressão, foi possível observar que a regressão foi significativa para todos os compostos, pois os valores de F calculados foram superiores ao valor F tabelado ($F_{\text{tab}} = 4,49$), o que significa que para o modelo de regressão adotado, os dados obtidos possuem comportamento linear. Os resultados do teste de ajuste evidenciam a falta de ajuste para todos os compostos estudados no método final, com valores de $F_{\text{calculado}} > F_{\text{Tabelado}}$ ($F_{\text{tab}}=3,29$), indicando que a variação da amostra em torno da reta de regressão é próxima ao erro aleatório considerando a variação das replicatas. Os resultados da porcentagem de variação explicada foram próximos aos valores de porcentagem de variação explicável, além de terem permanecido acima de 90%, demonstrando que as variações foram explicadas satisfatoriamente pelo modelo de regressão adotado e o mesmo se ajusta aos dados (FURUSAWA, 2007; SILVA, 2012; OTOMO, 2015; INMETRO, 2017).

Os resultados do teste ANOVA auxiliam no entendimento dos valores apresentados nas Tabelas 12 e 13, pois apesar de alguns pontos que terem sido classificados como não pertencentes à curva, este fato não inviabiliza a utilização

do modelo linear proposto, visto que a regressão significativa e a porcentagem explicada indicam a possibilidade de se obter bom desempenho do método.

Nas Figuras 54 e 55 são apresentados os gráficos com os intervalos de confiança para todos os compostos nas matrizes do material em suspensão, nas faixas de trabalho consideradas para a metodologia final.

Figura 54 . Gráficos da faixa de intervalo de confiança no ensaio com matriz para os compostos Dietiltalato, Nonilfenol, Cafeína, Dibutiltalato, Androstano e Bisfenol A.

Fonte: autora.

Figura 55 - Gráficos da faixa de intervalo de confiança no ensaio com matriz para os compostos Estrona, Estradiol, Etinilestradiol Progesterona, Coprostanol, Colesterol e Colestanol.

Fonte: autora.

Embora os intervalos de confiança para todos os compostos nas matrizes do material em suspensão apresentados nas Figuras 54 e 55 estejam dentro da faixa de trabalho considerada estatisticamente aceita (entre +2 e -2 s), podem ser notados alguns desvios. Como pode ser observado para os compostos dibutilftalato, nonilfenol, estradiol e coprostanol o intervalo de confiança é estreito em praticamente toda a faixa de trabalho. Para os compostos dietilftalato, dibutilftalato, androstano, cafeína, progesterona, e etinilestradiol, os limites são mais afastados do que para os demais compostos em praticamente toda a faixa de trabalho. Isso pode ter ocorrido devido à dificuldade de se trabalhar com esses compostos nesta matriz, portanto a incerteza para estes é maior em qualquer concentração quando comparados aos demais compostos estudados, devendo-se ter um maior critério na avaliação para que não sejam considerados falsos positivos. Para a maioria dos demais compostos, perde-se um pouco a confiança no resultado tanto no limite inferior quanto superior da curva analítica, devendo-se, portanto, estabelecer uma curva mais próxima a esses limites quando for necessária a quantificação nesses intervalos.

Estes fatos podem ser amenizados por meio da elaboração de curva de concentração mais ajustadas a intervalos de concentração menores, conforme já discutido nos resultados para linearidade.

6.1.3 Exatidão . matriz de material em suspensão

A exatidão, neste estudo, foi avaliada pelo índice z (Score) que, conforme discutido no Capítulo 3 desta dissertação de mestrado, deve se apresentar menor que 2. Na Tabela 15 são apresentados os índices z (Score) obtidos para 3 concentrações diferentes, consideradas baixa, média e alta, para cada um dos compostos estudados. As concentrações selecionadas para as faixas baixa, média e alta, de acordo com a Tabela 15 do item 5.6.3 desta dissertação, foram as seguintes:

Concentração baixa: próximas aos respectivos limites de quantificação de cada composto;

Concentração média: correspondentes ao ponto médio das curvas de calibração;

Concentração alta: último ponto da faixa de trabalho.

Tabela 15 - Valores de z (*Score*) para os compostos estudados no ensaio com matriz de material em suspensão na coluna d'água das amostras coletadas no entorno do RMB.

Composto	Matriz material em suspensão	Matriz material em suspensão	Matriz material em suspensão
	BAIXA	MÉDIA	ALTA
Dietilftalato	0,37	1,61	0,28
Nonilfenol	0,68	2,00	1,20
Cafeína	1,13	1,27	0,15
Dibutilftalato	1,84	1,54	0,44
Androstano	0,11	1,17	1,93
Bisfenol A	2,00	0,40	0,02
Estrona	1,28	0,49	1,85
Estradiol	0,10	0,09	0,05
Etinilestradiol	1,05	2,00	0,45
Progesterona	0,11	0,07	0,74
Coprostanol	1,45	1,86	0,26
Colesterol	1,89	0,10	0,13
Colestanol	0,85	0,19	0,15

As concentrações utilizadas para cada composto avaliado foram

De acordo com os resultados obtidos para 3 diferentes concentrações, os valores para z *Score* são coerentes, pois apresentam números iguais ou inferiores a 2, evidenciando que os resultados são satisfatórios e o método tem exatidão nas faixas de concentração consideradas.

6.1.4 Precisão . matriz de material em suspensão

A precisão foi avaliada por meio do coeficiente de variação, limite de repetibilidade e limite de reprodutibilidade obtidos a partir de 7 replicatas de três níveis de concentrações (baixa, média e alta) para cada um dos compostos em ensaio realizado com a matriz de estudo. As concentrações seguiram o mesmo critério de seleção que para a exatidão. Os resultados obtidos para o parâmetro precisão para a matriz de material em suspensão na coluna d'água podem ser observados na Tabela 16.

Tabela 16 - Resumo dos resultados do teste de Reprodutibilidade, Repetibilidade e Coeficiente de Variação para os compostos estudados na matriz de material em suspensão na coluna d'água da região do RMB.

Composto	Reprodutibilidade - R			Repetibilidade - r			CV		
	Baixa	Média	Alta	Baixa	Média	Alta	Baixa	Média	Alta
Dietilftalato	0,00027	0,00135	0,00239	0,0006	0,0039	0,0036	5	6	3
Nonilfenol	0,00003	0,00080	0,00125	0,0001	0,0016	0,0041	2	2	2
Cafeína	0,01483	0,02252	0,06594	0,0198	0,0294	0,1237	3	4	4
Dibutilftalato	0,00050	0,00154	0,00138	0,0014	0,0022	0,0019	8	4	2
Androstano	0,00114	0,00516	0,00433	0,0037	0,0102	0,0140	14	4	3
Bisfenol A	0,00041	0,00056	0,00276	0,0013	0,0013	0,0044	10	10	3
Estrona	0,00127	0,00392	0,00849	0,0022	0,0126	0,0218	3	4	3
Estradiol	0,00207	0,00803	0,01335	0,0034	0,0127	0,0168	14	12	8
Etinilestradiol	0,00496	0,00413	0,03621	0,0084	0,0070	0,0404	3	1	3
Progesterona	0,00352	0,05082	0,06685	0,0100	0,0590	0,1820	4	4	3
Coprostanol	0,00197	0,00817	0,01820	0,0050	0,0280	0,0280	6	8	3
Colesterol	0,00944	0,03180	0,01287	0,0250	0,0600	0,0470	18	9	4
Colestanol	0,00207	0,00197	0,01098	0,0050	0,0100	0,0180	7	3	3

Todos os compostos apresentaram coeficiente de variação abaixo de 20%, conforme recomendado pela literatura (RIBANI, 2004). Já o critério de aceitação para repetibilidade estabelecido pelo INMETRO (2017) é de 11% para 1 ppm, 15% para 100 ppb, 21% para 10 ppb e 30% para 1 ppb. Para todos os compostos as diferenças entre cada uma das replicatas foi menor que os limites de repetibilidade estabelecidos, podendo-se, portanto, considerar que o método é preciso.

6.1.5 Limites de detecção e quantificação . matriz de material em suspensão

Para obter os valores de limite de determinação (LD), o cálculo foi realizado conforme a equação descrita no Capítulo 3, e o procedimento utilizado foi mencionado no Capítulo 5 desta dissertação. Para o limite de quantificação (LQ), foi utilizada a equação apresentada no item 3.5.4 do Capítulo 3.

Os limites de detecção e quantificação do método, apresentados na Tabela 17, são em relação à filtração de 1L de amostra.

Em função da sensibilidade do equipamento ser diferente para cada composto e variar também para cada matriz, os limites alcançados são distintos.

Tabela 17 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método para cada composto em matriz de material em suspensão na coluna de água de amostras coletadas no entorno do RMB.

Compostos	LD µg L⁻¹	LQ µg L⁻¹
Dietilftalato	0,0004	0,0034
Nonilfenol	0,0001	0,0022
Cafeína	0,0048	0,0550
Dibutilftalato	0,0017	0,0051
Androstano	0,0035	0,0143
Bisfenol A	0,0002	0,0025
Estrona	0,0013	0,0049
Estradiol	0,0030	0,0260
Etinilestradiol	0,0070	0,0593
Progesterona	0,0089	0,1152
Coprostanol	0,0043	0,0108
Colesterol	0,0126	0,0305
Colestanol	0,0016	0,0080

6.1.6 Recuperação . matriz de material em suspensão

Conforme descrito no item 5.6.7 do Capítulo 5 desta dissertação de mestrado, foi feita a adição padrão na matriz antes da extração em ultrassom, seguindo-se o procedimento estabelecido, descrito no item 5.2.1, em triplicata e em três níveis de concentração: baixa (primeiro ponto da faixa de trabalho), média (concentração no meio da faixa) e alta (último ponto da faixa de trabalho). Foram realizados os mesmos experimentos com a determinação da concentração do analito adicionado após todas as etapas do método. O cálculo de recuperação foi realizado segundo equação 15 do Capítulo 3 desta dissertação.

Para que o método seja considerado adequado à análise proposta para de compostos orgânicos, a recuperação deve estar na faixa de 70 a 120%, com precisão em torno de 20%. Quando a matriz é complexa, são aceitos valores entre 50 e 120%, com precisão em torno de 15% (RIBANI, 2004; INMETRO, 2017).

Neste trabalho, a maioria dos os valores de recuperação obtidos utilizando o método final se encontrou na faixa de 70 a 100% indicando uma adequada recuperação do método desenvolvido, como se pode observar nas Tabelas 18, 19 e 20 para as concentrações baixa, média e alta respectivamente.

Tabela 18 - Valores de recuperação obtidos para concentração baixa no método final estabelecido.

Composto	% Média da Recuperação	Concentração	
		adicionada	recuperada
Dietilftalato	101	0,0040	0,0040
Nonilfenol	98	0,0040	0,0039
Cafeína	66	0,050	0,0329
Dibutilftalato	100	0,0040	0,0040
Androstano	62	0,0180	0,0111
Bisfenol A	76	0,0030	0,0023
Estrona	53	0,0250	0,0132
Estradiol	50	0,0250	0,0125
Etinilestradiol	172	0,0300	0,0516
Progesterona	110	0,1120	0,1234
Coprostanol	35	0,0300	0,0104
Colesterol	66	0,0550	0,0364
Colestanol	112	0,0250	0,0281

Tabela 19 - Valores de recuperação obtidos para concentração média no método final estabelecido.

Composto	% Média da Recuperação	Concentração	
		adicionada	recuperada
Dietilftalato	92	0,0200	0,0184
Nonilfenol	108	0,0320	0,0345
Cafeína	68	0,250	0,1693
Dibutilftalato	109	0,0200	0,0218
Androstano	71	0,0900	0,0639
Bisfenol A	110	0,0200	0,0221
Estrona	100	0,1200	0,1199
Estradiol	76	0,1200	0,0915
Etinilestradiol	94	0,1440	0,1347
Progesterona	92	0,5600	0,5129
Coprostanol	60	0,1440	0,0858
Colesterol	58	0,2640	0,1527
Colestanol	56	0,1200	0,0676

Tabela 20 - Valores de recuperação obtidos para concentração alta no método final estabelecido.

