

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM QUÍMICA DE MINAS
GERAIS

DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS ESTROGÊNIOS EM ÁGUAS
SUPERFICIAIS DO LAGO DE FURNAS NO MUNICÍPIO DE
ALFENAS-MG

Thayná Aparecida Cais

Itajubá, julho de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM QUÍMICA DE MINAS
GERAIS

DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS ESTROGÊNIOS EM ÁGUAS
SUPERFICIAIS DO LAGO DE FURNAS NO MUNICÍPIO DE
ALFENAS-MG

Thayná Aparecida Cais

Dissertação submetida ao Programa de Pós
Graduação Multicêntrico em Química como parte dos
requisitos para obtenção do título de mestre em
Química.

Área de concentração: Química

Orientador: Prof. Dr. Sandro José de Andrade

Coorientador: Prof. Dr. Flávio Soares Silva

Julho de 2016

Itajubá

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM QUÍMICA DE MINAS
GERAIS

DETERMINAÇÃO DE HORMÔNIOS ESTROGÊNIOS EM ÁGUAS
SUPERFICIAIS DO LAGO DE FURNAS NO MUNICÍPIO DE
ALFENAS-MG

Thayná Aparecida Cais

Dissertação aprovada por banca examinadora em 16 de agosto de 2016, conferindo à autora o título de *Mestre em Química em Nome do Programa Multicêntrico em Química*.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Sandro José de Andrade (Orientador)

Prof. Dra. Daniela Sachs

Prof. Dr. Flávio Teixeira da Silva

Itajubá
2016

*Com muito amor dedico esse
trabalho à minha doce Déia!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho, minha mente e estar sempre ao meu lado;

Ao professor orientador Sandro, por toda paciência e atenção destinada a mim, por todo conhecimento durante esses anos, por todo companheirismo nos momentos de resolver os problemas, por ter sido meu orientador, muito obrigada;

Ao professor coorientador Flavio Soares Silva, que foi de suma importância no desenvolvimento estatístico do meu trabalho;

A todos os professores que contribuíram de alguma forma para meu conhecimento e para a minha formação;

À coordenação do programa, por todo apoio durante o mestrado;

À CAPES, pela bolsa de mestrado;

A minha amada Deia, por ter sido sempre o pilar da minha vida, por ter acalmado meu coração quando desesperei e achei que não iria conseguir, por me fortalecer sempre;

Ao meu pai de coração Adriano, por toda confiança depositada em mim e toda preocupação comigo;

A minha querida miga Mariane, por estar ao meu lado em momentos difíceis sempre com um sorriso no rosto, pelos momentos de descontração no laboratório diminuindo a dimensão dos problemas do dia a dia;

A todos os técnicos dos laboratórios de química da UNIFEI, por estarem sempre dispostos a me ajudar no que fosse necessário;

Aos meus colegas do grupo de pesquisa, por compartilharem conhecimento e me criticarem construtivamente quando necessário.

“Aguarda as surpresas do tempo, agindo sem precipitação.

Se cada noite é nova sombra, cada dia é nova luz.”

(Chico Xavier)

RESUMO

O desenvolvimento populacional e industrial tem causado aumento da poluição e, conseqüentemente, na contaminação dos ecossistemas aquáticos. Pesquisadores de diversas áreas têm estudado uma classe de substâncias químicas (naturais ou antrópicas) que não possuem legislação regulamentada, denominada contaminantes emergentes. Uma das principais vias de entrada dessas substâncias aos corpos d'água é pela descarga de esgoto (bruto ou tratado) e pelos resíduos de animais. Estudos apontam que a exposição contínua a esses contaminantes podem causar disfunções no sistema endócrino de animais e seres humanos, por isso, são classificados como interferentes endócrinos. Tais substâncias podem ocasionar feminilização de peixes, anomalias no sistema reprodutor de algumas espécies de animais, incidência de alguns tipos de câncer em seres humanos, diminuição de espermatozoides em homens entre outros efeitos. Os estrogênios naturais estrona (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3) e o sintético 17 α -etinilestradiol (EE2) pertencem a essa classe de substâncias. Diante disso, surge-se a preocupação em determinar e quantificar a presença desses estrogênios nas águas superficiais do Lago de Furnas, no entorno do município de Alfenas – MG, uma vez que o lago é de grande importância regional, influenciando a agricultura, a piscicultura, atividades de pesca (esportiva e profissional) e lazer. Nesse trabalho foi validada uma metodologia analítica para determinar e quantificar os quatro estrogênios, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por ultravioleta com arranjo de diodos (DAD) e por fluorescência (FLD). A validação do método foi conduzida seguindo a avaliação dos parâmetros: linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Na etapa de pré-concentração das amostras foi realizada extração em fase sólida, para tal, foi feito um planejamento de experimentos a fim de determinar as melhores condições de extração, tais como, marca do cartucho, vazão da fase móvel durante a extração, pH da amostra e solvente de eluição. Diante dos altos valores agregados à compra de cartuchos para o desenvolvimento da extração em fase sólida foi feita uma tentativa de reutilização dos mesmos, porém, de acordo com os valores de recuperação obtidos os procedimentos não obtiveram êxito. As 5 campanhas de amostragens de águas superficiais foram realizadas no Lago de Furnas em cinco pontos diferentes entre os meses de dezembro de 2015 a maio de 2016. O ponto 1 está localizado próximo à estação de tratamento de esgoto do município de Alfenas - MG e o ponto 5 o mais distante desse local. Todos os estrogênios, exceto E1, foram encontrados em todas as amostragens realizadas em pelo menos um dos pontos de coleta. As concentrações de E3, E2 e EE2 variaram de 11-366, 75-9998 e 63-422 ng.L⁻¹, respectivamente. Esses resultados estão coerentes com diversos trabalhos divulgados na literatura científica.

Palavras-Chave: Validação de metodologia analítica, estrogênios, interferentes endócrinos, Lago de Furnas.

ABSTRACT

Population and industrial development has caused increased pollution, and consequently, the contamination of aquatic ecosystems. Researchers from various fields have studied a class of chemicals (natural or anthropogenic) that have no regulated legislation called emerging contaminants. One of the main entry routes of these substances to water bodies is the discharge of sewage and waste of animals. Studies indicate that continuous exposure to these contaminants can cause dysfunctions of the endocrine system of animals and humans, therefore they are classified as endocrine disruptors and can cause feminization on fish, the incidence of some cancer types in humans, decreased sperm in Men, among other effects. Natural hormones estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3) and the synthetic hormone 17 α -ethinylestradiol (EE2) belong to this class of substances. Thus arises the concern to determine and quantify the presence of these hormones in Furnas Reservoir surface water surrounding the city of Alfenas - MG, as the lake is of great regional importance, influencing agriculture, fish farming, fishing activities (sports and professional) and leisure. In this work an analytical methodology was validated to determine and quantify the four hormones, using high-performance liquid chromatography (HPLC) with detection by ultraviolet rays with arrangement of diodes (DAD) and by fluorescence (FLD). Validation of the method was conducted following the evaluation of parameters: linearity, selectivity, precision, accuracy, detection limit, quantification limit and robustness. In the pre-concentration of the sample stage extraction was carried out in solid phase, for this purpose was made a recovery experimental design to determine the best extraction conditions such as cartridge marks, flow of eluent, pH of the sample and eluting solvent. Given the high added values to the purchase of cartridges for the development of solid phase extraction was made an attempt to reuse the same, however, according to the recovery values obtained the procedures were unsuccessful. The 5 surface water sampling campaigns were carried out in Furnas Reservoir in five different points between the months of December 2015 to May 2016. Point 1 is located near the sewage treatment plant in the city of Alfenas - MG and the point 5 farther from that location. All estrogens, except E1, were found in all samples collected in at least one of the collection points. The concentrations of E3, E2 and EE2 ranged from 11-366, 63-422 and 75-9998 ng.L⁻¹, respectively. These results are consistent with several studies published in scientific literature.

Keywords: validation of analytical methodology, estrogens, endocrine disruptors, Furnas Reservoir.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Representação da distribuição de água no planeta Terra	15
Figura 1.2: Mapa do reservatório de Furnas	17
Figura 2.1: Representação do conjunto de glândulas que compõem o sistema endócrino	21
Figura 2.2: Representação esquemática das alterações endócrinas: A- resposta natural; B- Efeito Agonista e C- Efeito Antagonista	23
Figura 2.3: Representação estrutural molecular do estrogênio estrona	27
Figura 2.4: Representação estrutural molecular do estrogênio estriol	28
Figura 2.5: Representação estrutural molecular do estrogênio 17 β -estradiol	29
Figura 2.6: Representação estrutural molecular do estrogênio 17 α -etinilestradiol	30
Figura 2.7: Representação estrutural molecular dos estrogênios: (A) Estrona-3-Sulfato de Sódio, B) Estiol-3-Sulfato de Sódio	31
Figura 2.8: Representação simplificada do processo que leva à síntese do biomarcador de exposição VTG em peixes machos	33
Figura 2.9: Esquema simplificado do teste com leveduras transgênicas luminescentes	35
Figura 2.10: Representação simplificada das etapas de extração em fase sólida dos IEs	38
Figura 2.11: Exemplo de sorventes que são utilizados para extração em fase sólida	39
Figura 3.1: Mapa da localização do Lago de Furnas e do município de coleta (Alfenas)	50
Figura 3.2: Pontos de coleta de água superficial do Lago de Furnas no município de Alfenas	51
Figura 3.3: Foto da garrafa de van Dorn utilizada nas coletas de águas superficiais	52
Figura 3.4: Foto da coleta das amostras de águas superficiais no Lago de Furnas (Alfenas-MG)	52
Figura 3.5: Foto dos frascos envolvidos em papel alumínio contendo as amostras coletadas	53
Figura 4.1: Cromatograma referente a separação dos padrões de estrogênios: 1) estriol; 2) 17 β -estradiol; 3) 17 α - etinilestradiol e 4) estrona detectados pelo DAD	58
Figura 4.2: Cromatograma referente a separação dos padrões de estrogênios: 1) estriol; 2) 17 β -estradiol; 3) 17 α - etinilestradiol detectados pelo FLD	59
Figura 4.3: Cromatograma referente ao “branco” com detecção pelo DAD	60
Figura 4.3: Cromatograma referente ao “branco” com detecção pelo FLD	60

Figura 4.5: Espectros 2D referentes a A) solução mista dos padrões de estrogênios: 1) estriol; 2) 17 β -estradiol; 3) 17 α - etinilestradiol e 4) estrona e B) “branco”	61
Figura 4.6: Curva de calibração do estriol na faixa estudada, com detecção pelo DAD	62
Figura 4.7: Curva de calibração do 17 β -estradiol na faixa estudada, com detecção pelo DAD	63
Figura 4.8: Curva de calibração do 17 α -etinilestradiol na faixa estudada, com detecção pelo DAD	63
Figura 4.9: Curva de calibração da estrona na faixa estudada, com detecção pelo DAD	64
Figura 4.10: Curva de calibração do estriol na faixa estudada, com detecção pelo FLD	64
Figura 4.11: Curva de calibração do 17 β -estradiol na faixa estudada, com detecção pelo FLD	65
Figura 4.12: Curva de calibração do 17 α -etinilestradiol na faixa estudada, com detecção pelo FLD	65
Figura 4.13: Cromatograma usado na determinação do limite de detecção pela relação sinal/ruído da solução mista de padrões em concentração de 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$, com detecção pelo DAD	67
Figura 4.14: Cromatograma usado na determinação do limite de quantificação pela relação sinal/ruído da solução mista de padrões em concentração de 300 $\mu\text{g.L}^{-1}$, com detecção pelo DAD	67
Figura 4.15: Cromatograma usado na determinação do limite de detecção pela relação sinal/ruído da solução mista de padrões em concentração de 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$, com detecção pelo FLD	68
Figura 4.16: Cromatograma usado na determinação do limite de quantificação pela relação sinal/ruído da solução mista de padrões em concentração de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$, com detecção pelo FLD	68
Figura 4.17: Cromatograma referente à separação e pureza espectral dos estrogênios: 1) estriol; 2) 17 β -estradiol; 3) 17 α - etinilestradiol e 4) estrona, extraídos de acordo com o experimento 10	76
Figura 4.18: Curva de superfície de resposta relacionando marca do cartucho, valor de pH da amostra e recuperação média dos estrogênios detectados por DAD	77
Figura 4.19: Curva de superfície de resposta relacionando marca do cartucho, valor de pH da amostra e recuperação média dos estrogênios detectados por FLD	77
Figura 4.20: Curva de superfície de resposta relacionando marca do cartucho, vazão da extração e recuperação média dos estrogênios detectados por DAD	78
Figura 4.21: Curva de superfície de resposta relacionando marca do cartucho, vazão da extração e recuperação média dos estrogênios detectados por FLD	78

Figura 4.22: Curva de superfície de resposta relacionando solvente, vazão da extração e recuperação média dos estrogênios detectados por DAD	79
Figura 4.23: Curva de superfície de resposta relacionando solvente, vazão da extração e recuperação média dos estrogênios detectados por FLD	79
Figura 4.24: Cromatograma de uma das amostra de água coletada no Lago de Furnas, referente à separação dos estrogênios com detecção pelo FLD: 1) estriol; 2) 17 β -estradiol; 3) 17 α -etinilestradiol	86
Figura 4.25: Gráfico relacionando o volume útil de água do Lago de Furnas com os meses dos anos de 2015 e 2016	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Características químicas dos estrogênios estrona, 17 β -estradiol, estriol e 17 α -etinilestradiol	26
Tabela 2.2: Estrutura básica de um estrogênio e da estrona, 17 β -estradiol, estriol e 17 α -etinilestradiol	27
Tabela 2.3: Excreção diária ($\mu\text{g}/\text{dia}$) de estrogênios por humanos	30
Tabela 3.1: Coordenadas referentes a cada ponto de coleta de água no Lago de Funas na região de estudo	51
Tabela 3.2: Marca do cartucho, pH da amostra, solvente de eluição e vazão da extração a serem otimizados a partir do planejamento Box-Behnken	55
Tabela 3.3: Condições de extração em fase sólida gerado para cada experimento a partir do planejamento Box-Behnken	56
Tabela 4.1: Tempos de retenção da separação dos padrões de estrogênios	59
Tabela 4.2: Equações da reta e coeficientes de correlação dos estrogênios detectados pelo DAD	61
Tabela 4.3: Equações da reta e coeficientes de correlação dos estrogênios detectados pelo FLD	62
Tabela 4.4: Coeficiente angular da curva de calibração referente a estriol; 17 β -estradiol; 17 α -etinilestradiol e estrona	66
Tabela 4.5: Limite de detecção e limite de quantificação instrumental dos estrogênios com detecção pelo DAD e pelo FLD	66
Tabela 4.6: Dados da exatidão do método para os estrogênios com detecção pelo DAD	69
Tabela 4.7: Dados da exatidão do método para os estrogênios com detecção pelo FLD	70
Tabela 4.8: Valores de recuperação média ($R_{\text{média}}$), coeficiente de variação (CV), $F_{\text{calculado}}$ e F_{tabelado} para os conjuntos de dados do Analista 1 e 2	71
Tabela 4.9: Dados de robustez do método para os estrogênios detectados por DAD	72
Tabela 4.10: Dados de robustez do método para estrogênios detectados por FLD	73
Tabela 4.11: Condições cromatográficas otimizadas para análise dos estrogênios empregando CLAE	74
Tabela 4.12: Valores de recuperação média obtidos para os estrogênios com detecção pelo DAD e pelo FLD após realizar os experimentos de EFS	75
Tabela 4.13: Valores de recuperação obtidos para o estriol, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol após tentativa de reutilização dos cartuchos de extração	81
Tabela 4.14: Valores de pH, oxigênio dissolvido, condutividade e temperatura medidos no entorno dos pontos de coleta de água na região de estudo	82
Tabela 4.15: Valores de turbidez medida em cada amostra de água coletada	85
Tabela 4.16: Concentração média e desvio padrão encontrado para estriol, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol nas amostras de água coletadas na região de estudo	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA - Agência Nacional de Águas

CE – Contaminantes Emergentes

CRM – *Certified Reference Material* (Material de Referência Certificado)

DAD – *Diode Array Detector* (Detector com Arranjo de Diodos)

E1 – Estrona

E2 – 17 β -estradiol

E3 – Estriol

EE2 – 17 α -etinilestradiol

EFS – Extração em fase sólida

ETA – Estação de Tratamento de Água

ETE – Estação de Tratamento de Esgoto

FLD – *Fluorescence Detector* (Detector por Fluorescência)

FM – Fase Móvel

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IE – interferente endócrino

IGAM – Instituto Mineiro de Gestão das Águas

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

LD – Limite de Detecção

ln – logaritmo natural

LQ – Limite de Quantificação

n.d. – não detectado

ONU – Organização das Nações Unidas

PTFE – Politetrafluoretileno

R – Recuperação

RA – Receptores de hormônios andrógenos

REs – Receptores de hormônios esteróides

RG – Receptor de glucocorticoide

RNs – Receptores nucleares

RP – Receptor de progesterona

RTs – Receptores de hormônios da tiróide

r – Coeficiente de correlação

SABESP – Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo

S/N – Sinal/ Ruído

USEPA – United States Environmental Protection Agency

VTG – Vitelogenina

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Objetivos.....	18
1.1.1 Objetivo geral.....	18
1.1.2 Objetivos específicos.....	18
2- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1 Contaminantes emergentes	19
2.2 Interferentes endócrinos (IEs).....	20
2.2.1 Sistema endócrino	20
2.2.2 Mecanismos de ação dos interferentes endócrinos	22
2.2.3 Vias de contaminação por interferentes endócrinos.....	24
2.3 Interferentes endócrinos - hormônios estrogênicos	25
2.4 Hormônios estrogênicos em estudo	25
2.4.1 Estrona.....	27
2.4.2 Estriol	28
2.4.3 17 β -estradiol	28
2.4.4 17 α -etinilestradiol	29
2.4.5 Excreção dos estrogênicos em estudo.....	30
2.5 Ecotoxicidade dos interferentes endócrinos	31
2.5.1 Testes com leveduras realizados em larga escala no Brasil	34
2.6 Procedimentos analíticos	36
2.6.1 Preparo da amostra.....	36
2.6.2 Extração em fase sólida	37
2.6.3 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	40
2.7 Parâmetros de validação da metodologia analítica	42
2.7.1 Seletividade.....	43
2.7.2 Linearidade	43
2.7.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	44
2.7.4 Exatidão	44
2.7.5 Precisão.....	45
2.7.6 Robustez	45
2.8.1 Planejamento de experimentos	46
3- METODOLOGIA.....	47
3.1 Materiais, solventes, reagentes e equipamentos.....	47
3.2 Preparo das soluções estoque e soluções de trabalho.....	48

3.3 Validação do método.....	48
3.3.1 Seletividade.....	48
3.3.2 Linearidade.....	48
3.3.3 Limite de detecção e (LD) limite de quantificação (LQ).....	49
3.3.4 Exatidão.....	49
3.3.5 Precisão.....	49
3.3.6 Robustez.....	50
3.4 Amostragem.....	50
3.5 Preparo das amostras.....	53
3.6 Validação das condições cromatográficas.....	54
3.7 Validação da extração em fase sólida.....	55
3.8 Tentativa de reutilização dos cartuchos utilizados na extração	57
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1. Validação da metodologia analítica	58
4.1.1 Seletividade.....	58
4.1.2 Linearidade.....	61
4.1.3 Limite de detecção e limite de quantificação.....	66
4.1.4 Exatidão.....	69
4.1.5 Precisão.....	71
4.1.6 Robustez.....	72
4.2 Condições cromatográficas otimizadas	73
4.3 Otimização das condições para extração em fase sólida.....	74
4.4 Tentativa de reutilização dos cartuchos utilizados na extração	80
4.5 Determinação dos estrogênios no Lago de Furnas no município de Alfenas - MG.....	82
4.5.1 Algumas características física e químicas das amostras e do entorno dos pontos de coleta	82
4.5.2 Extração das amostras coletadas	85
4.5.3 Análise cromatográfica das amostras coletadas.....	86
5- CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	97
REFERÊNCIAS	98

1- INTRODUÇÃO

A água é certamente o composto químico mais abundante na Terra e um recurso fundamental para a existência da vida, pois, é crucial para o consumo humano e também para inúmeros setores como, agrícola, pecuário, industrial e elétrico. Ao longo das últimas décadas o crescimento populacional acelerou a expansão de todos esses setores, agravando a escassez de fontes hídricas e tornando assim, um problema mundial no que diz respeito à utilização e consumo de água (CHONG; JIN; CHOW, 2010; GORGA et al., 2015; HUANG et al., 2015).

De acordo com os dados da SABESP (2015) a quantidade de água que banha o planeta Terra é de aproximadamente 1,4 bilhões de Km³ e desse valor apenas cerca de 2,5% é de água doce. Desse total de água doce, aproximadamente 68,9% está na forma de geleiras, pólos e icebergs. Cerca de 29,9% está em leitos subterrâneos, 0,9% é encontrada em outros lugares e apenas 0,3% está disponível nos rios e lagos, como representado na Figura 1.1.

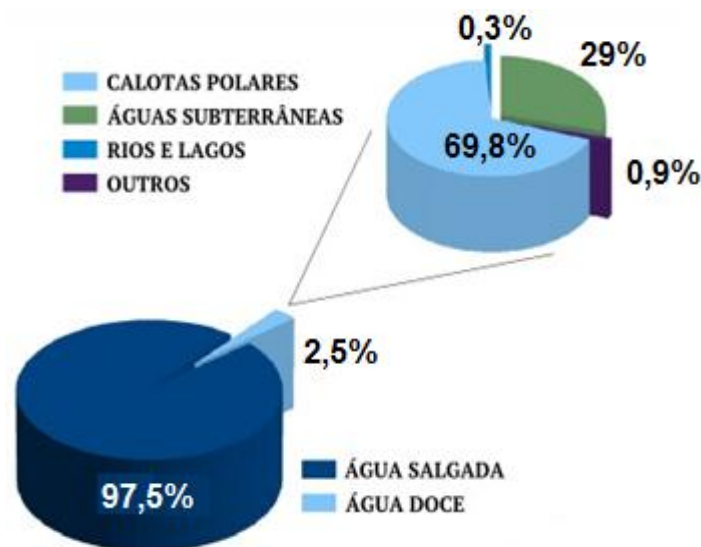


Figura 1.1: Representação da distribuição de água no planeta Terra

Fonte: Adaptado de SABESP (2015).

Apesar da distribuição de água doce ser desigual nas regiões brasileiras, uma vez que, há grandes quantidades de água localizada onde há o menor contingente populacional, o Brasil é um país privilegiado em comparação aos outros, pois, possui cerca de 13% de toda água doce disponível no planeta (SABESP, 2015).

O despejo de compostos sintéticos no meio ambiente tem afetado as funções fisiológicas e endócrinas de organismos aquáticos (BENOTTI et al., 2009; GOKSØYR, 2006).

Essas substâncias potencialmente tóxicas das quais os efeitos ou a presença no ambiente são ainda pouco conhecidos foram denominadas contaminantes emergentes. Esse assunto tem recebido a atenção de pesquisadores da área, uma vez que não possuem nenhuma legislação vigente e se fazem cada vez mais presentes nos ecossistemas aquáticos, tornando-se um risco para a vida de animais e de seres humanos (GAVRILESCU et al., 2015). Apesar do Brasil ser privilegiado em relação ao volume de água doce disponível, essa água está concentrada principalmente na região norte do país, caracterizada por baixa densidade populacional. Na região sudeste onde está concentrada grande parte da população brasileira, os recursos hídricos estão seriamente comprometidos.

O reservatório de Furnas, localizado ao sul/sudoeste do estado de Minas Gerais, constitui uma das mais importantes áreas econômicas do Brasil. Foi criado em função da instituição da Central Hidrelétrica de Furnas pelo Decreto Federal número 41.066 em 1957, devido à grave crise energética ocorrida na época que ameaçava os três principais centros socioeconômicos: Belo Horizonte, Rio de Janeiro e São Paulo. As obras iniciaram-se em 1958 e em 1963 inaugurou-se a primeira unidade. Hoje, a empresa conta com dez usinas hidrelétricas e duas termelétricas (IGAM, 2013).

Furnas é um dos maiores reservatórios do Brasil devido sua área de inundação ser de 1.440 km² (Figura 1.2). Esse reservatório atinge uma população de aproximadamente 800.000 habitantes (IBGE, 2009) banhando 34 municípios mineiros (Quadro 1) e é de suma importância em diversos segmentos da economia desses municípios.

Quadro 1: Municípios mineiros banhados pelo reservatório de Furnas

Aguanil	Campos Gerais	Fama	Pimenta
Alfenas	Cana Verde	Formiga	Ribeirão Vermelho
Alpinópolis	Candeias	Guapé	São João Batista do Glória
Alterosa	Capitólio	Ilicínea	São José da Barra
Areado	Carmo do Rio Claro	Juruaia	Serrania
Boa Esperança	Coqueiral	Lavras	Três Pontas
Cabo Verde	Cristais	Nepomuceno	Varginha
Camacho	Divisa Nova	Paraguaçu	
Campo do Meio	Elói Mendes	Perdões	

Fonte: ALAGO - Associação dos municípios do Lago de Furnas.