Composto	% Média da Recuperação	Concentração	
		adicionada	recuperada
Dietilftalato	83	0,0400	0,0331
Nonilfenol	77	0,0800	0,0616
Cafeína	61	0,500	0,3053
Dibutilftalato	103	0,0400	0,0413
Androstano	55	0,1800	0,0991
Bisfenol A	98	0,0500	0,0491
Estrona	98	0,2500	0,2459
Estradiol	75	0,2500	0,1868
Etinilestradiol	108	0,3000	0,3233
Progesterona	86	1,1200	0,9650
Coprostanol	61	0,3000	0,1822
Colesterol	90	0,5500	0,4973
Colestanol	66	0,2500	0,1639

A matriz de material em suspensão pode ser considerada complexa referente aos compostos avaliados nesta dissertação. Dessa forma, conforme já mencionado, são aceitos valores entre 50 e 120%. Para alguns compostos foram observados valores de recuperação entre 50 e 70%, como por exemplo Cafeína, Androstano, Estrona, Coprostanol, Colesterol e Colestanol. Para o Coprostanol em concentrações baixas, não deverão quantificadas as amostras por não terem sido obtidos valores de recuperação satisfatórios utilizando esta metodologia.

6.1.7 Estimativa das incertezas de medição . matriz de material em suspensão

A estimativa da incerteza de medição avaliada para a concentração média da faixa de trabalho de cada composto é apresentada neste item como exemplo, porém é calculada para todos os resultados reportados.

Para a estimativa da incerteza de medição do método de extração dos compostos de interesse na matriz de material em suspensão na coluna de água foram consideradas as grandezas de entrada da curva de calibração, recuperação e volume final, de acordo com o avaliado na Figura 32 (diagrama de Ishikawa) do Capítulo 5 desta dissertação de mestrado.

A seguir, nas Figuras 56 a 60 são apresentadas as contribuições das grandezas de entrada para cada um dos compostos, considerando resultados na faixa de concentração de pontos médios das curvas de calibração.

Figura 56 - Representação gráfica das incertezas envolvidas na metodologia desenvolvida para determinação dos compostos Dietilftalato, Nonilfenol e Cafeína em matriz de material em suspensão da região do RMB.

Fonte: autora.

Figura 57 - Representação gráfica das incertezas envolvidas na metodologia desenvolvida para determinação dos compostos Dibutilftalato, Androstano e Bisfenol A em matriz de material em suspensão da região do RMB.

Figura 58 - Representação gráfica das incertezas envolvidas na metodologia desenvolvida para determinação dos compostos Estrona, Estradiol e Etinilestradiol em matriz de material em suspensão da região do RMB.

Fonte: autora.

Figura 59 - Representação gráfica das incertezas envolvidas na metodologia desenvolvida para determinação dos compostos Progesterona, Coprostanol e Colesterol em matriz de material em suspensão da região do RMB.

Fonte: autora.

Figura 60 - Representação gráfica das incertezas envolvidas na metodologia desenvolvida para determinação de Colestanol em matriz de material em suspensão da região do RMB.

Foi possível observar que a maior contribuição da incerteza está relacionada à curva calibração e à recuperação. A contribuição da incerteza relacionada volume inicial da amostra é desprezível podendo ser desconsiderada no cálculo da Incerteza expandida. Em relação ao volume final, apesar de ser o mesmo para todos os compostos, pode parecer mais ou menos significativo de acordo com o valor das demais incertezas para cada composto especificamente.

Pelos resultados obtidos demonstra-se que a faixa de variação da incerteza é de 0,5 a 20% o que sugere uma contribuição dentro do esperado de acordo com a literatura (HORWITZ, 2006; MARTINS, 2014).

No Anexo 1 são apresentados os cálculos detalhados das contribuições de cada grandeza de entrada na incerteza para os compostos avaliados na matriz de material em suspensão considerando o ponto médio da faixa de trabalho.

6.2 Resultados dos testes para otimização da metodologia para a matriz água

Como já citado no Capítulo 5 desta dissertação, a metodologia para extração dos compostos de estudo em matrizes de água superficial e subterrânea foi desenvolvida e validada por Otomo (2015). Para esta dissertação, foram revalidados alguns parâmetros importantes como linearidade, precisão e exatidão.

Também foram feitos pequenos ajustes a fim de adaptar o método para as amostras coletadas na área de estudo em questão. Neste item são apresentados e discutidos os resultados desses ensaios.

6.2.1 Resultados do estudo para avaliação da eficiência dos cartuchos Strata C₁₈ e Strata X.

Os resultados obtidos para os testes de eficiência dos cartuchos podem ser observados na Figura 61.

Figura 61 Representação gráfica dos resultados do estudo da eficiência dos cartuchos Strata C₁₈ e Strata X na metodologia desenvolvida para determinação de Dietilftalato, Dibutilftalato, Nonilfenol, Bisfenol-A, Androstano, Estrona, Estradiol, Etinilestradiol, Progesterona, Coprostanol, Colesterol e Colestanol em água.

Fonte: autora

Na Figura 61, observam-se, na cor alaranjada, as áreas de cada composto obtido no extrato do cartucho Strata X e na cor azul o que não foi adsorvido pelo cartucho, mas ficou retido no cartucho C18.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que o cartucho Strata X não extrai completamente todos os compostos de estudo, visto que a mesma amostra já percolada, também apresenta resultados no cartucho C18. Embora, o cartucho Strata X seja mais indicado para os estrógenos e se possa verificar a eficiência para os compostos estrona, estradiol, etinilestradiol, nonilfenol, cafeína e progesterona, o cartucho C₁₈ também extrai totalmente todos os compostos, além deste último ser mais barato e fácil de adquirir que o Strata X.

Conclui-se, portanto, que não há necessidade de alteração na metodologia para uso do Strata X, mesmo sendo o mais indicado para alguns dos compostos estudados, sendo que o C₁₈ extrai de forma semelhante todos os compostos.

6.2.2 Estudo da afinidade dos compostos estudados com a parte sólida da coluna d'água.

Silva (2015), autora desta dissertação, em pesquisa anterior realizada no trabalho de Iniciação Científica de 2012 a 2014, obteve resultados com os quais foi possível entender a dinâmica dos compostos estudados em relação à afinidade com o particulado sólido das amostras de água. Foi possível observar que dietilftalato, bisfenol-A, progesterona e etinilestradiol apresentaram baixíssima ou nenhuma afinidade com a parte sólida. Coprostanol, colesterol e colestanol apresentaram forte afinidade com a parte sólida. Já para os demais compostos estudados foi observada uma afinidade moderada com a parte sólida, ficando distribuídos entre água e material em suspensão. Este fato é corroborado pelos valores dos coeficientes de partição octanol/água ($\log K_{ow}$). De acordo com valores de $\log K_{ow}$ apresentados na Tabela 1, do item 3.2.2 desta dissertação de mestrado, muitos dos compostos avaliados neste trabalho, com $\log K_{ow}$ menores que 4, por exemplo, possuem mais afinidade com o material sólido do que com a água, portanto é esperado que estes compostos fiquem retidos no material em suspensão na coluna d'água e sigam para deposição no sedimento de fundo.

6.3 Resultados da revalidação de parâmetros para a matriz água

Embora a metodologia para determinação dos compostos estudados na matriz de água, desenvolvida por OTOMO (2015) tenha sido validada anteriormente, os parâmetros linearidade, exatidão e precisão foram revalidados para as amostras da região estudada na presente dissertação de mestrado, de acordo com o estabelecido no item 5.7 do Capítulo 5 desta dissertação.

Os resultados da revalidação de alguns dos parâmetros de interesse para o método de extração dos compostos estudados em matriz água da região do RMB são apresentados a seguir.

6.3.1 Linearidade . matriz água

Na Tabela 21 são apresentados os resultados do coeficiente de determinação para avaliação do parâmetro linearidade para os ensaios de revalidação da matriz água da região do RMB.

Tabela 21 - Valores de coeficiente de determinação (r^2) dos compostos estudados para a matriz de água da região estudada (RMB) e comparação com o método original.

Composto	r^2	r^2 do método original (OTOMO, 2015)
Dietilftalato	0,996	0,997
Nonilfenol	0,999	0,979
Cafeína	0,994	-
Dibutilftalato	0,990	0,989
Androstano	0,981	0,982
Bisfenol A	0,999	0,996
Estrona	0,993	0,978
Estradiol	0,986	0,993
Etinilestradiol	0,994	0,976
Progesterona	0,998	0,997
Coprostanol	0,996	0,992
Colesterol	0,999	0,977
Colestanol	0,997	0,999

Assim como os resultados para o material em suspensão, foram obtidos valores de r^2 superiores a 0,98 para as amostras de água para todos os compostos

estudados, atendendo assim as exigências tanto do INMETRO como da ANVISA para constatar a linearidade do método. Além disso, para 4 dos 13 compostos foram obtidos coeficientes maiores que 0,998 e podem ser considerados evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (INMETRO, 2003; RIBANI, 2014; INMETRO, 2017). Na Tabela 21, comparando os resultados da revalidação com os obtidos por Otomo (2015), observa-se que os valores foram muito semelhantes, o que indica que a metodologia originalmente proposta continua proporcionando linearidade para aplicação na área de estudo proposta neste trabalho de mestrado.

6.3.2 Exatidão . matriz água

Os valores de z obtidos no ensaio com matriz de água da região do RMB apresentaram-se abaixo de 2 para todos os compostos, conforme observado nos resultados apresentados na Tabela 22. Para seleção das concentrações das faixas baixa, média e alta, foi utilizado o mesmo critério que para a matriz de material suspenso na coluna de água.

Tabela 22 - Valores de z Score para os compostos estudados no ensaio com matriz de água da região do RMB para três níveis de concentração.

Composto	Matriz água z Score para concentração baixa	Matriz água z Score para concentração média	Matriz água z Score para concentração alta
Dietilftalato	1,16	1,05	0,23
Nonilfenol	1,91	0,46	0,05
Cafeína	0,91	0,25	0,51
Dibutilftalato	0,49	0,40	0,56
Androstano	1,19	1,41	0,21
Bisfenol A	0,98	0,94	0,09
Estrona	0,84	1,20	0,04
Estradiol	0,21	0,58	0,01
Etinilestradiol	0,53	0,28	0,22
Progesterona	0,78	1,15	0,27
Coprostanol	1,06	0,03	0,18
Colesterol	1,11	0,26	1,25
Colestanol	0,34	1,17	0,29

Assim como os resultados de *z Score* para o material em suspensão, os valores obtidos para as amostras de água evidenciam que os resultados são satisfatórios em sua maioria, por serem inferiores a 2.

6.3.3 Precisão . matriz água

Os resultados do parâmetro precisão estão apresentados na Tabela 23, onde pode ser observado que todos os compostos apresentaram coeficiente de variação abaixo de 20%, obedecendo aos critérios estabelecidos pela literatura (RIBANI, 2004; INMETRO, 2017). São apresentados também os limites de repetibilidade e reprodutibilidade estabelecidos para os compostos estudados, para os quais nenhuma das diferenças entre cada uma das replicatas foi maior que os limites estabelecidos. Considerou-se, portanto, no processo de revalidação, que o método continua preciso para a matriz de água da região RMB.

Tabela 23 - Resumo dos resultados do teste de Repetibilidade, Reprodutibilidade e coeficiente de variação para os compostos estudados na matriz de água da região do RMB.