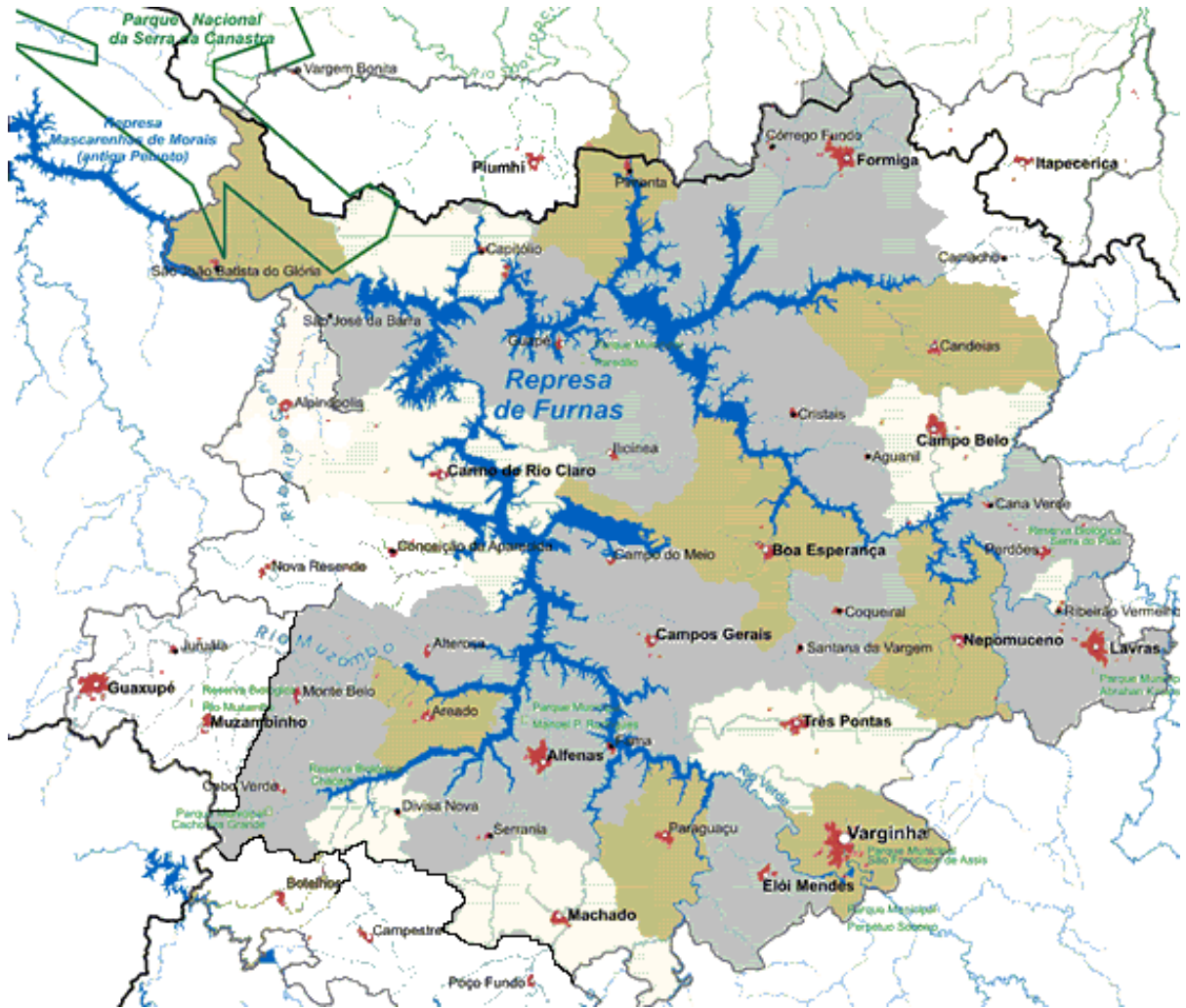


Figura 1.2: Mapa do reservatório de Furnas

Fonte: ALAGO - Associação dos municípios do Lago de Furnas.

Dentre as diversas atividades econômicas desenvolvidas nessa área, a Piscicultura se destaca, uma vez que, existem aproximadamente 500 piscicultores e mais de 5000 tanques de criação de peixes no entorno do Lago de Furnas (IGAM, 2013). Devido à questões logísticas (custos das viagens) e proximidade a Itajubá – MG, o município de Alfenas foi escolhido para o presente estudo. Além disso, no ano de 2013 uma pesquisa desenvolvida pela Epamig (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais), apontou que dentre os municípios banhados pelo Lago de Furnas, Alfenas foi o que apresentou maior índice de poluição das águas.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Validar e otimizar uma metodologia analítica afim de determinar e quantificar a presença dos estrogênios naturais estrona, estriol, 17β -estradiol e o estrogênio sintético 17α -etinilestradiol nas águas superficiais do Lago de Furnas no município de Alfenas - MG.

1.1.2 Objetivos específicos

- ✓ Validar uma metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para monitorar os estrogênios estriol, 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol e estrona;
- ✓ Otimizar as condições de extração em fase sólida e cromatográficas;
- ✓ Efetuar estudos de recuperação do analito;
- ✓ Planejar a execução da amostragem;
- ✓ Aplicar a metodologia validada em amostras de água coletadas no Lago de Furnas;
- ✓ Tentar reutilizar os cartuchos usados na extração em fase sólida.

2- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Contaminantes emergentes

Contaminantes ou poluentes emergentes são substâncias potencialmente tóxicas cujos efeitos ou a presença no ambiente são ainda pouco conhecidos. Tais substâncias podem ser as que já vêm sendo utilizadas há muito tempo assim como, os novos compostos decorrentes dos avanços tecnológicos (DEBLONDE; COSSU-LEGUILLE; HARTEMANN, 2011; MARCOUX et al., 2013; SORENSEN et al., 2015).

Atualmente não há uma listagem exata de classificação dos contaminantes emergentes, nem normativas ou legislação vigente para o controle dessas substâncias no meio ambiente, portanto, não estão incluídas em programas de monitoramento de rotina e o seu destino e efeitos toxicológicos ainda não estão bem estabelecidos (MARCOUX et al., 2013).

Várias classes de compostos químicos são considerados contaminantes emergentes, principalmente produtos utilizados em grandes quantidades rotineiramente para consumo humano e nos setores industriais e agrícolas, como por exemplo, pesticidas, herbicidas, ftalatos, produtos farmacêuticos, compostos polialogenados, produtos de higiene pessoal, surfactantes e resíduos de surfactantes, plastificantes, aditivos industriais entre outros. Essas substâncias podem causar efeitos deletérios ao ambiente, pois, além de serem persistentes no meio que adentram, são introduzidos continuamente (PETROVIC; GONZALEZ; BARCELÓ, 2003).

Existem várias vias de contaminação como, por exemplo, emissões de rejeitos industriais, rejeitos urbanos, entre outras. Contudo uma das principais fontes de contaminação é por meio de águas residuais urbanas não tratadas e os efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE). Uma vez que, a maioria das ETES não são providas de infraestrutura que possibilite o tratamento de tais substâncias, grande parte dos compostos emergentes e seus metabólitos são eliminados juntamente com os efluentes de esgoto atingindo os corpos d'água (BOLONG et al., 2009; PETROVIC; GONZALEZ; BARCELÓ, 2003).

A maioria dessas substâncias químicas são detectadas no meio ambiente em concentração de ng.L^{-1} , porém, alguns desses compostos têm sido associados a efeitos como, disfunção endócrina, distúrbios histopatológicos e feminização de algumas espécies de animais marinhos (BIRCH et al., 2015)

2.2 Interferentes endócrinos (IEs)

No Brasil diferentes denominações têm sido designadas para o termo conhecido mundialmente como “Endocrine Disruptors” (ED) ou “Endocrine Disruptors Chemicals” (EDCs), chamados por pesquisadores brasileiros de “Interferentes Endócrinos”, “Desreguladores Endócrinos”, “Alteradores Endócrinos”, “Disruptores Endócrinos”, entre outros (GHISELLI; JARDIM, 2007). Nesse trabalho será adotado o termo “Interferentes Endócrinos” (IEs).

Muitas definições sobre interferentes endócrinos são apresentadas na literatura, porém, a maioria dos pesquisadores definem IEs como um grupo heterogêneo de substâncias potencialmente capazes de causar alguma disfunção no sistema endócrino em algumas espécies de animais e seres humanos (BILA; DEZOTTI, 2007; FERREIRA, 2013; PESSOA et al., 2014).

Esse grupo de substâncias químicas abrange muitas classes tais como, plastificantes, tensoativos, fármacos, produtos de higiene pessoal, hormônios estrogênicos, dioxinas, pesticidas, metais pesados e compostos policlorados (BILA; DEZOTTI, 2007).

Os IEs chegam aos ambientes aquáticos por diferentes vias de contaminação, como esgotos domésticos, escoamentos agrários e outras vias (ESPERANZA et al., 2007).

Os hormônios estrogênicos naturais e sintéticos têm chamado a atenção de estudiosos da área, por serem detectados em águas de superfícies e apresentar efeitos perturbadores do sistema endócrino de organismos em contato com essas substâncias (SHIN; OH; SHIN, S. K., 2011). Os hormônios estrogênicos comumente encontrados em águas residuais são, estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e estriol (E3), que são hormônios naturais e 17 α -etinilestradiol (EE2) que é um estrogênio sintético amplamente utilizado em pílulas anticoncepcionais (RACZ; GOEL, 2010; YING; KOOKANA; RU, 2002).

Os IEs são divididos em três grupos: estrogênicos que são os estrogênicos esteróides naturais e sintéticos; fitoestrogênicos substâncias originadas de plantas e xenoestrogênicos substâncias sintéticas utilizadas em produtos industriais.

2.2.1 Sistema endócrino

O sistema endócrino é um sistema complexo que coordena e regula a comunicação entre as células. Esse sistema é constituído por vários tecidos que interagem entre si e o resto do corpo, através de sinais mediados pelos hormônios. O sistema endócrino (Figura 2.1) é constituído por um conjunto de glândulas localizadas em diferentes áreas do corpo, como

hipófise na base do cérebro, a tireoide, as gônadas e as glândulas suprarrenais, e pelos hormônios por ela sintetizados, tais como a tiroxina, os estrogênios e progestagênios, a testosterona e a adrenalina (KABIR; RAHMAN, M. S.; RAHMAN, I., 2015; REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006).

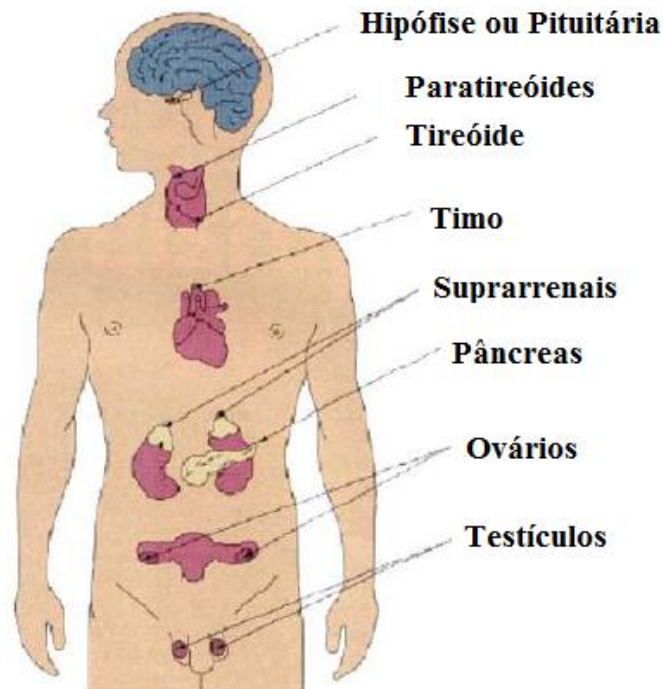


Figura 2.1: Representação do conjunto de glândulas que compõem o sistema endócrino

Fonte: Ghiselli; Jardim (2007).

As glândulas secretam somente a quantidade necessária de hormônio e em momentos específicos, tornando o sistema endócrino sensível e preciso. O hipotálamo é responsável por produzir hormônios, os quais serão armazenados e liberados pela hipófise, que é a principal glândula do sistema endócrino. Porém, esse sistema pode ser influenciado por diferentes estímulos externos. A maioria dos efeitos dos IEs é atribuída à função das gônadas, que controlam o desenvolvimento de diferenciação sexual, características sexuais secundárias, e o funcionamento dos órgãos sexuais (LINTELMANN et al., 2003).

Esse sistema é responsável pelo controle de muitos processos, como a diferenciação das células para o desenvolvimento e formação óssea para a idade adulta, além de controlar o metabolismo e reprodução dos seres humanos. Seu funcionamento se dá por meio da comunicação entre diferentes tipos de células e hormônios, que através da corrente sanguínea produzem efeitos sobre as células e tecidos. Tais hormônios são mensageiros químicos que são

identificados pelas células através de receptores, que são estruturas proteicas especializadas em reconhecimento molecular. Depois da aproximação e interação (hormônio-receptor) ocorre uma série de reações bioquímicas, levando à respostas biológicas específicas (CHEVALIER; FÉNICHEL, 2015; KABIR; RAHMAN, M. S.; RAHMAN, I., 2015; REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006).

2.2.2 Efeitos e mecanismos de ação dos interferentes endócrinos

Os interferentes endócrinos podem estar relacionados à formação de alguns tumores e à progressão maligna de alguns cânceres, tais como, de mama, de testículo e de próstata. Esse fato está intimamente ligado à exposição inadequada ou prolongada a hormônios estrogênicos. A indução de estrogênicos acarreta na proliferação celular e aumento da probabilidade de ocorrer mutações durante a síntese do DNA. Os sistemas fisiológicos afetados por esta perturbação provavelmente incluem todos os sistemas hormonais que vão desde o desenvolvimento e função dos órgãos reprodutivos até mesmo a causa de obesidade, diabetes do tipo 2 ou doença cardiovascular (BILA; DEZOTTI, 2007; CHEVALIER; FÉNICHEL, 2015; HAMPL; KUBÁTOVÁ; STÁRKA, 2014).

O marco comprobatório de que esses produtos atingem o sistema hormonal é o caso do dietilbestrol (DES), que em 1931 era prescrito para mulheres gestantes com idade superior a 30 anos, para prevenção ao aborto espontâneo. Porém, 40 anos depois (1971), descobriu-se que a maioria das filhas dessas mulheres eram estéreis e algumas desenvolveram um tipo raro de câncer na vagina (em 1971), enquanto os filhos adultos apresentavam um risco maior de desenvolver câncer nos testículos (SILVA; MELO; OLIVEIRA, 2007).

Diversos estudos têm sido realizados na tentativa de prever os mecanismos de ação dos IEs, uma vez que, as substâncias químicas identificadas como IEs são diferentes em muitos aspectos e não apresentam estruturas químicas semelhantes. A ação dos interferentes endócrinos podem ser mediadas pela ligação direta por sistemas enzimáticos em receptores nucleares ou de membrana, esteróides e não esteróides, incluindo neurotransmissores. A ligação a estes receptores resulta na estimulação ou inibição dos mecanismos de transcrição ou pós-transcrição celular, interferindo com a atividade dos canais de íons ou de proteínas, que atuam como segundo mensageiros (CASTRO-CORREIA; FONTOURA, 2015).

Os receptores nucleares (RNs) estão envolvidos em diversas funções vitais, por exemplo, o desenvolvimento fetal, homeostase, reprodução e metabolismo. Os RNs estão divididos em: receptores de hormônios esteróides (REs), receptores de hormônios andrógenos

(RA), receptor de progesterona (RP), receptor de glucocorticoide (RG), receptor de mineralocorticoides e os receptores de hormônios da tiróide (RTs) (KABIR; RAHMAN, M. S.; RAHMAN, I., 2015; KIYAMA; WADA-KIYAMA, 2015; SWEDENBORG et al., 2009).

Um determinado hormônio natural inicia sua ação ao se ligar em um receptor hormonal específico, porém, os interferentes endócrinos também podem se ligar a esses receptores, provocando diferentes respostas. Na Figura 2.2 está apresentado um esquema simplificado dos efeitos que podem ser causados em nível celular.

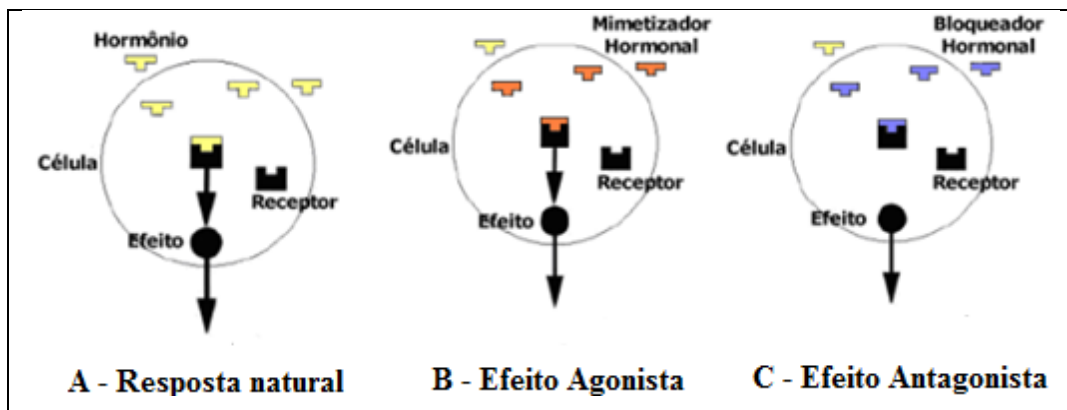


Figura 2.2: Representação esquemática das alterações endócrinas: A- resposta natural; B- Efeito Agonista e C- Efeito Antagonista

Fonte: Ghiselli; Jardim (2007).

A- Resposta natural: nesse caso a célula age em processo normal uma vez que, o hormônio natural se liga a seu receptor e ativa os genes no núcleo da célula para produzir respostas biológicas apropriadas. No caso do estrogênio, essas proteínas aceleram a divisão celular (GHISELLI; JARDIM, 2007).

B- Efeito Agonista: o interferente endócrino é semelhante ao estrogênio, podendo se ligar ao receptor hormonal como o substrato natural e “ativá-lo”, produzindo uma resposta. Nesse caso, o IE vai mimetizar a ação de um determinado hormônio natural e a célula estará sob efeito de um mimetizador (GHISELLI; JARDIM, 2007).

C- Efeito Antagonista: o IE ao se ligar no receptor hormonal não produzirá nenhuma resposta e irá bloquear a ação de um determinado hormônio natural, impedindo que esse se encaixe ao receptor, fazendo com que a célula fique sob o efeito de um bloqueador (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Os IEs que agem como mimetizadores ou bloqueadores competem entre si pelos receptores hormonais. A substância química que vencer essa competição irá alterar a atividade celular, modificando as respostas, sinais e mensagens das células desencadeando implicações no desenvolvimento hormonal (KABIR; RAHMAN, M. S.; RAHMAN, I., 2015).

Em resumo, os IEs podem agir, imitando a resposta de um hormônio natural; bloqueando os receptores hormonais afetando a biossíntese, o metabolismo e transporte dos hormônios naturais; além disso, podem agir a nível do genoma, influenciando a expressão de genes (HAMPL; KUBÁTOVÁ; STÁRKA, 2014; LINTELMANN et al., 2003).

2.2.3 Vias de contaminação por interferentes endócrinos

Os interferentes endócrinos podem atingir os corpos d'água tanto por fontes pontuais como difusas. As fontes pontuais apresentam um ponto de entrada no meio ambiente bem caracterizado, geralmente pelos corpos d'água. Esse grupo engloba os derramamentos acidentais, atividades de mineração, enchentes, descargas de efluentes industriais e domésticos. Em contrapartida as fontes difusas não apresentam um meio de entrada bem caracterizado no meio ambiente, como as deposições atmosféricas e escoamentos superficiais, na maioria dos casos proveniente das práticas agrícolas (GHISELLI; JARDIM, 2007; HAMID; ESKICIOGLU, 2012).

Porém, os meios de exposição aos IEs não estão relacionados apenas ao contato com águas contaminadas por eles. De acordo com Aquino et al., (2013) a exposição aos interferentes endócrinos podem ser a partir de três origens:

- Origem humana: uso de medicamentos, excreção de hormônios naturais, produtos de limpeza e higiene pessoal;
- Origem na agropecuária: excreção de hormônios naturais, aplicação de promotores de crescimento nos animais, uso de pesticidas, reúso de lodo de ETE na agricultura;
- Origem industrial: indústria farmacêutica, produção de plástico, entre outras.

No caso dos hormônios estrogênicos a fonte mais proeminente para que cheguem aos ecossistemas aquáticos é por meio de efluentes domésticos, uma vez que os processos convencionais aplicados nas ETEs não removem totalmente essas substâncias (CHANG et al., 2011; GOMES; SCRIMSHAW; LESTER, 2003; LIU; KANJO; MIZUTANI, 2009).

No entanto, além do esgoto doméstico há outras vias de entrada dessas substâncias (IEs) no meio ambiente, tais como: Lixiviação de campos irrigados com efluente de esgoto, de aterros

sanitários ou de áreas agrícolas adubadas com esterco; Efluentes de cooperativas e de viveiros; Escoamento de pastagens; Efluentes e resíduos industriais; Resíduos excretados por animais, como por exemplo, gados e suínos (BAREL-COHEN et al.; KHANAL, et al., 2006).

2.3 Interferentes endócrinos - hormônios estrogênicos

Nas últimas décadas a medicina veterinária e empreendedores têm usado de forma inadequada os hormônios para a reprodução de peixes fêmeas e engorda de gados e aves, além disso, têm se tornado cada vez mais comum o consumo de medicamentos como, anticoncepcionais e repositores hormonais. Diante desses fatos, a comunidade científica se atenta para o uso e consumo dos hormônios sexuais estrogênicos, por se tratarem de substâncias extremamente ativas e apresentarem maior potencial de ação no sistema endócrino se comparado a outras substâncias consideradas como interferentes endócrinos (HAMID; ESKICIOGLU, 2012; NOOPE et al., 2008).

O colesterol é o precursor das cinco principais classes de hormônios esteróides que são estrogênicos, andrógenos, progestágenos, glicocorticóides e mineralocorticóides. Essas classes de hormônios estão divididas de acordo com suas características estruturais. Em todas essas classes existem hormônios naturais e sintéticos (GUEDES-ALONSO et al., 2014).

Os estrogênicos são esteróides hormonais, substâncias lipossolúveis e de baixa massa molar, são os principais responsáveis pelo crescimento, pela reprodução de espécies animais, incluindo os seres humanos e também por regularem outros processos fisiológicos, tais como, a função imunológica e a homeostase mineral. Em geral são rapidamente absorvidos pelo organismo e, então, metabolizados no fígado (HAMID; ESKICIOGLU, 2012; NOOPE et al., 2008; KJELDEN; BONEFELD-JØRGENSEN, 2013).

2.4 Hormônios estrogênicos em estudo

Os estrogênicos naturais estrona, 17β -estradiol, estriol e o sintético 17α -etinilestradiol, são os hormônios estrogênicos mais comumente encontrados no meio ambiente, apresentam elevado potencial estrogênico e alta adsorção a solos e sedimentos. Além disso, o consumo mundial de estrogênicos sintéticos tem aumentado exponencialmente nos últimos 50 anos, devido ao seu uso como métodos contraceptivos, terapias de reposição hormonal e no setor veterinário como promotores de crescimento. Com isso, esses estrogênicos têm se tornado cada vez mais presentes em ecossistemas aquáticos (BAREL-COHEN et al., 2006; GUEDES-

ALONSO et al., 2014; JARDIM et al., 2012; JOHNSON; BELFROID; DI CORCIA, 2000; LIU, B.; LIU, X., 2004; RACZ; GOEL, 2010).

Na Tabela 2.1 estão apresentadas algumas propriedades químicas dos hormônios estrogênicos em estudo: estrona (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3) e 17 α -etinilestradiol (EE2).

Tabela 2.1: Características químicas dos estrogênios estrona, 17 β -estradiol, estriol e 17 α -etinilestradiol

Sigla	CAS	Fórmula molecular	Massa molar (g.mol⁻¹)	Log K_{ow}	K sorção	Solubilidade em água mg. L⁻¹ (20°C)	pKa
E1	53-16-7	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270,37	3,13	4882	30	10,4
E2	50-28-2	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272,30	4,01	3300	3,6	10,4
E3	50-27-1	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	288,37	2,45	1944	116	--
EE2	57-63-6	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296,41	3,67	4770	441	10,46- 10,7

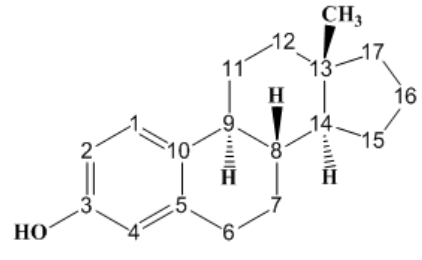
pKa; cologarítimo da constante de dissociação ácida; Log Kow: coeficiente de partição octanol-água; k sorção: constante de sorção.

Fonte: Ghiselli; Jardim (2007); Hamid; Eskicioglu (2012).

As características químicas dos estrogênios em estudo mostram que são compostos moderadamente hidrofóbicos, com valores de coeficientes de partição octanol-água maiores que 2,81, além de apresentarem baixa solubilidade e altos valores de pKa, o que indica baixa dissociação dos hormônios em meios aquosos. Por outro lado, diante dos altos valores do coeficiente de sorção espera-se que esses hormônios apresentem alto potencial de sorção em solos e sedimentos, o que causa redução de suas concentrações em meios aquosos (DOLAR et al., 2012; LAI et al., 2000; SILVA; OTERO; ESTEVES, 2012; YING; KOOKANA; RU, 2002).

A estrutura química dos estrogênios é composta por 17 átomos de carbono dispostos em quatro anéis ligados entre si, estrutura conhecida como ciclo-pentano-peridro-fenantreno. Esta estrutura pode conter ligações duplas, grupos metilas, carbonilas e hidroxilas que darão origem a uma série de hormônios derivados. Embora, os quatro estrogênios em estudo possuam estruturas químicas semelhantes, eles se diferenciam pelos radicais do carbono 16, e no caso do 17 α -etinilestradiol nos carbonos 16 e 17, como apresentado na Tabela 2.2 (GUEDES-ALONSO et al., 2014; LINTELMANNI et al., 2003; YING; KOOKANA; RU, 2002).

Tabela 2.2: Estrutura básica de um estrogênio e de: estrona, 17 β -estradiol, estriol e 17 α -etinilestradiol

Estrutura básica	Estrogênio	C16	C17
	Estrona		$\text{C}=\text{O}$
	17 β -estradiol		$\text{C}-\text{OH}$ (wedged bond)
	Estriol	$\text{C}-\text{OH}$ (dashed bond)	$\text{C}-\text{OH}$ (wedged bond)
	17 α -etinilestradiol		$\text{C}-\text{OH}$ (wedged bond)

Fonte: Adaptada de Guedes - Alonso et al. (2014).