Composto	Reprodutibilidade - R			Repetibilidade - r			CV %		
	Baixa	Média	Alta	Baixa	Média	Alta	Baixa	Média	Alta
Dietilftalato	0,0014	0,0018	0,006	0,0189	0,0004	0,0109	3	3	4
Nonilfenol	0,00002	0,0008	0,033	0,0236	0,0027	0,0101	1	5	3
Cafeína	0,0249	0,0279	0,0426	0,2465	0,0304	0,0692	7	2	6
Dibutilftalato	0,0003	0,0006	0,0034	0,0071	0,0033	0,0014	3	5	3
Androstano	0,0042	0,0043	0,0030	0,0154	0,0029	0,0009	3	2	2
Bisfenol A	0,0009	0,0017	0,0009	0,0281	0,0005	0,0062	2	6	3
Estrona	0,0079	0,0090	0,0146	0,1008	0,0083	0,0216	5	4	6
Estradiol	0,0104	0,0136	0,0145	0,0772	0,0076	0,0485	3	5	8
Etinilestradiol	0,0107	0,0143	0,0194	0,0853	0,0090	0,0532	7	8	8
Progesterona	0,0071	0,0131	0,0538	0,1485	0,0257	0,0546	5	6	7
Coprostanol	0,0067	0,0091	0,1041	0,1958	0,0768	0,1132	3	7	4
Colesterol	0,0181	0,0233	0,0354	0,2109	0,0257	0,1220	3	2	5
Colestanol	0,0138	0,0186	0,0236	0,1489	0,0173	0,0863	5	2	5

6.4 Resultados das análises das amostras coletadas na área de estudo

A seguir, são apresentados os resultados obtidos pela quantificação das amostras coletadas na área de estudo nos períodos de 03 a 05 de outubro de 2016, 19 a 21 de junho de 2017 e 16 a 18 de outubro de 2017.

6.4.1 Resultados para a coleta realizada em outubro de 2016

As amostras de águas superficiais e subterrâneas coletadas nos dias 3, 4 e 5 de outubro de 2016 foram filtradas, concentradas e analisadas de acordo com a metodologia descrita no item 5.3 do Capítulo 5 desta dissertação. Esta campanha de coleta foi uma estação muito seca. Os resultados das concentrações obtidas para cada composto orgânico analisado foram compilados e podem ser observados nas Tabelas 24 e 25. Esses resultados são a média de 3 determinações mais a incerteza expandida, reportados em $\mu\text{g L}^{-1}$.

Nas tabelas, os resultados em verde são os valores abaixo do Limite de detecção (LD) ou não detectados e os em amarelo são os valores entre o limite de detecção e o limite de quantificação (LQ).

De acordo com os resultados da Tabela 24, foi possível observar baixas concentrações dos compostos dietilftalato, dibutilftalato e cafeína nas amostras de água de todos os pontos de coleta e bisfenol-A em 50% destes. Nos pontos PC3-120m e PC3-130m, os resultados um pouco mais elevados para o dietilftalato de $0,30 \pm 0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,24 \pm 0,02 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, poderiam ser justificados principalmente pelo material utilizado na confecção do reservatório de água que pode conter plástico, ou também porque estes locais têm maior atividade antropogênica devido ao grande fluxo de visitantes na área. A observação visual e os dados obtidos no campo, no momento da coleta, ajudam na compreensão do impacto que a ocupação urbana oferece para a qualidade das águas da região. Nas amostras de água do ponto P7, foram detectados valores significativos de colesterol ($0,32 \pm 0,02 \mu\text{g L}^{-1}$) e de seu derivado colestanol ($0,023 \pm 0,002 \mu\text{g L}^{-1}$), além de coprostanol ($0,27 \pm 0,02 \mu\text{g L}^{-1}$), indicativo de que nas proximidades deste ponto há descarte de esgoto doméstico sem tratamento. Foi possível verificar também que alguns compostos como nonilfenol foi detectado em diferentes pontos, com valores abaixo do limite de quantificação, porém acima do limite de detecção, o que

significa pequena contaminação, mesmo que baixa, em relação a este composto. As concentrações encontradas, dos compostos acima mencionados, são indicadores de atividades antropogênicas, portanto é importante que haja continuidade no monitoramento, pois contribuem para o empobrecimento da qualidade da água na região.

Na Tabela 25 são apresentados os resultados para o material em suspensão das mesmas amostras de água coletadas em outubro de 2016. Os compostos analisados foram obtidos pela extração das membranas filtrantes PTFE e são apresentados em $\mu\text{g L}^{-1}$, equivalentes à filtração de 1 L de água para cada amostra. Os resultados reportados são a média de 3 determinações mais a incerteza expandida.

Nos resultados da Tabela 25, foi possível observar baixas concentrações de dietilftalato ($0,009 \pm 0,002 \mu\text{g L}^{-1}$ a $0,022 \pm 0,002 \mu\text{g L}^{-1}$) nas amostras de material suspenso na coluna de água de todos os pontos de coleta. Foi possível verificar também, na Tabela 25 destacados em amarelo, que alguns compostos como nonilfenol, bisfenol e cafeína foram detectados em diferentes pontos, com valores abaixo do limite de quantificação. Colesterol foi quantificado em dois pontos, P7 e P8, em baixas concentrações.

Tabela 24 - Resultados das análises das amostras águas coletadas em outubro de 2016 na área de instalação do RMB e seu entorno.

Código do ponto no projeto		001RMB	002RMB	004RMB	003RMB	009RMB	007RMB	008RMB	005RMB	006RMB	010RMB
Localização		Ribeirão do Ferro, a montante	Ribeirão do Ferro, a jusante	Rio Sorocabá, a jusante	Rio Sorocabá, a montante	Faz. São Benedito	Faz. Ipanema Poço Lago 120m	Faz. Ipanema Poço Viveiros 130m	Faz. São Benedito	Córrego IBAMA	SABESP Sarapuí
Id. local da amostra		PC2	P6	P7	P8	P9	PC3-120m	PC3-130m	LAGO	IBAMA	SABESP
Composto	LD $\mu\text{g L}^{-1}$	LQ $\mu\text{g L}^{-1}$	Concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$								
Dietilftalato	0,0004	0,0017	0,037±0,005	0,08±0,01	0,056±0,004	0,23±0,03	0,30±0,03	0,24±0,02	0,08±0,01	0,054±0,004	0,18±0,01
Nonilfenol	0,0006	0,0024	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cafeína	0,0004	0,0030	0,80±0,03	0,92±0,05	0,021±0,001	< LQ	0,0052±0,0005	< LQ	< LQ	0,015±0,005	< LQ
Dibutylftalato	0,0006	0,0017	0,016±0,001	0,0050±0,0004	0,032±0,006	0,0074±0,0004	0,017±0,001	< LQ	0,0023±0,0004	0,027±0,005	< LQ
Androstano	0,0003	0,0047	< LQ	< LQ	0,12±0,01	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Bisfenol A	0,0001	0,0014	0,029±0,001	0,008±0,001	0,072±0,003	< LQ	0,019±0,003	0,007±0,001	< LQ	< LQ	0,011±0,001
Estrona	0,0005	0,0015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Estradiol	0,0002	0,0014	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Etinilestradiol	0,0002	0,0012	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Progesterona	0,0007	0,0112	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Coprostano	0,0002	0,0039	< LQ	0,27±0,02	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Colesterol	0,0006	0,0022	< LQ	0,32±0,02	< LQ	< LQ	0,017±0,002	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Colestanol	0,0002	0,0022	< LQ	0,023±0,002	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

LQ = Limite de quantificação
LD = Limite de detecção

Valores encontrados entre o LD e o LQ
Não detectados ou abaixo do LD

Tabela 25 - Resultados das análises das amostras do material em suspensão, coletados em outubro de 2016, na área de instalação do RMB.

Código do ponto no projeto		026RMB	027RMB	029RMB	028RMB	034RMB	032RMB	033RMB	030RMB	031RMB	035RMB
Localização		Ribeirão do Ferro, a montante	Ribeirão do Ferro, a jusante	Rio Sorocaba, a jusante	Rio Sorocaba, a montante	Faz. São Benedito	Faz. Ipanema Poço Lago 120m	Faz. Ipanema Poço Viveiros 130m	Faz. São Benedito	Córrego IBAMA	SABESP Sarapuí
Composto	Id. local da amostra	Concentração em µg L ⁻¹									
		LD µg L ⁻¹	P6	P7	P8	P9	PC3-120m	PC3-130m	LAGO	IBAMA	SABESP
Dietilftalato		0,0004	0,015±0,001	0,019±0,001	0,013±0,001	0,017±0,001	0,009±0,002	0,015±0,001	0,014±0,002	0,016±0,001	0,022±0,002
Nonilfenol		0,0001	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cafeína		0,0048	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Dibutylftalato		0,0017	0,027±0,002	0,018±0,001	0,010±0,001	0,017±0,001	< LQ	0,015±0,002	0,023 ± 0,001	0,009±0,001	0,019±0,002
Androstano		0,0035	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Bisfenol A		0,0002	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Estrona		0,0013	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Estradiol		0,0030	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Etinilestradiol		0,0070	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Progesterona		0,0089	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Coprostano		0,0043	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Colesterol		0,0126	< LQ	0,008±0,002	< LQ	< LQ	0,007±0,002	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Colestanol		0,0016	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

LQ = Limite de quantificação

LD = Limite de detecção

Valores encontrados entre o LD e o LQ

Não detectados ou abaixo do LD

6.5 Resultados para a coleta realizada em junho de 2017

Da mesma forma que para a coleta de 2016, as amostras coletadas em 19, 20 e 21 de junho de 2017 foram filtradas, concentradas e analisadas. Os resultados das concentrações para as amostras de água podem ser observados na Tabela 26 e para o material em suspensão retido nas membranas filtrantes das amostras coletadas na Tabela e 27. Todos os resultados representam a média de 3 determinações mais a incerteza expandida.

Na Tabela 26, foi possível observar que o dietilftalato e o dibutilftalato estiveram presentes nas amostras de água de todos os pontos de coleta em julho de 2017, embora este último em concentrações muito baixas. A cafeína foi detectada em 60% das amostras, sendo quantificada em 3 delas com valores entre $0,71 \pm 0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1,31 \pm 0,05 \mu\text{g L}^{-1}$, indicando atividade antropogênica. Nos pontos P7 e P8, como esperado, foram detectadas concentrações de colesterol e coprostanol em torno de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Androstano foi detectado em 80 % das amostras de água e, embora em concentrações não quantificáveis, já reforça a indicação de influência antropogênica, pois no material suspenso dessas amostras foram quantificados valores entre $0,016 \pm 0,002 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,035 \pm 0,003 \mu\text{g L}^{-1}$ para este composto.

Pelos resultados da Tabela 27, foi possível observar que os compostos dietilftalato, nonilfenol, dibutilftalato, androstano e bisfenol-A estiveram presentes em praticamente todas amostras de material em suspensão da coluna de água dos pontos de coleta de junho de 2017, mesmo que em concentrações muito pequenas, mas detectáveis. O colesterol foi quantificado em 80% das amostras com valores entre 0,07 e $0,56 \mu\text{g L}^{-1}$. O coprostanol foi detectado nos pontos P7 e P8 em concentrações de colesterol em torno de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 26 - Resultados das análises das amostras águas coletadas em junho de 2017 na área de instalação do RMB e seu entorno.