2.4.1 Estrona

A estrona (Figura 2.3) é considerada um estrogênio natural feminino. Porém, está presente na circulação sanguínea de homens e mulheres, sendo excretado diariamente por ambos. Esse fato causa o aumento da concentração desse estrogênio em efluentes de águas residuais. Mulheres no período de menopausa apresentam concentração de estrona no plasma sanguíneo consideravelmente maior em comparação às concentrações dos estrogênios estriol e 17 β -estradiol (ZHANG et al., 2013).

A estrona (E1) pode ser proveniente da degradação por oxidação do β -estradiol. Em termos de potencial estrogênico, E1 é cerca de duas a três vezes menos potente que β -estradiol (PRATER; HORTON; THOMPSON, 2015).

Os grupos funcionais presentes na molécula desse hormônio podem facilitar a formação de ligações de hidrogênio da molécula de estrona com a superfície de algumas membranas, segundo o estudo de NGHIEM et al. (2004).

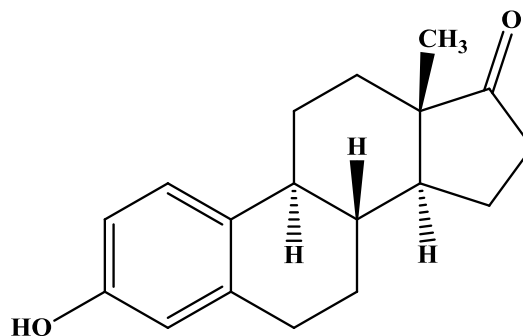


Figura 2.3: Representação estrutural molecular do estrogênio estrona

Fonte: Arquivo pessoal.

2.4.2 Estriol

O estrogênio natural estriol (Figura 2.4) está presente na circulação sanguínea de homens e mulheres. Durante a gravidez, é produzido pela placenta e há um aumento em sua concentração, com isso a quantidade de estriol excretada por gestantes é significativamente maior em comparação à excreção dos estrogênios estrona e 17 β -estradiol. O estriol é um metabólito proveniente da oxidação do β -estradiol (PRATER; HORTON; THOMPSON, 2015).

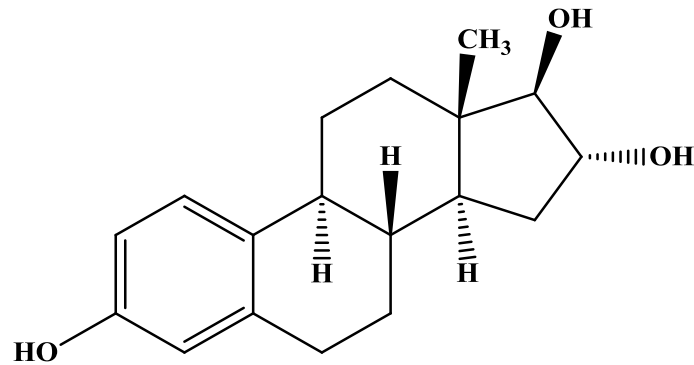


Figura 2.4: Representação estrutural molecular do estrogênio estriol

Fonte: Arquivo pessoal.

2.4.3 17 β -estradiol

O 17 β -estradiol (E2), representado na Figura 2.5, é um estrogênio natural que estimula a proliferação e crescimento nos órgãos do trato reprodutivo, ativa o desenvolvimento do endométrio do útero, e influencia na libido (LINTELMANN et al. 2003).

A molécula desse estrogênio possui no total 18 átomos de carbono e conta com um grupo hidroxila ligada ao anel de cinco membros e um anel fenólico, que é o componente estrutural responsável pela alta afinidade em ligar-se ao receptor de estrogênio e elucidar a resposta estrogênica. Sendo assim, processos que sejam capazes de alterar o anel fenólico tendem a suprimir a afinidade estrogênica pelo receptor. O grupo hidroxila no átomo de carbono 17 pode estar na posição equatorial ou axial, o que influenciará seu potencial estrogênico. O 17 β -estradiol é cerca de 10 vezes mais potente que o 17 α -estradiol, que é proveniente de resíduos de animais (HUBER et al., 2003).

Devido às várias transformações que os hormônios podem sofrer nos organismos de seres humanos e animais, o E2 é rapidamente oxidado a estrona, que pode ainda ser convertido em estriol, o principal produto de excreção (GUEDES-ALONSO et al., 2014; STUMPE; MARSCHNER, 2009; YING; KOOKANA; RU, 2002).

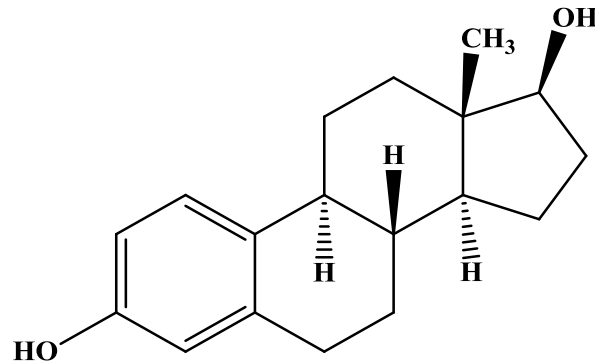


Figura 2.5: Representação estrutural molecular do estrogênio 17β-estradiol

Fonte: Arquivo pessoal.

2.4.4 17α-etinilestradiol

O 17α-etinilestradiol (EE2), representado na Figura 2.6, é um derivado do hormônio natural estriol. Embora ambos estrogênios possuam estruturas químicas semelhantes o EE2 é mais resistente a biodegradação e apresenta maior afinidade pelo receptor de estrogênio. Pesquisas apontam que a resposta estrogênica do EE2 em comparação às respostas dos hormônios 17β-estradiol (E2) e estrona pode ser até duas vezes mais elevada para seres humanos. Além disso, em estudos realizados em peixes, esse hormônio tem se mostrado de 11-30 vezes mais potente do que o E2 (ARIS; SHAMSUDDIN; PRAVEENA, 2014; COLMAN et al. 2009; LIMA; SCHNEIDER; ESTEVES, 2012; SAARISTO et al., 2009; TOMŠÍKOVÁ et al., 2012).

Esse hormônio é atualmente utilizado na maioria das formulações de pílulas anticoncepcionais, sua dosagem varia de 15 a 50 µg por comprimido. Devido a isso, sua concentração em efluentes de águas residuais tem aumentado, principalmente em países que visam controlar a taxa de natalidade como, por exemplo China (DUONG et al., 2010).

Além de ser usado como método contraceptivo e terapias de reposição hormonal, a agricultura e aquicultura também fazem uso de EE2 como promotores de engorda de aves e gados, mudança de sexo e otimização do crescimento de peixes (KÖRNER et al., 2008; NOPPE et al., 2008).

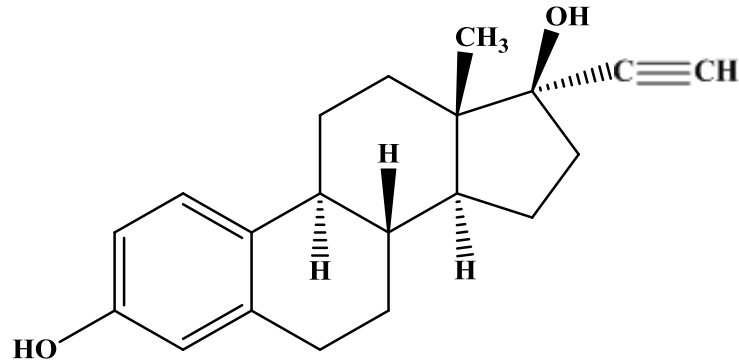


Figura 2.6: Representação estrutural molecular do estrogênio 17 α -etinilestradiol

Fonte: Arquivo pessoal.

2.4.5 Excreção dos estrogênios em estudo

Os estrogênios estrona, 17 β -estradiol e estriol são excretados pela urina diariamente por mulheres, animais fêmeas e, em menor quantidade por homens (KUMAR et al., 2009). Na Tabela 2.3 estão apresentados os valores desses três estrogênios excretados por humanos, porém para as mulheres as quantidades variam de acordo com alguns períodos, como, menstruação, gestação ou menopausa (BILA; DEZOTTI, 2007; ZENG; LI; GU, 2009).

Tabela 2.3: Excreção diária (μg) de estrogênios por humanos

Estrogênio	Excreção por homens ($\mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$)	Excreção por mulheres ($\mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$)		
		Menstruada	Grávida	Menopausa
Estrona	3,9	8,0	600	4,0
Estriol	1,5	4,8	6000	1,0
17 β -estradiol	1,6	3,5	259	2,3

Fonte: Adaptado de Bila; Dezotti (2007).

Esses estrogênios ao serem excretados pela urina estão na forma de conjugados polares, predominantemente como glucoronídeos e sulfatos (Figura 2.7). Essas moléculas podem substituir os radicais do C3 ou C17 nas moléculas dos estrogênios na forma desconjugada (GORGA; PETROVIC; BARCELÓ, 2013; KUMAR et al., 2009; ZHENG et al., 2013).

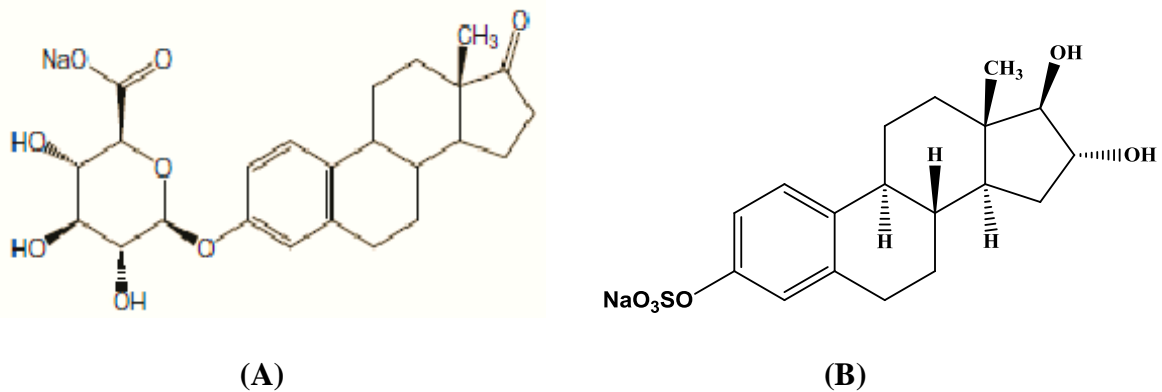


Figura 2.7: Representação estrutural molecular dos estrogênios (A) Estrona-3-Glucoronídeo de Sódio, B) Estiol-3-Sulfato de Sódio

Fonte: Zheng et al., (2013); Kumar et al. (2009).

Esses conjugados polares são biologicamente inativos e mais solúveis em água em comparação a sua forma não conjugada. Entretanto, há evidências que durante a excreção e o transporte nos sistemas de tratamento de esgoto, ocorra reações de desconjugação por microorganismos, convertendo assim, essas substâncias em estrogênios livres novamente, o que os tornam biologicamente mais ativos (GOEPPERT; DROR; BERKOWITZ, 2015; HAMID; ESKICIOGLU, 2012; KUMAR et al., 2012; ZHAO et al., 2015).

2.5 Ecotoxicidade dos interferentes endócrinos

Estudos relatam que os sistemas reprodutivos de certos organismos terrestres e aquáticos são afetados por interferentes endócrinos, resultando no desenvolvimento de anormalidades e na deterioração reprodutiva nos organismos expostos (GÜLTEKIN; INCE, 2007; RICHTER et al., 2007; VANDENBERG et al., 2009). Diante desses efeitos, vários testes e biomarcadores têm sido desenvolvidos para detectar a atividade estrogênica dessas substâncias químicas (SOLÉ; PORTE; BARCELÓ, 2001).

A atividade estrogênica é um indicativo da ocorrência de algum efeito biológico em decorrência da presença de alguma substância química e ensaios *in vivo* e *in vitro* são alternativas que possibilitam identificar atividade estrogênica ou efeitos da amostra mesmo sem o conhecimento de suas propriedades químicas (FERREIRA et al., 2007).

Diversos ensaios *in vitro* têm sido desenvolvidos, porém, os mais empregados para a detecção de IEs são os ensaios que avaliam a proliferação celular, a interação com receptores hormonais e de gene repórter em células de mamíferos ou leveduras, tais como:

- MCF-7: proliferação de células induzida por compostos estrogênicos de células mamárias humanas cancerígenas, baseado na contagem do número de células. Compostos adicionados ao meio de cultura inibem a proliferação dessas células, já os compostos estrogênicos induzem sua proliferação pela anulação desse efeito (SOTO et al., 2004);
- ER-CALUX: é um ensaio de ativação química da expressão gênica da luciferase mediante um receptor estrogênico (VAN DER BURG et al., 2010);
- Ensaio Lesk: atividade estrogênica medida através da emissão de luz, quando há ligação de compostos estrogênicos com o receptor de estrogênio (medida por luminômetro). O gene luc é o repórter, portanto adiciona luciferina no meio de cultura das leveduras para que a reação de produção de luz ocorra fora da célula (LESKINEN et al., 2005);
- YES (*Yeast estrogen screen* ou ensaio com tela de levedura): avalia a capacidade de um composto em mimetizar o estrogênio natural, para tal, utiliza a linha de células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada. A sequência de DNA do receptor de estrogênio humano foi inserida no genoma dessas leveduras com o intuito de identificar compostos que apresentam atividade estrogênica (LI et al., 2014).