Código do ponto no projeto	001RMB	002RMB	004RMB	003RMB	009RMB	007RMB	008RMB	005RMB	006RMB	010RMB
Localização	Ribeirão do Ferro, a montante	Ribeirão do Ferro, a jusante	Rio Sorocaba, a jusante	Rio Sorocaba, a montante	Faz. São Benedito	Faz. Ipanema Pogo Lago 120m	Faz. Ipanema Pogo Viveiros 130m	Faz. São Benedito	Córrego IBAMA	SABESP Sarapuí
Id. local da amostra	PC2	P6	P7	P8	P9	PC3-120m	PC3-130m	LAGO	IBAMA	SABESP
Composto	LD µg L ⁻¹	LQ µg L ⁻¹	Concentração em µg L ⁻¹							
Dietiltalato	0,0004	0,0017	0,018±0,001	0,011±0,001	0,013±0,001	0,015±0,001	0,008±0,001	0,011±0,001	0,0067±0,0004	0,012±0,001
Nonilfenol	0,0006	0,0024	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cafeína	0,0004	0,0030	< LQ	< LQ	0,74±0,03	1,31±0,05	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Dibutiltalato	0,0006	0,0017	0,023±0,001	0,0037±0,0004	0,010±0,001	0,018±0,001	< LQ	< LQ	0,0066±0,0003	0,016±0,001
Androstano	0,0003	0,0047	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Bisfenol A	0,0001	0,0014	< LQ	< LQ	0,029±0,001	0,046±0,002	0,009±0,001	< LQ	0,0032±0,0005	0,13±0,01
Estrona	0,0005	0,0015	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Estradiol	0,0002	0,0014	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Etinilestradiol	0,0002	0,0012	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Progesterona	0,0007	0,0112	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Coprostanol	0,0002	0,0039	< LQ	< LQ	0,09±0,01	0,056±0,002	< LQ	< LQ	< LQ	0,18±0,01
Colesterol	0,0006	0,0022	< LQ	< LQ	0,09±0,02	0,14±0,01	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Colestanol	0,0002	0,0022	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

LQ = Limite de quantificação
LD = Limite de detecção

Valores encontrados entre o LD e o LQ
Não detectados ou abaixo do LD

Tabela 27 - Resultados das análises das amostras do material em suspensão, coletados em junho de 2017, na área de instalação do RMB.

Código do ponto no projeto		026RMB	027RMB	029RMB	028RMB	034RMB	032RMB	033RMB	030RMB	031RMB	035RMB
Localização		Ribeirão do Ferro, a montante	Ribeirão do Ferro, a jusante	Rio Sorocaba, a jusante	Rio Sorocaba, a montante	Faz. São Benedito	Faz. Ipanema Poço Lago 120m	Faz. Ipanema Poço Viveiros 130m	Faz. São Benedito	Córrego IBAMA	SABESP Sarapuí
Id. local da amostra		PC2	P6	P7	P8	P9	PC3-120m	PC3-130m	LAGO	IBAMA	SABESP
Composto	LD $\mu\text{g L}^{-1}$	LQ $\mu\text{g L}^{-1}$	Concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$								
Dietiltalato	0,0004	0,0034	< LQ	< LQ	0,0037±0,0003	< LQ	0,0038±0,0004	< LQ	< LQ	0,0042±0,0003	< LQ
Nonilfenol	0,0001	0,0022	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cafeína	0,0048	0,0550	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Dibutiltalato	0,0017	0,0051	0,061±0,005	0,035±0,002	0,18±0,02	0,052±0,003	0,0084±0,0005	0,11±0,01	0,0069±0,0005	0,017±0,001	0,014±0,001
Androstano	0,0035	0,0143	0,021±0,002	0,028±0,002	0,021±0,003	0,032±0,002	< LQ	< LQ	0,016±0,002	0,034±0,003	< LQ
Bisfenol A	0,0002	0,0025	< LQ	0,006±0,001	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Estrona	0,0013	0,0049	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Estradiol	0,0030	0,0260	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Étinilestradiol	0,0070	0,0593	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Progesterona	0,0089	0,1152	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Coprostanol	0,0043	0,0108	< LQ	0,061±0,002	0,053±0,002	< LQ	< LQ	< LQ	0,011±0,001	< LQ	< LQ
Colesterol	0,0126	0,0305	0,36±0,05	0,42±0,04	0,36±0,03	0,24±0,03	< LQ	0,07±0,02	0,03±0,01	0,13±0,03	< LQ
Colestanol	0,0016	0,0080	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

LQ = Limite de quantificação
LD = Limite de detecção

Valores encontrados
entre o LD e o LQ

Não detectados ou
abaixo do LD

Observando os resultados obtidos apresentados nas Tabelas 26 e 27 é possível observar que a maioria dos compostos tem maior afinidade com o compartimento água porque os resultados foram maiores nas amostras de água do que em material em suspensão considerando os mesmos pontos para ambas as amostras. Com exceção dos esteróis (coprostanol, colestanol e colesterol), nonilfenol e androstano que normalmente apresentaram maior afinidade com o material em suspensão os demais tendem a se distribuir entre as duas matrizes.

Este fato corrobora com os resultados dos estudos apresentados no item 6.2.2 deste mesmo Capítulo 6, referentes à pesquisa anterior, na qual se verificou que estes compostos realmente têm maior afinidade com o compartimento água.

O fato de alguns compostos estarem mais presentes nas amostras de água também pode ser um indicativo de uma contaminação mais recente.

6.5.1 Resultados para a coleta realizada em outubro de 2017

As amostras de águas superficiais e subterrâneas coletadas nos dias 16, 17 e 18 de outubro de 2017 foram filtradas, concentradas e analisadas de acordo com a metodologia descrita acima. Esta campanha de coleta foi uma estação muito quente e seca. Os resultados das concentrações obtidas para cada composto orgânico analisado foram compilados e podem ser observados nas Tabelas 28 e 29. Esses resultados são a média de 3 determinações mais a incerteza expandida.

Tabela 28 - Resultados das análises das amostras águas coletadas em outubro de 2017 na área de instalação do RMB e seu entorno.

Código do ponto no projeto	001RMB	002RMB	004RMB	003RMB	009RMB	007RMB	008RMB	005RMB	006RMB	010RMB
Localização	Ribeirão do Ferro, a montante	Ribeirão do Ferro, a jusante	Rio Sorocabá, a jusante	Rio Sorocabá, a montante	Faz. São Benedito	Faz. Ipanema Poço Lago 120m	Faz. Ipanema Poço Viveiros 130m	Faz. São Benedito	Córrego IBAMA	SABESP Sarapuí
Id. local da amostra	PC2	P6	P7	P8	P9	PC3-120m	PC3-130m	LAGO	IBAMA	SABESP
Composto	LD µg L ⁻¹	LQ µg L ⁻¹	Concentração em µg L ⁻¹							
Dietilftalato	0,0004	0,0017	0,0064±0,0004	0,0027±0,0004	0,0031±0,0003	0,0021±0,0003	0,0031±0,0003	0,0069±0,0004	0,0040±0,0004	0,0032±0,0004
Nonilfenol	0,0006	0,0024	< LQ	< LQ	0,004±0,001	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cafeína	0,0004	0,0030	0,22±0,01	< LQ	0,07±0,01	0,04±0,01	0,025±0,007	0,14±0,01	0,003±0,01	0,017±0,005
Dibutylftalato	0,0006	0,0017	0,0055±0,0003	0,003±0,0004	0,0037±0,0003	0,0018±0,0003	0,0045±0,0004	0,009±0,001	0,0058±0,0003	0,0100±0,0004
Androstano	0,0003	0,0047	< LQ	< LQ	0,023±0,003	< LQ	0,07±0,02	0,020±0,003	0,006±0,002	0,006±0,002
Bisfenol A	0,0001	0,0014	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,030±0,002	< LQ	< LQ	0,010±0,001
Estrona	0,0005	0,0015	< LQ	0,09±0,01	0,08±0,01	0,07±0,01	< LQ	0,13±0,01	0,05±0,01	0,05±0,01
Estradiol	0,0002	0,0014	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,011±0,004
Etinilestradiol	0,0002	0,0012	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Progesterona	0,0007	0,0112	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Coprostanol	0,0002	0,0039	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Colesterol	0,0006	0,0022	6,6±0,3	0,007±0,003	1,4±0,1	7,6±0,3	1,7±0,2	1,0±0,1	8,1±0,4	< LQ
Colestanol	0,0002	0,0022	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,30±0,03	< LQ

LQ = Limite de quantificação
LD = Limite de detecção

Valores encontrados entre o LD e o LQ

Não detectados ou abaixo do LD

Nos resultados da Tabela 28 para matriz de água, foi possível observar que os compostos dietilftalato (entre $0,0021 \pm 0,0003 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,0069 \pm 0,0004 \mu\text{g L}^{-1}$), dibutilftalato (entre $0,0020 \pm 0,0003 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,0100 \pm 0,0004 \mu\text{g L}^{-1}$), e cafeína (entre $0,010 \pm 0,002 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,22 \pm 0,01 \mu\text{g L}^{-1}$), estiveram presentes nas amostras de água de todos os pontos de coleta em outubro de 2017, quantificados em 80% destas. Androstano foi detectado em 90 % das amostras e quantificado em 70% delas em concentrações entre $0,006 \pm 0,002 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,07 \pm 0,02 \mu\text{g L}^{-1}$. Além disso foram detectados estradiol e estrona (em 70% das amostras e quantificada em 50%). O colesterol foi detectado em 80% das amostras analisadas, em uma faixa de concentração de $0,007 \pm 0,003 \mu\text{g L}^{-1}$ a $8,1 \pm 0,4 \mu\text{g L}^{-1}$.

Na Tabela 29 foi possível observar que os compostos dietilftalato e dibutilftalato foram detectados nas amostras de material em suspensão na coluna d'água de todos os pontos de coleta em outubro de 2017, porém apenas a amostra do ponto PC3-120m, localizado na FLONA, foi quantificado, ambos com concentração em torno de $0,012 \mu\text{g L}^{-1}$. Androstano foi quantificado em 80 % das amostras na faixa de concentração de aproximadamente $0,023 \pm 0,004 \mu\text{g L}^{-1}$ a $0,056 \pm 0,004 \mu\text{g L}^{-1}$. Bisfenol-A esteve presente em 70% das amostras analisadas, em concentrações de $0,0039 \pm 0,0004 \mu\text{g L}^{-1}$ a $0,14 \pm 0,01 \mu\text{g L}^{-1}$. Foi quantificado o composto estrona nos pontos de coleta Ibama e Sabesp, com $0,12 \pm 0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,016 \pm 0,003 \mu\text{g L}^{-1}$, além de estradiol na amostra do Lago da Fazenda São Benedito quantificada em $0,09 \pm 0,01 \mu\text{g L}^{-1}$. Colesterol foi quantificado em 5 pontos de coleta na faixa de $0,7 \pm 0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ a $2,4 \pm 0,4 \mu\text{g L}^{-1}$, colestanol em 5 pontos (entre $0,21 \pm 0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,5 \pm 0,1 \mu\text{g L}^{-1}$), além de coprostanol nos pontos P7 e P8 ($1,5 \pm 0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ e $3,9 \pm 0,2 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente), que é um marcador antrópico, indicador de despejo de esgoto. Estes resultados indicam influência antropogênica.

Tabela 29 - Resultados das análises das amostras do material em suspensão, coletados em outubro de 2017, na área de instalação do RMB.

Código do ponto no projeto	026RMB	027RMB	029RMB	028RMB	034RMB	032RMB	033RMB	030RMB	031RMB	035RMB
Localização	Ribeirão do Ferro, a montante	Ribeirão do Ferro, a jusante	Rio Sorocaba, a jusante	Rio Sorocaba, a montante	Faz. São Benedito	Faz. Ipanema Poco Lago 120m	Faz. Ipanema Poco Viveiros 130m	Faz. São Benedito	Córrego IBAMA	SABESP Sarapuí
Id. local da amostra	PC2	P6	P7	P8	P9	PC3-120m	PC3-130m	LAGO	IBAMA	SABESP
Composto	LD µg L ⁻¹	LQ µg L ⁻¹	Concentração em µg L ⁻¹							
Dietilftalato	0,0004	0,0034	< LQ	< LQ	< LQ	0,013±0,001	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Nonilfenol	0,0001	0,0022	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Cafeína	0,0048	0,0550	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Dibutilftalato	0,0017	0,0051	< LQ	< LQ	< LQ	0,012±0,001	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Androstano	0,0035	0,0143	0,027±0,003	0,034±0,003	0,045±0,003	0,056±0,004	0,042±0,03	< LQ	0,023±0,004	0,029±0,003
Bisfenol A	0,0002	0,0025	0,013±0,001	0,011±0,001	< LQ	< LQ	< LQ	0,14±0,01	0,17±0,01	0,015±0,001
Estrona	0,0013	0,0049	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,12±0,01
Estradiol	0,0030	0,0260	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,09±0,01	< LQ	< LQ
Etinilestradiol	0,0070	0,0593	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Progesterona	0,0089	0,1152	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Coprostanol	0,0043	0,0108	< LQ	1,5±0,1	< LQ	3,9±0,2	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Colesterol	0,0126	0,0305	< LQ	0,7±0,1	< LQ	1,3±0,2	< LQ	2,0±0,3	1,51±0,3	2,4±0,4
Colestanol	0,0016	0,0080	< LQ	0,4±0,1	0,22±0,05	0,5±0,1	0,21±0,05	< LQ	< LQ	< LQ

LQ = Limite de quantificação
LD = Limite de detecção

Valores encontrados entre o LD e o LQ
Não detectados ou abaixo do LD

6.5.2 Avaliação dos resultados por ponto de coleta

Nas Figuras 62 a 71, são apresentados os gráficos de evolução dos compostos estudados em cada ponto de coleta considerando as três campanhas realizadas. Os gráficos a seguir são apresentados com uma quebra de escala para fosse possível visualizar os resultados de todos os compostos, pois alguns resultados são muito pequenos em relação a outros de maior concentração, como por exemplo, colesterol, cafeína, coprostanol e colestanol.

Figura 62 - Distribuição espacial dos compostos estudados em amostras de água e material em suspensão do ponto de coleta PC2 nas coletas de outubro de 2016, junho e outubro de 2017.

Fonte: autora.

Figura 63 - Distribuição espacial dos compostos estudados em amostras de água e material em suspensão do ponto de coleta P6 nas coletas de outubro de 2016, junho e outubro de 2017.

Fonte: autora.

O PC2 (Figura 62) e o P6 (Figura 63), são os pontos localizados no Rio Ribeirão do Ferro, a montante e a jusante respectivamente do empreendimento RMB. É um rio pequeno e relativamente limpo, porém já se notam pequenas concentrações de resíduos plásticos pela presença de dietilftalato, dibutilftalato e bisfenol-A, além de cafeína já em 2016 na primeira coleta. Em junho de 2017, em um período atipicamente seco, observa-se uma concentração significativa de colesterol. Em outubro de 2017, apesar de a coleta ter sido realizada em um período chuvoso, é possível observar uma contaminação de cafeína na matriz de água e

colestanol no material suspenso da coluna d'água, indicadores de atividades antrópicas. Apesar da presença desses compostos, o Ribeirão do Ferro ainda se encontra preservado, visto que a maioria dos resultados observados estão abaixo de $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$, exceto a cafeína em outubro de 2016 no ponto P6 e o colesterol que apresentou concentrações próximas de $7 \mu\text{g L}^{-1}$ no ponto PC2 na última coleta na matriz de água, o que pode significar uma contaminação mais recente. Este é um local de fácil acesso a animais, o que pode ter influenciado nas concentrações obtidas para colesterol, embora a amostra tenha sido coletada de acordo com o procedimento estabelecido.

Figura 64 - Distribuição espacial dos compostos estudados em amostras de água e material em suspensão do ponto de coleta P7 nas coletas de outubro de 2016, junho e outubro de 2017.

Fonte: autora.

Figura 65 - Distribuição espacial dos compostos estudados em amostras de água e material em suspensão do ponto de coleta P8 nas coletas de outubro de 2016, junho e outubro de 2017.

Fonte: autora.

Os pontos P7 (Figura 64) e P8 (Figura 65) estão localizados no Rio Sorocaba, respectivamente a jusante e a montante do ponto de descarga do Ribeirão do Ferro. Este corpo de água apresenta contaminação ao longo de todo o ano. Nas margens do rio no ponto P8, foi possível observar fezes de animais entre diferentes poluentes como plásticos, papéis, restos de cigarros, entre outros. Já no ponto P7 observaram-se pastos e residências no seu entorno; justificando assim,

presença significativa de Coprostanol, Colesterol e Coletanol no material em suspensão para este ponto de coleta, além de ter sido detectada uma gama mais ampla dos compostos estudados, principalmente em épocas mais secas como junho de 2017. Dos 13 compostos estudados, 10 foram detectados e quantificados.

Na coleta de outubro de 2017, foi possível observar, nos pontos P6 e P7, para o colesterol quantificado nas amostras de água, uma possível contaminação recente. É possível descartar contaminação no procedimento, pois as amostras foram analisadas todas em sequência, e no mesmo dia, não apresentando elevada concentração de colesterol para os demais pontos, nem nos brancos de procedimento. Descarta-se também a possibilidade de contaminação de colesterol na coleta, pois as amostras foram manuseadas utilizando-se luvas. É importante observar que nestes pontos, onde se usam luvas, não houve contaminação significativa de ftalatos, portanto é possível verificar que os procedimentos de coleta e preparo de amostras não são passíveis de inserir contaminação ao processo. Restando apenas a hipótese de que a contaminação de colesterol é inerente à amostra e provavelmente é recente.

Figura 66 - Distribuição espacial dos compostos estudados em amostras de água e material em suspensão do ponto de coleta P9 nas coletas de outubro de 2016, junho e outubro de 2017.

Fonte: autora.

Figura 67 - Distribuição espacial dos compostos estudados em amostras de água e material em suspensão do ponto de coleta LAGO nas coletas de outubro de 2016, junho e outubro de 2017.

Fone: autora.

O ponto P9 (Figura 66) é de água subterrânea e o ponto LAGO (Figura 67) água superficial, ambos localizados em área restrita dentro da Fazenda São Benedito. Embora as concentrações encontradas sejam baixas, para a maioria dos compostos, já se notam contaminações indicadoras de atividade antrópica. A presença de cafeína na coleta de junho no ponto do LAGO é uma indicação de interferência antrópica na área. Na coleta de outubro de 2017 houve uma contaminação maior de colesterol no ponto LAGO, tanto na água como no material em suspensão. Este ponto deverá ser melhor avaliado nas próximas coletas,

durante o programa de monitoramento, pois esse ponto não é característico de descarte de esgoto, porém a fazenda São Benedito tem criação de gado, o que pode justificar essa contaminação.

Figura 68 - Distribuição espacial dos compostos estudados em amostras de água e material em suspensão do ponto de coleta PC3-120m nas coletas de outubro de 2016, junho e outubro de 2017.

Fonte: autora.

Os resultados obtidos para os pontos PC3-120m (Figura 68) e PC3-130m (Figura 69) não se apresentaram com concentrações elevadas para a maioria dos compostos estudados, por se tratarem de amostras de águas

subterrâneas. Pelo fato de a coleta ser por meio de bombas, pode ocorrer que algumas peças do equipamento contenham material plástico em sua composição, o que pode gerar uma pequena contaminação de dietilftalato, dibutilftalato ou até mesmo bisfenol-A nas amostras, fato este que pode justificar os valores obtidos em outubro de 2016 para dietilftalato em ambos os pontos de coleta.

Figura 69 - Distribuição espacial dos compostos estudados em amostras de água e material em suspensão do ponto de coleta PC3-130m nas coletas de outubro de 2016, junho e outubro de 2017.

Fonte: autora.

Na coleta de outubro de 2017, foi observado um valor um pouco mais alto para colesterol ($2 \mu\text{g L}^{-1}$) no ponto PC3-120m (Figura 68), o que é incoerente,

visto que não há muito contato com a amostra, a qual é coletada por meio de bombas e diretamente na torneira. Este ponto deverá ser melhor avaliado nas próximas coletas, durante o programa de monitoramento, a fim de entender o que pode ter ocorrido. É importante considerar que mesmo sob proteção, as águas subterrâneas podem apresentar concentrações, mesmo que baixas, de alguns interferentes endócrinos.

Na Figura 70, são apresentados os resultados para o ponto de amostragem IBAMA, o qual é a nascente de um córrego e encontra-se próximo à área de instalação do empreendimento RMB. Por apresentar estradas de terra e vegetação, o que indica que possivelmente haja a presença de atividade antrópica nessa região. Para as amostras de água superficial coletadas em outubro de 2016, foram determinados apenas os compostos dietilftalato, dibutilftalato e cafeína, sendo encontrados valores mais altos na coluna d'água em comparação ao resultado para o material em suspensão. Este fato pode indicar uma contaminação mais recente ou simplesmente uma dinâmica diferente, porém os valores observados para outubro de 2016 são muito baixos, menores que $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Em junho de 2017 já se observa pequena contaminação de colesterol no material em suspensão e na coleta de outubro de 2017, os valores de colesterol foram bem mais altos em comparação às coletas anteriores. O colestanol pode ser devido ao próprio colesterol, pois é um derivado deste. A presença do composto em água indica possível contaminação recente ou mesmo que esta possa ter ocorrido na coleta, pois neste ponto especificamente não foram usadas luvas.

A presença de estrona e androstano também é um fato a ser investigado em futuras coletas, pois não é comum serem encontrados nesse ponto, visto que se trata da nascente de um córrego.

Figura 70 - Distribuição espacial dos compostos estudados em amostras de água e material em suspensão do ponto de coleta Córrego IBAMA nas coletas de outubro de 2016, junho e outubro de 2017

Fonte: autora.

Na Figura 71 podem ser observados os resultados para as amostras do ponto SABESP. Embora este ponto de amostragem seja de água subterrânea, obteve-se uma concentração de colesterol em torno de $4 \mu\text{g L}^{-1}$, o que é um valor relativamente alto se comparado aos demais resultados para essa matriz. Esse valor foi quantificado no material suspenso da coluna de água, pois este composto tem maior afinidade com a parte sólida. Este ponto de amostragem deverá ser observado durante o programa de monitoramento futuro.

Figura 71 - Distribuição espacial dos compostos estudados em amostras de água e material em suspensão do ponto de coleta SABESP Sarapu nas coletas de outubro de 2016, junho e outubro de 2017.

Fonte: autora.

Embora a legislao brasileira no contemple os compostos avaliados nesta dissertao de mestrado, possvel comparar alguns dos resultados obtidos com diretrizes internacionais. A legislao canadense, por exemplo, estabelece como valores mximos permitidos 19 $\mu\text{g L}^{-1}$ de dibutilftalato e 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ de nonilfenol e a Diretiva 4 da Comunidade Europeia estabeleceu 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de nonilfenol para guas de classe semelhantes Classe 2 no Brasil. Nos Estados Unidos, foi estabelecido para o nonilfenol o valor de 28,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ como concentrao mxima e

6,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ como concentração contínua. Portanto, considerando-se as 3 campanhas de coleta realizadas na área de estudo, os resultados encontrados para as amostras de água encontram-se abaixo dos valores estabelecidos pelo Canadá, União Europeia e Estados Unidos.

6.4.4.1 Tratamento estatístico

Com o intuito de avaliar os dados dos resultados apresentados acima, foi empregado uma análise estatística de agrupamento hierárquico, denominada análise *cluster* (Figura 72 e Anexo 2). Os resultados foram obtidos utilizando o Software Statistica 13.3.

O dendrograma da Figura 72 foi composto por todos os pontos de amostragem da matriz de água estudada e material em suspensão, incluindo águas superficiais e subterrâneas, de todos os períodos de coleta realizados neste trabalho.

Figura 72 - Dendrograma de linkagem *cluster* para todos os resultados obtidos nesta dissertação.

Fonte: a autora.

Pode ser observado que os pontos P8 e LAGO são os únicos que se destoam dos demais, sendo os valores de colesterol os principais responsáveis por esse resultado. Essa representação pode ter sido obtida devido ao fato do ponto P8 apresentar características contaminantes, e o ponto LAGO apresentar em seu entorno, criação de gado, fazendo com que esses fatores elevem os níveis da concentração de esteróis.