Dias e colaboradores (2015), por meio do ensaio YES, analisaram a atividade estrogênica em amostras de águas das saídas de Estações de Tratamento de Água convencionais (ETA) e dos Rios Paraíba do Sul e Guandu em cinco cidades do estado do Rio de Janeiro. Ao longo de alguns pontos dos rios e na saída da ETA a atividade estrogênica foi identificada em níveis superiores a 1 ng.L^{-1} . Mesmo nas águas tratadas advindas do Rio Guandu 25% das amostras analisadas estavam acima de 1 ng.L^{-1} .

Os hormônios estrogênicos possuem atividade estrogênica diferente dependendo de sua origem. Os de origem sintética apresentam potencial estrogênico mais elevado que os de origem natural. Um ensaio in vivo muito considerado para a investigação de contaminantes estrogênicos é o aumento da concentração de vitelogenina (VTG) em organismos aquáticos, principalmente em espécies de peixes. A vitelogenina é uma fosfolipoglicoproteína que desempenha papel crucial no sistema reprodutor de vertebrados ovíparos fêmeas. Essa proteína é sintetizada no fígado e transportada através da corrente sanguínea para os ovários, onde são apreendidas pelos ovócitos em crescimento para atuarem no desenvolvimento embrionário (MATOZZO et al., 2008; REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006; SOVERCHIA et al., 2005).

A síntese de VTG é regulada por hormônios estrogênicos, dentre eles pelo 17β -estradiol. Portanto, como consequência do aumento da concentração de VTG no plasma sanguíneo dos

peixes fêmeas durante a maturação sexual têm-se o aumento da concentração do 17β -estradiol (SOVERCHIA et al., 2005).

Em geral, a codificação do gene da VTG em indivíduos imaturos ou peixes machos é inexistente ou fracamente expressada sob condições normais, possivelmente, pela concentração baixa de estrogênio no plasma sanguíneo. Uma vez que, a síntese de VTG é controlada por estrogênios, o aumento da concentração dessa proteína no sangue desses indivíduos representa um biomarcador de exposição a essas substâncias (Figura 2.8) (MATOZZO et al., 2008; REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006; SOVERCHIA et al., 2005).

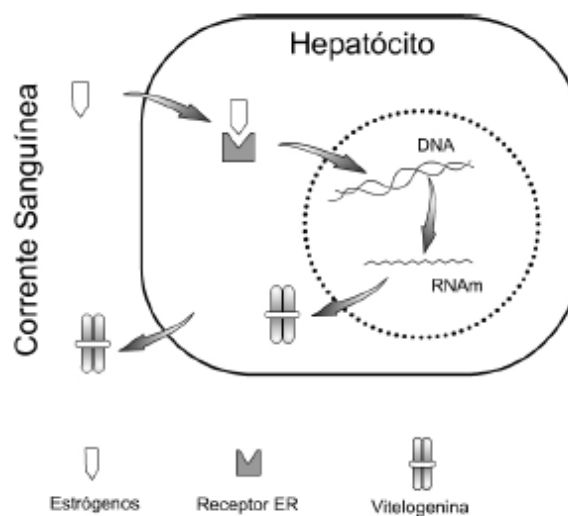


Figura 2.8: Representação simplificada de processos que leva à síntese do biomarcador de exposição VTG em peixes machos

Fonte: Reis Filho; Araújo; Vieira (2006).

A exposição desses organismos à concentrações de estrogênios têm sido estudada por diversos pesquisadores a fim de avaliar os efeitos causados. Nos estudos de Gimeno et al. (1998) e Jobling et al. (1998), foi observado que as espécies de peixes *Cyprinus carpio* e *Rutilus ruti* sofreram feminização ao ser expostos a estrogênios durante o período crítico da diferenciação sexual.

Kidd et al. (2007) realizaram um estudo com peixes da espécie *Pimephales promelas* durante sete anos no noroeste de Ontário no Canadá. Um lago foi contaminado com estrogênio sintético 17α -etinilestradiol. Concluíram que a exposição crônica desses animais a esse estrogênio em concentrações de $5-6 \text{ ng.L}^{-1}$ causou feminização dos machos por meio da

produção de vitelogenina (VTG), impacto no desenvolvimento gonadal nos machos e nas fêmeas, e além disso, esses animais não conseguiram se reproduzir.

Körner et al. (2008) realizaram um estudo a fim de avaliar a interação entre a temperatura da água com a produção de vitelogenina, induzida por estrogênios presentes nessa água. Para tal, peixes da espécie *Salmo trutta* foram expostos a concentrações de etinilestradiol em temperatura, baixa, média e alta. Foi observado claramente que quanto maior a temperatura, mais elevada era a concentração de VTG no plasma sanguíneo dos peixes em estudo. Porém, a expressão do gene receptor de estrogênio beta-1 e do receptor de glucocorticóide, não sofreram alterações diante da variação de temperatura.

Nos estudos realizados por Saaristo et al. (2010), os peixes da espécie *Pomatoschistus minutus* foram investigados durante quatro semanas. Os machos dessa espécie no período de acasalamento disputam pelas fêmeas e defendem seus ninhos contra intrusos, porém os peixes expostos a 17α -etinilestradiol na concentração de 11 ng.L^{-1} , apresentaram indução de VTG no plasma sanguíneo, atrasos na construção dos ninhos, além de se mostrarem menos agressivos.

2.5.1 Testes com leveduras realizados no Brasil

Técnicos da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) juntamente com uma equipe de pesquisadores da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) realizaram testes com leveduras transgênicas luminescentes para avaliar a estogenicidade de IEs em água potável e de mananciais (VASCONCELOS, Y., 2012).

De forma simplificada o processo funciona como mostrado na Figura 2.9: 1) As leveduras transgênicas contêm genes receptores de estrogênio humano e um gene de uma bactéria luminescente que a faz brilhar; 2) A levedura é introduzida na amostra de água que será testada; 3) Em presença de algum estrogênio, como, estriol, estrona, 17α -etiilestradiol e 17β -estradiol, a levedura se liga a ele e emite luz; 4) Com um luminômetro é medida a luminosidade dessas leveduras (MONTAGNER; JARDIM, 2011).

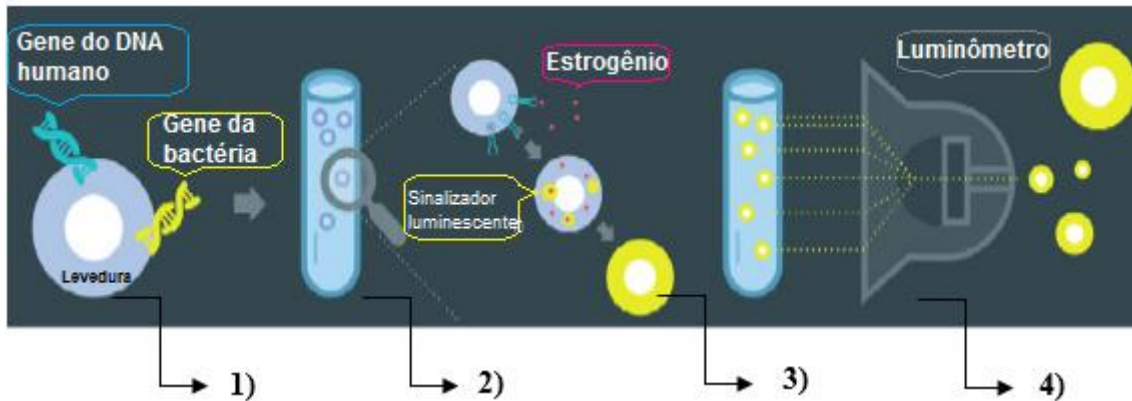


Figura 2.9: Esquema simplificado do teste com leveduras transgênicas luminescentes

Fonte: Adaptada de Vasconcelos (2012).

Este é um dos estudos pioneiros realizados pela CETESB, porém, segundo o órgão, além do uso de bioensaios é necessário que a legislação seja mudada, para que este tipo de contaminação seja fiscalizado com mais vigor e detectada com maior antecedência (VASCONCELOS, Y., 2012).

Bergamasco e colaboradores (2011) realizaram um estudo a fim de avaliar a estrogenicidade das águas brutas e tratadas com diferentes graus de poluição, no reservatório Tanque Grande, rio Atibaia, rio Sorocaba e rio Cotia. Para tal, foi usado o *Blyes* (do inglês – *bioluminescent yeast estrogen screen* ou ensaio com levedura bioluminescente para detecção de estrogênio) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem. Dos cinco IEs em estudo (bisfenol-A, estriol, estrona, 17α -etiilestradiol e 17β -estradiol), apenas bisfenol-A não foi detectado nas amostras de água. Em relação aos demais, na maioria das amostras de água bruta, foi detectado pelo menos um deles e 16 dessas amostras apresentaram sinal positivo no *Blyes*. Já nas amostras de água potável, não foi detectado nenhum dos cinco IE e nenhuma atividade estrogênica foi apresentada. Os pesquisadores concluíram que *Blyes* apresentou boa sensibilidade com um limite de detecção de $0,1 \text{ ng equiv.E2 L}^{-1}$, podendo se tornar um instrumento adequado para o monitoramento de água.

2.6 Procedimentos analíticos

Os interferentes endócrinos estão presentes em amostras ambientais líquidas e sólidas em concentrações baixas, porém, são persistentes no ambiente e apresentam atividade estrogênica elevada. Diante disso, métodos analíticos têm sido propostos para a separação, detecção e quantificação dessas substâncias, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia a gás acoplado a um espectrômetro de massas (CG/MS), cromatografia a líquido acoplado a um espectrometro de massas em tandem (LC-MS/MS). Tais técnicas são extremamente sensíveis e precisas (BROSSA et al., 2002; TOMŠÍKOVÁ et al., 2012; TRENHOLM et al., 2006).

Além da análise pelos métodos cromatográficos, atualmente, técnicas eletroquímicas que são mais rápidas, fáceis e eficientes vêm sendo empregadas para a monitoração dos IEs no meio ambiente (BROWNE et al., 2013; PENU et al., 2015).

Por se apresentarem em concentrações de ng.L^{-1} se torna necessário a realização do preparo da amostra, por meio da extração em fase sólida on-line, off-line ou em discos; extração líquido-líquido; microextração em fase sólida; extração sortiva em barras entre outras técnicas (CALDAS et al., 2011).

2.6.1 Preparo da amostra

Atualmente a comunidade científica visa metodologias mais rápidas, precisas, exatas e sensíveis, para tal, alguma técnica de preparo de amostra é necessário na maioria dos casos (BORGES; MANO; PEREIRA, 2015).

O preparo da amostra tem como propósito isolar ou concentrar os analitos de uma matriz. Essa etapa é imprescindível no procedimento analítico, pois ocorre a limpeza (*clean-up*) da amostra e enriquecimento dos analitos para a análise sem que os instrumentos analíticos corram o risco de serem danificados. Além disso, é a partir do preparo de amostras que analitos em concentrações a níveis de traços serão concentrados e os interferentes da matriz eliminados, possibilitando uma análise posterior (CHEN et al., 2008; SMITH, 2003).

2.6.2 Extração em fase sólida

Muitos procedimentos analíticos têm sido propostos para concentrar e quantificar hormônios naturais e/ou sintéticos em meios aquáticos. A extração em fase sólida (EFS) é uma etapa muito utilizada e de suma importância para a concentração de compostos que estão presentes em nível de ultratraços, pois esse procedimento permite que a amostra alcance os limites de quantificação determinado pelas metodologias analíticas e que possam ser analisados por técnicas cromatográficas, como por exemplo, por cromatografia líquida de alta eficiência (LÓPEZ DE ALDA; BARCELÓ; FRESENIUS, 2001).

A EFS é uma técnica de separação líquido-sólido empregada para extração de analitos semivoláteis e não voláteis de amostras líquidas ou para amostras sólidas pré-extraídas com solvente. Foi desenvolvida para suprir as desvantagens da extração líquido-líquido clássica tais como, alto consumo de solventes e conseqüentemente maior geração de resíduos tóxicos, difícil automação, baixas porcentagens de recuperação dos analitos. A EFS apresenta alta capacidade de concentração dos analitos e muitos equipamentos (manifolds) e sorventes estão disponíveis comercialmente. Porém, como desvantagens, essa técnica apresenta, altos custos dos cartuchos e equipamentos, tempo elevado de extração e dificuldade na escolha do adsorvente apropriado para a análise (JARDIM, 2010).

Os mecanismos de separação que ocorrem na EFS estão relacionados a processos físicos, químicos e mecânicos, sendo os principais mecanismos, adsorção, partição (fase normal e reversa), troca iônica e exclusão. No caso de fase reversa, as principais forças químicas e físicas que atuam entre as moléculas dos analitos e do sorvente são as de van der Waals, entre as ligações carbono-hidrogênio do analito com os grupos funcionais da superfície da sílica. Em fase normal, as principais interações são entre os grupos polares da fase sólida e do analito, por meio de ligações de hidrogênio, interações π - π , dipolo- dipolo, dipolo- dipolo induzido e dipolo induzido- dipolo induzido. Na separação por troca iônica as extrações seletivas dos analitos ocorrem por meio de interações iônicas (HERNÁNDEZ-BORGES, 2007; JARDIM, 2010, 2015).