Embora essa avaliação com todos os valores de contaminantes tenha resultado no perfil da Figura 72, as análises de Clusters (dendrogramas) para os compostos separadamente compõem outras configurações que podem ser avaliadas separadamente. Os dendrogramas para cada composto nas matrizes de água, material em suspensão na coluna d'água e a somatória desses valores podem ser observados nas Figuras 73 a 82 do Anexo 2.

7 CONCLUSÃO

- A validação da metodologia para material suspenso na coluna de água comprovou estatisticamente, o que já havia sido observado experimentalmente, que o método é adequado para a determinação dos compostos estudados;
- De acordo com os resultados obtidos nos experimentos de validação, foi possível concluir que a metodologia proposta para determinação dos compostos estudados em material suspenso na coluna de água tem seletividade, linearidade, exatidão, precisão e recuperação satisfatória, dentro do que estabelece a literatura. Portanto, estatisticamente, é adequada ao uso a que se pretende;
- Pelo estudo realizado para troca dos cartuchos na metodologia para águas concluiu-se que não há necessidade desta alteração, visto que o atual cartucho SPE . C₁₈ extrai perfeitamente todos os compostos de estudo, enquanto o cartucho SPE- Stracta X extrai apenas os estrógenos com perfeição;
- Foi possível observar que dos compostos estudados, o dietilftalato, bisfenol-A, progesterona e etinilestradiol apresentaram baixíssima ou nenhuma afinidade com a parte sólida. Já o coprostanol e colesterol apresentaram forte afinidade com a parte sólida. Para os demais compostos estudados foi observada uma afinidade moderada com a parte sólida;
- A partir dos resultados da revalidação dos parâmetros básicos na metodologia para matriz de água foi possível concluir que a metodologia pode ser seguramente aplicada na área de estudo selecionada com seletividade, linearidade, precisão e exatidão adequadas;
- Após a avaliação dos seis pontos de água superficial e quatro pontos de água subterrânea na área do entorno do empreendimento do Reator Multipropósito Brasileiro, em três períodos diferentes, pelos resultados obtidos foi possível demonstrar que o local do projeto RMB é preservado, mas alguns corpos de água ao redor da área, como o rio Sorocaba, apresentam pequenas concentrações de compostos orgânicos considerados interferentes endócrinos,

provavelmente devido às atividades antrópicas, indicando que a área precisa de uma maior atenção;

- Embora tenham sido observadas baixas concentrações de alguns compostos, (DEP, DBP, CAF e BPA em água e COP, CHOE, DBP e DEP em material em suspensão), é importante um monitoramento constante para tentar minimizar o impacto na região estudada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAME, G. **Desenvolvimento e validação de método para a extração e quantificação de compostos fenólicos em sedimento. Estudo de caso: Reservatório Guarapiranga, SP.** Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2016.

ANA/CETESB . Agência Nacional de Águas/ Companhia Ambiental do Estado de São Paulo . CETESB, 2011. Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras. Disponível em: <<http://arquivos.ana.gov.br/institucional/sge/CEDOC/Catalogo/2012/GuiaNacionalDeColeta.pdf>>. Acesso em: 01 jan. 2018.

ARDITSOGLOU, A.; VOUTSA, D. **Determination of phenolic and steroid endocrine disrupting compounds in environmental matrices.** 2008. Vol.15, Nº 3.

BARBIERO, L.C.da S. **Guia Definitivo Sobre Licenciamento Ambiental: o que é, como funciona e quais as principais leis que você precisa saber? .net.** [São Paulo], set.2015. Evento do grupo Graltec.Geoweb. Disponível em:<<http://m.ptdocz.com/doc/837960/guia-definitivo-sobre-licenciamento-ambiental>>. Acesso em: 07 mar. 2017.

BIANCO, B.; CHRISTOFOLINI, D. M.; SOUZA, Â. M. B.; BARBOSA, C. P. **O papel dos desreguladores endócrinos na fisiopatologia da endometriose: revisão da literatura.** 2010.

BICUDO, C.E.M.; TUNDISI, J.G.; SCHEUENSTUHL, M.C.B. **Águas do Brasil: análises estratégicas.** São Paulo, SP: Instituto de Botânica, 2010.

BICUDO, C. E.; BICUDO, D. C. **100 anos da represa Guarapiranga: Lições e desafios.** Editora CRV. Capítulo 10: página 309 a 382. 2017.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. **Fármacos no meio ambiente.** Quím. Nova, V.26, nº 4, p. 523 . 5, 30, 2003.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. **Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências.** Quím. Nova, v.30, n. 3, São Paulo, 2007.

BIRKETT, J.W., LESTER, J.N. **Endocrine Disruptors in Wastewater and Sludge Treatment Process,** 1º edição, Lewis Publishers, 2003.

BONATO, P. S.; COLLINS, C. H.; BRAGA G. L. **Introdução a métodos cromatográficos.** 6a ed., Campinas, SP: Unicamp, 1995.

BRAGA, B.; HESPANHOL, I.; CONEJO, J.G.L.; MIERZWA, J.C.; BARROS, M.T.L.DE; SPENCER, M.; PORTO, M.; NUCCI, N.; JULIANO, N.; EIGER, S. **Introdução à Engenharia Ambiental: o desafio do desenvolvimento sustentável.** 2. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005.

BRASIL-CONAMA . Ministério de desenvolvimento urbano e meio ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 397**, de 03 de abril de 2008.

BRASIL . Ministério da Saúde. **Resolução nº 2914**, de 12 de dezembro de 2011.

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.

BUSTILLOS, O. V. SASSINE, A.; MARCH, R. **A espectrometria de massas quadrupolar.** São Paulo: Editora Scortecci, 2003.

CEPAGRI/ UNICAMP . **Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura.** 2018. Disponível em: <https://www.cpa.unicamp.br/outrasinformacoes/clima_muni_243.html>. Acesso em 05 fev. 2017.

CHAVES, K. S. **Determinação dos desreguladores endócrinos bisfenol-A, -estradiol, 17 -etinilestradiol e estrona no Rio Paraíba do Sul.** 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a gás.** Editora Edgard Blucher LTDA, 1985.

COLBORN, T.; DUMANOSKI, D., MYERS, JP. **O futuro roubado.** Porto Alegre: L&PM. 2002.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos.** 7ª ed. Campinas, SP. 1997.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas: Editora Unicamp, 2006.

EIA/RIMA . Estudo de Impacto Ambiental. Relatório de Impacto Ambiental, 2013.

EURACHEM-CITAC. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 2ª Ed., 2002. Disponível em: <<https://www.eurachem.org/index.php/publications/pubarch/209-gdaccr-ed2>>. Acesso em: 05 abr. 2017.

FERNANDES, A. M.; **Características hidrogeoquímicas da bacia de drenagem do rio Sorocaba, São Paulo: Processos erosivos mecânicos e químicos.** 2012. Tese (doutorado). Universidade de São Paulo.

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

FOGLIATTI, M.C.; FILIPO, S.; GOUDARD, B. **Avaliação de impactos ambientais: aplicações aos sistemas de transporte.** Rio de Janeiro: Interciência, 2004.

FONTANELE, E. G. P.; MARTINS, M. R. A.; QUIDUTE, A. R. P.; JÚNIOR, R. M. M. **Contaminantes ambientais e interferentes endócrinos.** Arq Bras Endocrinol Metab. 2010.

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

GHISELLI, G. **Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP).** 2006. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

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

GOETTLICH, P. **What are Endocrine Disruptors in Fundamentals of Naturopathic Endocrinology.** Dr Friedman Michael Edit. CCNM Press 2005. Disponível em: <<http://www.mindfully.org/Pesticide/EDs-PWG-16jun01.htm>> Acesso em 21 mar. 2017.

GONSCHOROWSKI, G. P. C.; **Caracterização química de hormônios sexuais em águas de poço da região da USP via cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa CG/EM.** Dissertação de mestrado. IPEN, USP. 2013.

GROS, M., PETROVIC, M., BARCELÓ, D.; **Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters.** *Talanta.* 2006.

GUIA EURACHEM. Determinando a incerteza na medição analítica. Versão Brasileira, 2ª Ed, 2002.

HAO, C.; ZHAO, X.; YANG, P. GC-MS and HPLC-MS **Analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices.** 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.02.011>> Acesso em 02 mar. 2016.

HORWITZ, W.; ALBERT, R. **The Horwitz ratio (HorRat): a useful index of method performer with respect to precision.** *Journal of AOAC International.* V. 89, n. 4, 2006.

IBAMA . Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Ministério do Meio Ambiente. 2017. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/empreendimentos-e-projetos/licenciamento-ambiental-servicos/tr>> Acesso em: 05 abr. 2017.

ICMBio . Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/flonaipanema/floresta-nacional-de-ipanema.html>> Acesso em: 06 abr. 2017.

IFCS USP - Apostila de Fisiologia, Sistema Endócrino. Biologia II IFCS USP. Disponível em: <<http://biologia.ifsc.usp.br/bio2/index.htm>> Acesso em: 02 fev. 2017.

INMETRO . INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 01. Mar. 2003.

INMETRO . Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 4 jul. 2011.

INMETRO . Instituto Nacional de Metrologia . 2012. Avaliação de dados de medição: Guia para a expressão de incerteza de medição . GUM 2008. 1ª Edição Brasileira da 1ª Edição do BIPM de 2008. Evaluation of measurement data . Guide to the expression. Of uncertainty in measurement. Duque de Caxias, RJ: INMETRO/ CICMA/ SEPIM, 2012.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia - 2016. *Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos.* DOQ-CGCRE-008. Rio de Janeiro, 2016. Vol. Rev. 05.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia - 2017. *Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração*. Rio de Janeiro, 2017. 3ª edição de 19.12.2017.

IOMC . Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals. State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals, 2012. World Health Organization.

ISTAS . Instituto sindical de trabajo ambiente y salud. Curso de introducción a los disruptores endócrinos. 2002. Disponível em: <<http://www.istas.net/ma/decops/>> Acesso em: 21 mar. 2017

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

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.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993.

LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análises**. Editora RiMa. 2004.

LEITE, F. **Validação em Análise Química**. Editora Átomo. 4ª Ed. 2002.

LEITE, F. **Validação em Análise Química**. 5. Ed. Campinas, SP. Editora Átomo, 2008.

LIBÂNIO, M. **Fundamentos de qualidade e tratamento de água**. 2.ed. Campinas, SP: Editora Átomo, 2008.

LIMA, D. R. S.; TONUCCI, M. C.; LIBÂNIO, M.; AQUINO, S. F. **Fármacos e desregulares endócrinos em águas brasileiras: ocorrência e técnicas de remoção**. *Eng Sanit Ambient*. Vol. 22, No. 6. 2017.

LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A. **Endocrine disruptors in the environmental** (IUPAC Technical Report) *Pure Appl. Chem.*, v. 75, nº5, 631-681, 2003.

LOUREIRO, I. R; **A importância e ocorrência de ftalatos em água potável e no ecossistema da Baía de Guanabara**. Tese de Doutorado. PUC-Rio, 2002.

MARTINI, G. A. **Investigação da atividade estrogênica e de interferentes endócrinos em águas superficiais do estado de São Paulo**. 2018. Tese (doutorado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

MARTINS, E. A. J. **Estimativa da incerteza em ensaios químicos**. São Paulo, IPEN-CNEN/SP (adaptação eletrônica baseada no documento EURACHEM/CITAC Guide. 2nd Edition, 2000). 2010.

MARTINS, E. A. J.; FURUSAWA, H.A.; OTOMO, J. I.; SOUZA, R. R.; OLIVEIRA, C. L.; COTRIM, M. E. B.; PIRES, M. A. F. **Avaliação de incertezas de medição na determinação de interferentes endócrinos em água superficial por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas.** In: XIII Internacional Conference on Engineering and Technology Education. Guimarães, Portugal: 2014.

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

MONTAGNER, C. A.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. D. **Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: Cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios.** 2017. Quím. Nova. Vol. 40, No. 9, 1094-1110, 2017.

MRS Estudos Ambientais Ltda Relatório de Impacto Ambiental do Reator Multipropósito Brasileiro [Report]. - 2013. Disponível em: <[http://licenciamento.ibama.gov.br/Nuclear/Reator%20Multiproposito%20Brasileiro%20\(RMB\)/RIMA/RIMA_FINAL.pdf](http://licenciamento.ibama.gov.br/Nuclear/Reator%20Multiproposito%20Brasileiro%20(RMB)/RIMA/RIMA_FINAL.pdf)> Acesso em 10 abr. 2017.

OLIVEIRA, C. L. **Estudo de esteróis como marcadores químicos em águas destinadas ao abastecimento público na Região do rio Paraíba do Sul, SP. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica.** 2012. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

OTOMO, J. I. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de hormônios, considerados disruptores endócrinos, nas águas destinadas ao abastecimento público na região do rio Paraíba do Sul, SP.** 2010 Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

OTOMO, J.I. **Contribuição antrópica na qualidade das águas da represa do Guarapiranga. Um estudo sobre interferentes endócrinos.** Tese de Doutorado. IPEN/USP, 2015.

PENTEADO, J. C. P.; MAGALHÃES, D.; MASINI, J. C. **Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental.** 2008. Quím. Nova. Vol. 31, Nº, 8, São Paulo.

PERES, M. R. **Remoção dos interferentes endócrinos 17 -etinilestradiol, 17 -estradiol e 4-nonilfenol por adsorção em carvão ativado em pó em água de abastecimento público.** Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas. 2011.

PIELOU, E. C. **Freshwater.** Chicago, The University of Chicago Press, 1998.

PONTELLI, R. C. N.; NUNES, A. A. N.; OLIVEIRA, S. V. W. B. **Impacto na saúde humana de disruptores endócrinos presentes em corpos hídricos: existe associação com a obesidade.** 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/csc/v21n3/1413-8123-csc-21-03-0753.pdf>> Acesso em 8 ago. 2016.

QUEIROZ, F. B.; **Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de fármacos e perturbadores endócrinos em amostras de esgoto utilizando extração em fase sólida e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.** Dissertação de mestrado. UFPF. 2011.

REIS FILHO; R. W.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E.M.. **Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos.** Quím. Nova. Vol.29, nº. 4, São Paulo Jul/Ago., 2006.

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.

RICHARDSON, S.D. **Water analysis: Emerging Contaminants and current issues.** Anal. Chem. V. 81, 4645-4677, 2009.

SALDANHA, L. A. **Efeitos da ingestão de cafeína, café (*Coffea arabica*) e chá-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a atividade lipolítica do tecido adiposo e parâmetros metabólicos em ratos submetidos ao exercício físico.** Tese de Doutorado. USP, 2012.

SANTOS, R.C.M.M.; PAIVA, S.C.; SALGUEIRO, A.A. **Impacto na qualidade da água do rio Capibaribe por efluente de lavanderia e tinturaria industrial em Toritama, Pernambuco.** In: A. S. Messias; M.R. N. Costa. (Org.). Água . Tratamentos e políticas públicas. Série Encontro das águas, n.04. Recife: UNICAP. Recife/PE, 2007.

SHIHOMATSU, H. M.; MARTINS, E. A. J.; COTRIM, M. E. B.; LEBRE, D. T.; PIRES, M. A. F. **Occurrence of β -blocker and antihypertensive in water supply reservoir, Guarapiranga dam, São Paulo, SP, Brazil.** In: XXXIV Congresso Interamericano de Ingenieria Saniataria y Ambiental, 2014b, Monterrey, p. 1-6.

SIGRH . Sistema Integrado de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado de São Paulo, 2016. Disponível em: <<http://www.sigrh.sp.gov.br/public/uploads/documents/6525/relsmstseg.pdf>>. Acesso em: 07 jun. 2018.

SILVA, A. L. **Interferentes endócrinos no meio ambiente: um estudo de caso de amostras de água *in natura* e efluente de estação de tratamento de esgotos da região metropolitana de São Paulo.** Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. 2009.

SILVA, R.A. **Desenvolvimento de software como ferramenta de confiabilidade para a análise da água subterrânea do IPEN.** Dissertação de Mestrado - IPEN/ USP, 2012.

SILVA, L. L. **Avaliação da associação de compostos orgânicos, considerados interferentes endócrinos, em sólidos suspensos de amostras de água da represa do Guarapiranga, SP.** PIBIC. 2015.

SMA . Secretaria do Meio Ambiente. Caderno de Educação Ambiental. Ecocidadão. 2008.

SMA . Secretaria do Meio Ambiente. Resolução SMA No 121. Página 120. 2013.

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, São Paulo.** J. Braz. Soc. Exotocol. Vol. 2, No. 2, 2007, 187-196.

SODRÉ, F. F. **Interferentes endócrinos como contaminantes emergentes: uma questão de saúde pública.** Aqqua. 2012.

SOUZA, R.R.; **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de disruptores endócrinos resultantes de atividades antrópicas nas águas da região do rio Paraíba do Sul, SP.** 2011. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

STELLATO, T.B.; **Avaliação da qualidade da água superficial e subterrânea da área de instalação do futuro Reator Multipropósito Brasileiro Ë RMB, como uma ferramenta para a obtenção da licença de instalação.** 2017. Dissertação (Mestrado) . Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

SUPELCO®. Certificado de análise do BSTFA. Sigma-Aldrich, Inc. 2003.

TSIPI, D.; BOTITSI, H; ECONOMOU, A. **Mass Spectrometry for the analysis of pesticide residues and their metabolites**, Hokoken: Wiley, 2015.

TUCCI, C.E.M.; HESPANOL, I.; CORDEIRO NETTO, O.M. **Gestão da Água no Brasil.** UNESCO: Brasília, 2001.

TUNDISI, J. G. **Água no século 21: enfrentando a escassez.** RIMA/IIIE, 2003. 247p.

TUNDISI, J. G. **Novas perspectivas para a gestão de recursos hídricos.** Revista USP, São Paulo, n. 70, p. 24-35, junho/ Agosto 2006.

UMBUZEIRO, G. A. CONAMA 357/2005 e classificação das águas subterrâneas. CETESB. 2005.

USEPA . United States Environmental Protection Agency; Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An effects assessment and analysis, Washington, 1997.

VIM 2012 - Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos fundamentais e gerais e termos associados. Duque de Caxias, RJ : INMETRO, 2012

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática, Princípios e Aplicações.** 1ª Ed., RIMA, São Carlos, SP. 2006.

ANEXO 1 Resultados dos cálculos das contribuições de cada grandeza de entrada.

A seguir é apresentado um resumo das contribuições de cada grandeza de entrada estimativa da incerteza para os compostos estudados, na matriz de material suspenso na coluna de água, considerando o ponto médio da faixa de trabalho.

Dietilftalato no ponto médio da curva de calibração					
Valor obtido	Incerteza expandida	unidade			
0,025	± 0,002	µg L ⁻¹			
Incerteza associada ao volume final	Entradas consideradas				
0,00876	fabricante	repe	Δt	Incerteza combinada	
	0,0082	0,0032	0,0001	0,0088	
Incerteza associada à recuperação	Entradas consideradas				
0,03010	Concentração recuperada	Concentração adicionada	Incerteza combinada		
	0,011	0,028	0,028		
Incerteza associada à curva de calibração	Entradas consideradas				
0,02364			resolução do equipamento	repe	Incerteza combinada
	Área do branco		2,047	0,029	3,769
	Área da amostra		2,047	1748	1748
		Vi_sol_trabalho	Vi_10	Csol_trabalho	Incertezas combinadas
	C1_curva	0,0122	0,0041	0,0001	0,0001
	C2_curva	0,0025	0,0041	0,0001	0,0001
	C3_curva	0,0041	0,0041	0,0001	0,0001
	C4_curva	0,0041	0,0041	0,0002	0,0001
	C5_curva	0,0033	0,0041	0,0003	0,0002

Nonilfenol no ponto médio da curva de calibração

Valor obtido	Incerteza expandida	unidade			
0,038	± 0,001	µg L ⁻¹			
Incerteza associada ao volume final	Entradas consideradas				
0,00876	fabricante	repe	Δt	Incerteza combinada	
	0,00816	0,00316	0,00012	0,00876	
Incerteza associada à recuperação	Entradas consideradas				
0,01376	Concentração recuperada	Concentração adicionada	Incerteza combinada		
	0,00173	0,01365	0,01484		
Incerteza associada à curva de calibração	Entradas consideradas				
0,00590		resolução do equipamento	repe	Incerteza combinada	
	Área do branco	0,858	0,029	0,858	
	Área da amostra	0,858	41708	41708	
		V _{i_sol_trabalho}	V _{i_10}	C _{sol_trabalho}	
	C1_curva	0,01225	0,00408	0,00005	
	C2_curva	0,00246	0,00408	0,00011	
	C3_curva	0,00409	0,00408	0,00054	
	C4_curva	0,00409	0,00408	0,00081	
	C5_curva	0,00328	0,00408	0,00108	
				Incertezas combinadas	
				0,00005	
				0,00004	
				0,00023	
				0,00035	
				0,00042	

Cafeína no ponto médio da curva de calibração

Valor obtido	Incertez expandida	unidade			
0,24	± 0,03	µg L ⁻¹			
Incerteza associada ao volume final	Entradas consideradas				
0,00876	fabricante	repe	Δt	Incerteza combinada	
	0,00816	0,00316	0,00012	0,00876	
Incerteza associada à recuperação	Entradas consideradas				
0,03990	Concentração recuperada	Concentração adicionada	Incerteza combinada		
	0,05890	0,00154	0,03990		
Incerteza associada à curva de calibração	Entradas consideradas				
0,00757			resolução do equipamento	repe	Incerteza combinada
	Área do branco		0,382	0,029	0,383
	Área da amostra		0,382	24	24
		Vi_sol_trabalho	Vi_10	Csol_trabalho	Incertezas combinadas
	C1_curva	0,0122	0,0041	0,0004	0,0013
	C2_curva	0,0025	0,0041	0,0007	0,0010
	C3_curva	0,0041	0,0041	0,0009	0,0015
	C4_curva	0,0041	0,0041	0,0015	0,0024
	C5_curva	0,0033	0,0041	0,0018	0,0028

Dibutíftalato no ponto médio da curva de calibração

Valor obtido	Incertez expandida	unidade			
0,016	± 0,001	µg L ⁻¹			
Incerteza associada ao volume final	Entradas consideradas				
0,00876	fabricante	repe	Δt	Incerteza combinada	
	0,00816	0,00316	0,00012	0,00876	
Incerteza associada à recuperação	Entradas consideradas				
0,02353	Concentração recuperada	Concentração adicionada	Incerteza combinada		
	0,02158	0,00937	0,02559		
Incerteza associada à curva de calibração	Entradas consideradas				
0,01226	resolução do equipamento		repe	Incerteza combinada	
	Área do branco	0,015	0,029	0,033	
	Área da amostra	0,015	259	259	
		Vi_sol_trabalho	Vi_10	Csol_trabalho	
	C1_curva	0,01225	0,00408	0,00003	
	C2_curva	0,00246	0,00408	0,00006	
	C3_curva	0,00409	0,00408	0,00012	
	C4_curva	0,00409	0,00408	0,00015	
	C5_curva	0,00328	0,00408	0,00024	
				Incertezas combinadas	
				0,00005	
				0,00004	
				0,00009	
				0,00011	
				0,00017	