Essa técnica emprega fases sólidas, chamadas de sorventes, recheadas em cartuchos que são utilizados uma única vez e podem se apresentar nas formas de barril ou seringas (JARDIM, 2015; LANÇAS, 2004). A EFS pode ser utilizada com intuito de alcançar os seguintes objetivos:

1. Extração e/ou concentração do analito: grande volume da amostra é passado pela fase sólida a fim de reter os analitos e deixar passar os interferentes e solventes. Em seguida, os analitos são eluídos com pequenos volumes de solventes, sendo assim sua concentração final bem maior que na amostra original;
2. Isolamento do analito: esse procedimento não visa concentrar o analito mas sim isolar o analito dos compostos interferentes que podem estar presentes na matriz;
3. Isolamento da matriz ou clean-up (limpeza) da amostra: nesse caso, os compostos interferentes são retidos na fase sólida enquanto os analitos são eluídos;
4. Estocagem: utilizado para casos em que a coleta da amostra é distante do local que a amostra será analisada. No local da coleta a amostra é passada pelo cartucho para a retenção dos analitos, em seguida armazenado adequadamente e transportado para o laboratório.

Em geral, os procedimentos de EFS são constituído por 4 etapas. Na Figura 2.10 podem ser visualizadas as principais etapas envolvidas quando o propósito é isolar e/ou concentrar o(s) analito(s): 1) condicionamento ou ativação do sorvente presente no cartucho pela passagem do solvente adequado; 2) percolação da amostra, quando ocorre a retenção dos analitos ou às vezes de alguns interferentes; 3) limpeza do cartucho com solução apropriada para retirar os interferentes menos retidos que os analitos, etapa chamada de lavagem ou clean-up e 4) eluição e coleta dos analitos. (JARDIM, 2015; LANÇAS, 2004).

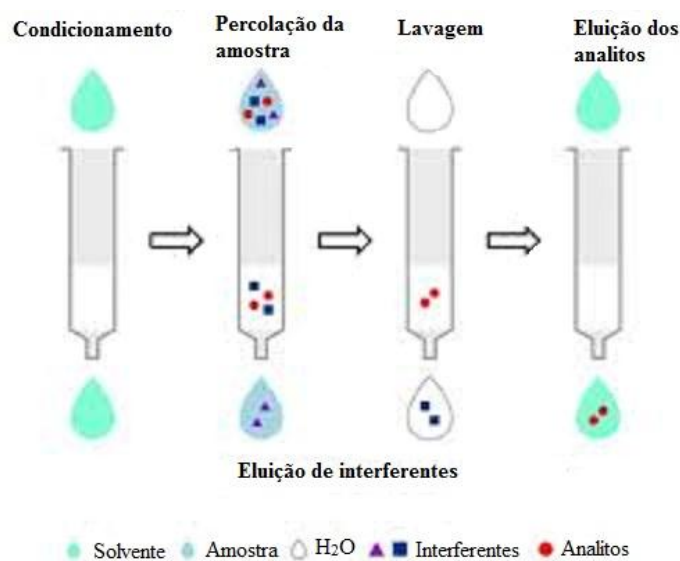


Figura 2.10: Representação simplificada das etapas de extração em fase sólida dos IEs

Fonte: Adaptado de Caldas; Gonçalves; Primel (2011).

A escolha do tipo de sorvente, volume de amostra, dos solventes e vazão da extração são parâmetros que devem ser considerados e determinados de acordo com cada análise que se deseja realizar (JARDIM, 2015; LÓPEZ DE ALDA; BARCELÓ, 2001).

Há disponível comercialmente diversos materiais que são empregados como fases adsorventes em extração em fase sólida (Figura 2.11).







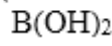
NÃO POLARES		
C18	Octadecilsilano	= Si – (CH ₂) ₁₇ – CH ₃
C8	Octilsilano	= Si – (CH ₂) ₇ – CH ₃
C2	Etilsilano	= Si – CH ₂ – CH ₃
C1	Metilsilano	= Si – CH ₃
PH	Fenilsilano	= Si – 
CH	Cicloexilsilano	= Si – 
POLARES		
FL	Florisil	MgO ₃ Si
AL	Alumina	Al ₂ O ₃
Si	Sílica	= Si – OH
CN	Cianopropilsilano	= Si – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – CN
2OH	Diolsilano	= Si – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – O – CH ₂ –  – CH ₂ – 
NH ₂	Aminopropilsilano	= Si – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – NH ₂
PSA	N- Propiletlenodiaminossilano	= Si – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – NH – CH ₂ – CH ₂ – NH ₂
TROCA IÔNICA		
SCX	Benzenossulfonilpropilsilano	= Si – CH ₂ – CH ₂ –  – SO ₃ ⁻ H ⁺
PRS	Sulfonilpropilsilano	= Si – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – SO ₃ ⁻ Na ⁺
CBA	Carboxmetilsilano	= Si – CH ₂ – CH ₂ – COOH
DEA	Dietilaminopropilsilano	= Si – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – N(CH ₂ – CH ₃) ₂
SAX	Trimetilaminopropilsilano	= Si – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – N ⁺ (CH ₃) ₃ Cl ⁻
PSA	N-Propiletlenodiaminossilano	= Si – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – NH – CH ₂ – CH ₂ – NH ₂
COVALENTE		
PBA	Ácido fenilborônico	= Si – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – NH –  – 

Figura 2.11: Exemplo de sorventes utilizados para extração em fase sólida
Fonte: Queiroz; Collins; Jardim (2001).

Os grupos comumente utilizados como sorventes são à base de sílica quimicamente ligados e podem ser divididos em 3 categorias: 1) fase reversa (FR) quando o sorvente possui caráter menos polar que o solvente de eluição; 2) fase normal (FN) quando o sorvente possui caráter mais polar que o solvente e 3) troca iônica (TI). Para a escolha do sorvente deve ser levado em consideração as propriedades dos analitos de interesse, a natureza da matriz e dos interferentes a serem eliminados (JARDIM, 2015; QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001).

A EFS pode ser conduzida no modo on-line ou off-line, este último é o mais utilizado pelo fato do modo on-line exigir gastos maiores com o equipamento. No modo off-line, após a etapa de pré-tratamento, a amostra é introduzida de modo convencional no sistema cromatográfico, já no modo on-line, o mesmo equipamento incorpora os mesmos dispositivos para extração, clean-up, eluição da amostra e o cromatógrafo, geralmente o cromatógrafo a líquido é o mais utilizado nesse modo. Há também outras configurações para a realização dessa técnica, como por exemplo a extração em discos e microextração em fase sólida (JARDIM, 2015).

2.6.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia é um método amplamente empregado que permite a separação, identificação e determinação de compostos químicos muito semelhantes em misturas complexas. Nessa técnica há duas fases, uma das fases permanece estacionária, imobilizada em uma coluna ou em uma superfície plana, enquanto a outra se move através dela. Em todas as separações cromatográficas a amostra é transportada pela fase móvel que é forçada a passar por uma fase estacionária. A fase móvel pode ser um líquido, um gás ou um fluido super crítico. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária os componentes da mistura são distribuídos por elas de modo que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes (COLLINS, 2006; HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Os métodos cromatográficos estão classificados de acordo com o meio físico que a fase estacionária entra em contato, se essa estiver em um tubo é chamado de cromatografia em coluna, porém se estiver suportada sobre uma placa plana ou sobre a superfície de um papel é denominado cromatografia planar. Em relação à fase móvel os métodos cromatográficos se dividem em cromatografia a gás, cromatografia a líquido e cromatografia com fluido super crítico. Somente a cromatografia a líquido pode ser realizada em colunas e em superfícies

planares, as demais são restritas aos procedimentos em colunas (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Existem vários tipos de cromatografia em fase líquida e podem estar divididas em: 1) cromatografia líquido-sólido ou adsorção que possui fase estacionária sólida e o tipo de equilíbrio que atua é adsorção; 2) troca iônica que baseia-se na separação de íons utilizando resinas trocadoras de íons; 3) exclusão por tamanho, na qual a separação depende do tamanho das moléculas e dos poros da resina utilizada, por isso esse tipo de cromatografia não consegue separar misturas complexas; 4) bioafinidade, onde as separações ocorrem devido as interações bioquímicas altamente específicas; 5) cromatografia líquido-líquido ou partição, está baseada na distribuição de moléculas do soluto entre duas fases imiscíveis, de acordo com as solubilidades relativas. O meio de separação é um sólido inerte finamente dividido que suporta uma fase líquida fixa (fase estacionária). A separação é feita passando-se uma fase móvel sobre uma fase estacionária normalmente empacotada em uma coluna. A cromatografia líquido-líquido pode ser denominada em fase normal quando a fase estacionária possui caráter polar e a fase móvel caráter apolar. Para os casos contrário a esse, a técnica é designada cromatografia líquido-líquido em fase reversa (COLLINS, 2006; HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

O suporte mais utilizado para a cromatografia líquida de fase reversa é a sílica, devido suas excelentes propriedades físicas, baixos níveis de impurezas metálicas, disponibilidade em áreas superficiais específicas e por possuir como grupos ativos silanóis, que são altamente resistentes a pH na faixa entre 2 e 8 (SILVA et al., 2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) emprega colunas recheadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel eluída sob altas pressões. Os instrumentos utilizados no sistema de CLAE podem ser totalmente automatizados e são basicamente constituídos por: reservatório de fase móvel, bomba de pressão, injetor, coluna cromatográfica, detector (um ou mais) e sistema de aquisição de dados (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

Muitos detectores têm sido desenvolvidos para o uso em CLAE, visando a melhoria dos seguintes parâmetros: rápida aquisição dos dados, seletividade, sensibilidade, reprodutibilidade, estabilidade, resposta rápida e linear aos analitos, confiabilidade e não contribuir para o alargamento de picos. A classe de detectores mais utilizada na CLAE é a óptica, que engloba os de fluorescência, índice de refração, espalhamento de luz e os de absorvância (fotométrico de comprimento de onda fixo, espectrofotométrico de comprimento

de onda variável, espectrofotométrico por arranjos de diodos) (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

Os detectores espectrofotométricos baseiam-se na absorvância da luz por parte da amostra, ao passar através dela qualquer radiação eletromagnética em um dado comprimento de onda. São detectores seletivos e a maioria das substâncias químicas absorvem radiação ultravioleta. Os detectores espectrofotométricos por arranjo de diodos (DAD - do inglês, *Diode Array Detector*) detectam vários comprimentos de onda simultaneamente (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

Os detectores por fluorescência (FDL – do inglês, *Fluorescence Detector*) tem como vantagem sua alta detectabilidade, podendo chegar a ordem de 10^{-12} (pico) ou mais, por isso tem sido muito utilizado em cromatografia líquida de alta eficiência (CROUCH; HOLLER; SKOOG, 2009). Seu princípio de funcionamento é que a luz de comprimento de onda adequado passe através da cela de amostra, que é excitada por ela. No retorno ao estado fundamental, a molécula excitada emite luz de comprimento de onda maior, que é detectada a um ângulo reto da radiação incidente (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

2.7 Parâmetros de validação da metodologia analítica

Na área de análise química uma etapa relevante e comum é o desenvolvimento de novos métodos, o qual deve ser submetido a um processo de avaliação para estimar sua eficiência e mérito. Tal processo é denominado validação da metodologia analítica, e consiste em analisar se as características do método estão em conformidade com os pré-requisitos exigidos (AMARANTE et al., 2001).

É importante avaliar a relação entre os resultados experimentais e as questões que o método se propõe a responder. A validação consiste em demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito (RIBANI et al., 2004).

De acordo com o documento INMETRO-DOQ-CGCRE-008 (2010), para a validação de um método analítico deve-se levar em consideração os parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez. Os parâmetros de validação dependem da ordem de grandeza da concentração e do tipo de técnica de análise utilizada.

2.7.1 Seletividade

Em uma amostra complexa pode haver substâncias que interferem no desempenho de sua medição. A seletividade e especificidade avaliam de forma inequívoca essa interferência (INMETRO, 2010).

Um método instrumental de separação que produz resposta para uma única substância de interesse é designado como específico enquanto que, um método que produz resposta para vários compostos químicos, com uma característica em comum, é chamado de seletivo. A seletividade deve ser reavaliada no decorrer da pesquisa e desenvolvimento do método, pois, algumas amostras podem sofrer degradação produzindo compostos que não foram avaliados inicialmente e conseqüentemente poderão interferir na substância de interesse (RIBANI et al., 2004).

2.7.2 Linearidade

A linearidade do método corresponde em produzir resultados dentro de uma determinada faixa de aplicação, que sejam diretamente proporcionais as concentrações das substâncias em exame (AMARANTE et al., 2001).