Androstano no ponto médio da curva de calibração

Valor obtido	Incerteza expandida	unidade			
0,088 ±	0,005	µg L ⁻¹			
Incerteza associada ao volume final	Entradas consideradas				
0,00876	fabricante	repe	Δt	Incerteza combinada	
	0,0082	0,0032	0,0001	0,0088	
Incerteza associada à recuperação	Entradas consideradas				
0,02670	Concentração recuperada	Concentração adicionada	Incerteza combinada		
	0,025	0,009	0,019		
Incerteza associada à curva de calibração	Entradas consideradas				
0,00596		resolução do equipamento	repe	Incerteza combinada	
	Área do branco	0,211	0,029	0,213	
	Área da amostra	0,211	4	4	
		Vi_sol_trabalho	Vi_10	Csol_trabalho	
	C1_curva	0,0122	0,0041	0,0064	
	C2_curva	0,0025	0,0041	0,0001	
	C3_curva	0,0041	0,0041	0,0001	
	C4_curva	0,0041	0,0041	0,0003	
	C5_curva	0,0033	0,0041	0,0006	
				Incertezas combinadas	
				0,0001	
				0,0001	
				0,0002	
				0,0005	
				0,0009	

Bisfenol-A no ponto médio da curva de calibração

Valor obtido	Incertez expandida	unidade			
0,021	± 0,001	µg L ⁻¹			
Incerteza associada ao volume final	Entradas consideradas				
0,00876	fabricante	repe	Δt	Incerteza combinada	
	0,0082	0,0032	0,0001	0,0088	
Incerteza associada à recuperação	Entradas consideradas				
0,01614	Concentração recuperada	Concentração adicionada	Incerteza combinada		
	0,015	0,006	0,018		
Incerteza associada à curva de calibração	Entradas consideradas				
0,01864			resolução do equipamento	repe	Incerteza combinada
	Área do branco		1,284	0,029	1,284
	Área da amostra		1,284	106	106
		Vi_sol_trabalho	Vi_10	Csol_trabalho	Incertezas combinadas
	C1_curva	0,0122	0,0041	0,0002	0,0001
	C2_curva	0,0025	0,0041	0,0006	0,0001
	C3_curva	0,0041	0,0041	0,0008	0,0001
	C4_curva	0,0041	0,0041	0,0016	0,0002
	C5_curva	0,0033	0,0041	0,0019	0,0003

Estrona no ponto médio da curva de calibração

Valor obtido	Incertez expandida	unidade			
0,13	± 0,01	µg L ⁻¹			
Incerteza associada ao volume final	Entradas consideradas				
0,00876	fabricante	repe	Δt	Incerteza combinada	
	0,0082	0,0032	0,0001	0,0088	
Incerteza associada à recuperação	Entradas consideradas				
0,02782	Concentração recuperada	Concentração adicionada	Incerteza combinada		
	0,019	0,020	0,028		
Incerteza associada à curva de calibração	Entradas consideradas				
0,01108			resolução do equipamento	repe	Incerteza combinada
	Área do branco		0,975	0,029	0,975
	Área da amostra		0,975	51	51
		Vi_sol_trabalho	Vi_10	Csol_trabalho	Incertezas combinadas
	C1_curva	0,0122	0,0041	0,0001	0,0003
	C2_curva	0,0025	0,0041	0,0003	0,0002
	C3_curva	0,0041	0,0041	0,0007	0,0007
	C4_curva	0,0041	0,0041	0,0008	0,0009
	C5_curva	0,0033	0,0041	0,0011	0,0011

Estradiol no ponto médio da curva de calibração

Valor obtido	Incertez expandida	unidade			
0,12	± 0,01	µg L ⁻¹			
Incerteza associada ao volume final	Entradas consideradas				
0,00876	fabricante	repe	Δt	Incerteza combinada	
	0,0082	0,0032	0,0001	0,0088	
Incerteza associada à recuperação	Entradas consideradas				
0,03818	Concentração recuperada	Concentração adicionada	Incerteza combinada		
	0,020	0,051	0,027		
Incerteza associada à curva de calibração	Entradas consideradas				
0,01103			resolução do equipamento	repe	Incerteza combinada
	Área do branco		0,975	0,029	0,975
	Área da amostra		0,975	107	107
		Vi_sol_trabalho	Vi_10	Csol_trabalho	Incertezas combinadas
	C1_curva	0,0122	0,0041	0,0001	0,0003
	C2_curva	0,0025	0,0041	0,0003	0,0002
	C3_curva	0,0041	0,0041	0,0007	0,0007
	C4_curva	0,0041	0,0041	0,0009	0,0009
	C5_curva	0,0033	0,0041	0,0015	0,0013

Etinilestradiol no ponto médio da curva de calibração

Valor obtido	Incertez expandida	unidade			
0,14	± 0,02	µg L ⁻¹			
Incerteza associada ao volume final	Entradas consideradas				
0,00876	fabricante	repe	Δt	Incerteza combinada	
	0,0082	0,0032	0,0001	0,0088	
Incerteza associada à recuperação	Entradas consideradas				
0,07908	Concentração recuperada	Concentração adicionada	Incerteza combinada		
	0,077	0,018	0,074		
Incerteza associada à curva de calibração	Entradas consideradas				
0,01491			resolução do equipamento	repe	Incerteza combinada
	Área do branco		1,407	0,029	1,407
	Área da amostra		1,407	10	10
		Vi_sol_trabalho	Vi_10	Csol_trabalho	Incertezas combinadas
	C1_curva	0,0122	0,0041	0,0003	0,0006
	C2_curva	0,0025	0,0041	0,0006	0,0005
	C3_curva	0,0041	0,0041	0,0011	0,0012
	C4_curva	0,0041	0,0041	0,0014	0,0015
	C5_curva	0,0033	0,0041	0,0017	0,0016

Progesterona no ponto médio da curva de calibração

Valor obtido	Incertez expandida	unidade			
0,55	± 0,03	µg L ⁻¹			
Incerteza associada ao volume final	Entradas consideradas				
0,00876	fabricante	repe	Δt	Incerteza combinada	
	0,0082	0,0032	0,0001	0,0088	
Incerteza associada à recuperação	Entradas consideradas				
0,02140	Concentração recuperada	Concentração adicionada	Incerteza combinada		
	0,014	0,016	0,020		
Incerteza associada à curva de calibração	Entradas consideradas				
0,01377			resolução do equipamento	repe	Incerteza combinada
	Área do branco		0,308	0,029	0,309
	Área da amostra		0,308	17	17
		V _{i_sol_trabalho}	V _{i_10}	C _{sol_trabalho}	Incertezas combinadas
	C1_curva	0,0122	0,0041	0,0004	0,0013
	C2_curva	0,0025	0,0041	0,0015	0,0020
	C3_curva	0,0041	0,0041	0,0018	0,0030
	C4_curva	0,0041	0,0041	0,0022	0,0037
	C5_curva	0,0033	0,0041	0,0037	0,0063

Coprostanol no ponto médio da curva de calibração

Valor obtido	Incertez expandida	unidade			
0,148	± 0,005	µg L ⁻¹			
Incerteza associada ao volume final	Entradas consideradas				
0,00876	fabricante	repe	Δt	Incerteza combinada	
	0,0082	0,0032	0,0001	0,0088	
Incerteza associada à recuperação	Entradas consideradas				
0,00750	Concentração recuperada	Concentração adicionada	Incerteza combinada		
	0,002	0,007	0,004		
Incerteza associada à curva de calibração	Entradas consideradas				
0,01185			resolução do equipamento	repe	Incerteza combinada
	Área do branco		0,661	0,029	0,662
	Área da amostra		0,661	42	42
		V _{i_sol_trabalho}	V _{i_10}	C _{sol_trabalho}	Incertezas combinadas
	C1_curva	0,0122	0,0041	0,0038	0,0001
	C2_curva	0,0025	0,0041	0,0001	0,0001
	C3_curva	0,0041	0,0041	0,0002	0,0003
	C4_curva	0,0041	0,0041	0,0004	0,0007
	C5_curva	0,0033	0,0041	0,0007	0,0012

Colesterol no ponto médio da curva de calibração

Valor obtido	Incertez expandida	unidade			
0,25	± 0,02	µg L ⁻¹			
Incerteza associada ao volume final	Entradas consideradas				
0,00876	fabricante	repe	Δt	Incerteza combinada	
	0,0082	0,0032	0,0001	0,0088	
Incerteza associada à recuperação	Entradas consideradas				
0,03621	Concentração recuperada	Concentração adicionada	Incerteza combinada		
	0,013	0,034	0,021		
Incerteza associada à curva de calibração	Entradas consideradas				
0,01633		resolução do equipamento	repe	Incerteza combinada	
	Área do branco	0,362	0,029	0,363	
	Área da amostra	0,362	7	7	
		V _{i_sol_trabalho}	V _{i_10}	C _{sol_trabalho}	
	C1_curva	0,0122	0,0041	0,0003	
	C2_curva	0,0025	0,0041	0,0017	
	C3_curva	0,0041	0,0041	0,0034	
	C4_curva	0,0041	0,0041	0,0136	
	C5_curva	0,0033	0,0041	0,0170	
				Incertezas combinadas	
				0,0001	
				0,0003	
				0,0007	
				0,0064	
				0,0097	

Colestanol no ponto médio da curva de calibração

Valor obtido	Incertez expandida	unidade			
0,11	± 0,01	µg L ⁻¹			
Incerteza associada ao volume final	Entradas consideradas				
	fabricante	repe	Δt	Incerteza combinada	
	0,0082	0,0032	0,0001	0,0088	
Incerteza associada à recuperação	Entradas consideradas				
	Concentração recuperada	Concentração adicionada	Incerteza combinada		
	0,000	0,059	0,033		
Incerteza associada à curva de calibração	Entradas consideradas				
			resolução do equipamento	repe	Incerteza combinada
	Área do branco		0,362	0,029	0,363
	Área da amostra		0,362	2	2
			Incertezas combinadas		
			2		
		Vi_sol_trabalho	Vi_10	Csol_trabalho	
	C1_curva	0,0122	0,0041	0,0002	0,0001
	C2_curva	0,0025	0,0041	0,0012	0,0001
	C3_curva	0,0041	0,0041	0,0025	0,0003
	C4_curva	0,0041	0,0041	0,0098	0,0022
	C5_curva	0,0033	0,0041	0,0123	0,0032

ANEXO 2 Resultados das análises de Clusters (dendrogramas)

Nas Figuras 73 a 82, são apresentados os resultados das Análises de Clusters parciais.

Figura 73 . Resultados da Análise de Cluster para Dietilftalato em água, em material suspenso na coluna d'água e total, para cada ponto de amostragem, considerando as três coletas.

Fonte: a autora

Figura 74 . Resultados da Análise de Cluster para Cafeína em água para cada ponto de amostragem, considerando as três coletas.

Fonte: a autora

Figura 75 . Resultados da Análise de Cluster para Dibutilftalato em água, em material suspenso na coluna d'água e total, para cada ponto de amostragem, considerando as três coletas.

Fonte: a autora

Figura 76 . Resultados da Análise de Cluster para Androstano em água, em material suspenso na coluna d'água e total, para cada ponto de amostragem, considerando as três coletas.

Fonte: a autora

Figura 77 . Resultados da Análise de Cluster para Bisfenol-A em água, em material suspenso na coluna d'água e total, para cada ponto de amostragem, considerando as três coletas.

Fonte: a autora

Figura 78 . Resultados da Análise de Cluster para Estrona em água, em material suspenso na coluna d'água e total, para cada ponto de amostragem, considerando as três coletas.

Fonte: a autora

Figura 79 . Resultados da Análise de Cluster para Estradiol em material particulado, para cada ponto de amostragem, considerando as três coletas.

Fonte: a autora

Figura 80 . Resultados da Análise de Cluster para Coprostanol em água, em material suspenso na coluna d'água e total, para cada ponto de amostragem, considerando as três coletas.

Fonte: a autora

Figura 81 . Resultados da Análise de Cluster para Colesterol em água, em material suspenso na coluna d'água e total, para cada ponto de amostragem, considerando as três coletas.

Fonte: a autora

Figura 82 . Resultados da Análise de Cluster para Colestanol em água, em material suspenso na coluna d'água e total, para cada ponto de amostragem, considerando as três coletas.

Fonte: a autora

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.