Para tal, busca-se uma relação linear entre o sinal medido, área ou altura do pico, e a massa ou concentração da espécie (desconhecida na maioria dos casos). Essa relação matemática geralmente é expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica que deve ser definida por no mínimo cinco pontos que não incluam o ponto zero na curva, devido aos possíveis erros associados. A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica pode ser calculado usando regressão linear, representado pela equação da reta (equação 2.1).

$$y = ax + b \quad (2.1)$$

onde:

y = resposta medida;

x = concentração;

a = inclinação da curva analítica = sensibilidade;

b = interseção com o eixo y, quando x = 0.

A partir dos pontos experimentais pode-se calcular os coeficientes de regressão (a) e (b) e o coeficiente de correlação linear (r). Quanto mais próximo de 1,0 for o valor de r menor será

a dispersão do conjunto de pontos e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados, com isso a qualidade da curva obtida será melhor. A ANVISA recomenda que o valor do coeficiente de correlação linear seja igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (ANVISA, 2003; INMETRO, 2010; RIBANI et al., 2004).

Pode-se obter a linearidade por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real.

Simultaneamente à determinação da linearidade pode-se obter a sensibilidade do método, que expressa a capacidade do procedimento analítico causar uma variação no valor da propriedade medida diante de uma pequena alteração na concentração do analito. Geralmente o valor da sensibilidade é definido como a inclinação (coeficiente angular) da curva analítica (AMARANTE et al., 2001).

2.7.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) corresponde ao valor da menor concentração do analito em análise que pode ser detectado mas não necessariamente quantificado. Para o INMETRO, é a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança, que a concentração do analito é maior que zero.

O limite de quantificação (LQ) indica a menor concentração da substância em análise que pode ser medida por meio de um determinado método analítico.

Ambos limites podem ser calculados por métodos analíticos que apresentam linha de base e conseqüentemente relação sinal/ruído. Geralmente as proporções aceitáveis são 3:1 ou 2:1 para limite de detecção e 10:1 para limite de quantificação. Além disso, os LD e LQ podem ser calculados pelo método visual ou baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI 2004, 2014).

2.7.4 Exatidão

A exatidão expressa uma relação de concordância entre os valores obtidos em um determinado ensaio com os valores de referência que são aceitos como verdadeiros, ou seja, a exatidão está relacionada com a veracidade das medidas. Um valor verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza. A exatidão de um novo método pode ser avaliada por quatro tipos de estudo, sendo: estudo comparativo com Materiais de Referências Certificados (CRM – do inglês, *Certified Reference Material*); comparação do

método proposto com um método considerado padrão, já bem estabelecido na literatura; estudos de recuperação em amostras; e estudos colaborativos e interlaboratoriais (AMARANTE et al., 2001). A recuperação pode ser expressa em porcentagem por meio da equação 2.2.

$$R(\%) = \frac{\text{média do valor obtido}}{\text{média do valor adicionado}} \times 100 \quad (2.2)$$

A exatidão é considerada dentro de certos limites a um dado nível de confiança, tais limites dependem da concentração das amostras em estudo, variando de níveis estreitos para altas concentrações e níveis mais amplos para análise de traços, podendo ser aceitos recuperações de 40 a 120% ao analisar amostras em concentração de ng.L⁻¹ (BRITO et al., 2002; BRITO et al., 2003).

2.7.5 Precisão

Considera-se um método preciso quando este apresenta resultados bastante próximos entre si ao analisar a mesma amostras várias vezes, ou seja, a precisão está relacionada com a reprodutibilidade. A precisão pode ser expressa numericamente por medidas de dispersão como desvio-padrão, variância, coeficiente de variação (CV) entre outros (BACCAN et al., 2001; AMARANTE et al., 2001).

É comum utilizar na precisão o teste F para comparação de conjuntos de dados. Esse teste usa a razão das variâncias dos dois conjuntos de dados para estabelecer se efetivamente existe uma diferença estatisticamente significativa na precisão usando N-1 graus de liberdade para cada variância. Por convenção, o valor de variância maior é colocado no numerador. Deste modo, o valor de F obtido é comparado a valores tabelados com 95% de confiabilidade (BACCAN et al., 2001).

2.7.6 Robustez

Segundo as especificações do INMETRO (2010), a robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta diante de pequenas modificações em seus parâmetros. Em análises cromatográficas pode-se dizer que o método é robusto quando não há alteração de seus parâmetros quando há variação na composição da fase móvel, no volume de injeção da amostra, no volume de vazão da fase móvel, na temperatura da coluna cromatográfica, na natureza do gás de arraste, etc.

2.8 Planejamento de experimentos

Nas últimas décadas, a execução de experimentos estatisticamente planejados a partir da quimiometria têm se tornado cada vez mais usual para a otimização de métodos analíticos, devido as vantagens de redução no número de experiências que devem ser efetuadas, menor consumo de reagentes e menos tempo de trabalho em laboratório. Além disso, esses métodos permitem o desenvolvimento de modelos matemáticos que permitem avaliar a significância estatística dos efeitos dos fatores a serem estudados (BARROS NETO et al., 2006; FERREIRA et al., 2007).

Pesquisadores de diversas áreas, em especial da Química, buscam planejamentos para determinar a influência e os efeitos de interação de uma ou mais variáveis sobre uma outra variável de interesse, com o objetivo de diminuir erros, custos entre outros fatores (BARBOSA et al., 2006; BARROS NETO et al., 2006).

O planejamento ideal consiste em projetar um experimento de forma que este produza exatamente o tipo de informação que se espera. O planejamento de experimentos mais simples é o planejamento fatorial 2^2 , ou seja, dois fatores (expoente) e dois níveis para cada fator (base da potência), portanto para esse planejamento será necessário a realização de no mínimo 4 experimentos ($2^2 = 4$). De acordo com o sistema químico em investigação, o número de fatores e de níveis podem ser alterados. No caso de poucas informações sobre o sistema, o passo inicial é elencar os fatores que podem estar relacionados a investigação, porém não há regras para a escolha dos fatores. Em seguida deve-se estipular os níveis, vale ressaltar que níveis muito afastados ou próximos não contribuirão de forma pertinente ao planejamento (OLIVEIRA et al., 2015).

Para a realização de um planejamento há processos univariados e multivariados, esse último envolve projetos para que todas as variáveis sejam alteradas simultaneamente. Após a determinação dos fatores significativos, as condições ótimas são alcançadas usando modelos operacionais. Os modelos mais utilizados para determinar superfícies de resposta são os fatoriais completos e fracionados e os compostos centrais mais complexo, Box-Behnken, Doehlert e designs de mistura (FERREIRA et al., 2007).

3- METODOLOGIA

3.1 Materiais, solventes, reagentes e equipamentos

- Vidrarias de uso comum em laboratório (béquer, erlenmeyer, pipeta, balão volumétrico).
- Padrões – Os padrões dos estrogênios utilizados nessa pesquisa foram estrona, 17β -estradiol, estriol e 17α -etinilestradiol, adquiridos da Sigma-Aldrich com grau de pureza superior a 99,0%.
- Solventes – Metanol, acetato de etila e acetonitrila adquiridos da Vetec. Todos os solventes apresentam alta pureza com grau espectroscópico ou grau CLAE. Água destilada e água deionizada obtida do sistema Direct- Q (Millipore).
- Cartuchos para EFS – Chromabond C-18 ec (0,45 μ m, 500 mg, 6 mL) do fabricante Macherey- Nagel, Sorbline e Strata X- fase polimérica reversa (0,45 μ m, 500 mg, 6mL) do fabricante Phenomenex.
- Reagentes – Hidróxido de amônio (0,5 mol.L⁻¹) e ácido clorídrico (1 mol.L⁻¹) dos fabricantes Dinâmica e Alphatec, respectivamente.
- Materiais – Papel filtro qualitativo da marca J.Prolab; Filtro para seringa da marca Allcrom com porosidade de 0,45 μ m, diâmetro de 13 mm, tipo de membrana PTFE; Membrana filtrante de éster de celulose do fabricante Millipore e membrana de nylon adquiridos da Supelco Analytical ambas com porosidade de 0,45 μ m; Seringa de vidro 20,00 mL do fabricante Art Glass; Pipeta automática volumétrica da marca LabMate Soft; Termômetro.
- Equipamentos – Sistema para extração *Vacuum Manifold* (Supelco) com 5 posições; Sistema para filtração; Balança analítica modelo AUW220D do fabricante Shimadzu; Medidor de pH; Gps da marca Garmin Etrex; Lavadora ultra-sônica digital da marca Sanders Medical; Agitador magnético com aquecimento da marca Nova; Cromatógrafo modelo Infinity 1260 da Agilent Technologies; Sonda multiparâmetro modelo HI 9628- pH /ORP/ EC/ DO, sensores da sonda modelo HI 769828, ambos do fabricante Hanna Brasil.
- Coluna cromatográfica Zorbax Eclipse Plus C8 da marca Agilent Technologies, 25 cm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e tamanho de partículas de 5 μ m.
- Solução para calibração dos sensores da sonda multiparâmetro HI 9828-0 do fabricante Hanna Brasil.

3.2 Preparo das soluções estoque e soluções de trabalho

Foram preparadas soluções padrões dos analitos de interesse na concentração de 100 mg.L⁻¹. Foram pesados separadamente 0,01 g de E1, E2, E3 e EE2 em balança analítica de precisão. Cada composto foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 100,00 mL e avolumado com metanol. As soluções foram armazenadas em refrigerador a aproximadamente 4°C.

A partir das soluções-estoque foram preparadas as quatro soluções padrões de trabalho, transferindo 1,00 mL de cada solução estoque para um balão volumétrico de 10,00 mL e avolumando-o com metanol.

3.3 Validação do método

O procedimento de validação da metodologia de análise foi baseado em diversos trabalhos relatados na literatura e nas orientações dos órgãos INMETRO (2010) e ANVISA (2003), avaliando-se os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez. Foram executados uma série de experimentos em números estatisticamente significativos para cada parâmetro e posteriormente realizado o tratamento estatístico dos dados com o auxílio do programa *Microsoft Office Excel 2013*.

3.3.1 Seletividade

Para avaliar e comprovar a seletividade na separação cromatográfica para cada um dos analitos, foram preparados soluções padrão em concentração de 1,00 mg.L⁻¹ em acetonitrila. A pureza espectral de cada analito também foi avaliada a fim de confirmar a seletividade do método na separação desses estrogênios.

3.3.2 Linearidade

A linearidade foi verificada primeiramente pelo coeficiente de correlação linear (r^2), resultante da linha de regressão de nove e doze pontos das curvas analíticas dos estrogênios com detecção pelo DAD e pelo FLD, respectivamente. Foram preparadas doze soluções mistas a partir de diluições da solução de trabalho em acetonitrila. As amostras em concentrações de 25; 50; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900 e 1000 µg.L⁻¹ foram injetadas no sistema de CLAE em triplicata.

A sensibilidade do método foi determinada avaliando o valor do coeficiente angular através da equação da reta referente à curva de calibração de cada estrogênio em estudo.

3.3.3 Limite de detecção e (LD) limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados através da relação sinal/ruído (S/N), considerando a razão 3:1 e 10:1 para LD e LQ, respectivamente. Para tal determinação, o ruído e o sinal do pico de cada estrogênio foram medidos com uma régua.

3.3.4 Exatidão

Como não havia disponibilidade de Material de Referência Certificado (CRM) de água contaminada com os estrogênios em estudo, foram preparadas em triplicatas três amostras de água destilada fortificadas com a solução mista em concentrações baixa, média e alta sendo: 0,40; 0,50 e 0,60 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. As extrações dessas amostras foram efetuadas de acordo com o experimento de número 5 do planejamento de experimentos Box-Behnken, uma vez que, após a otimização da extração em fase sólida concluiu-se que este foi o experimento que apresentou melhor desempenho.

Desta maneira a exatidão do método foi avaliada pela recuperação dos analitos (R) em triplicata, em cada nível de concentração e os resultados foram expressos em porcentagem. Para o cálculo da concentração real, foi utilizado o valor da área do pico de cada analito e a equação da reta correspondente a ele. A partir da média dos valores reais de concentração foi determinado a recuperação em porcentagem através da equação 2.2.

3.3.5 Precisão

A fim de determinar a precisão do método foram preparadas pelo analista 1, seis soluções mistas em acetonitrila em concentração de 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e injetadas no sistema de CLAE. No dia seguinte, os mesmos procedimentos foram repetidos pelo analista 2. Vale ressaltar que todas as amostras foram analisadas em triplicata.

Os valores de recuperação encontrados foram expressos em porcentagem e avaliados pelo teste F. Os resultados calculados para F, foram comparados com os valores de F tabelado para 95% de confiabilidade.

3.3.6 Robustez

A robustez da metodologia analítica foi determinada utilizando-se soluções em concentração de $500 \mu\text{g.L}^{-1}$, variando-se em $\pm 5\%$ quatro condições cromatográficas: composição da fase móvel (FM), volume de injeção, vazão da fase móvel (FM) e temperatura do compartimento da coluna. Os valores de recuperação obtidos foram comparados com os resultados alcançados com as condições normais do método validado.

3.4 Amostragem

As amostragens foram realizadas de forma espacial e sazonal entre os meses de dezembro de 2015 e maio de 2016 no Lago de Furnas no município de Alfenas – MG - Brasil (Figura 3.1), de acordo com o Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras (2011) e com as classificações da Agência Nacional de Águas (ANA, 2011).

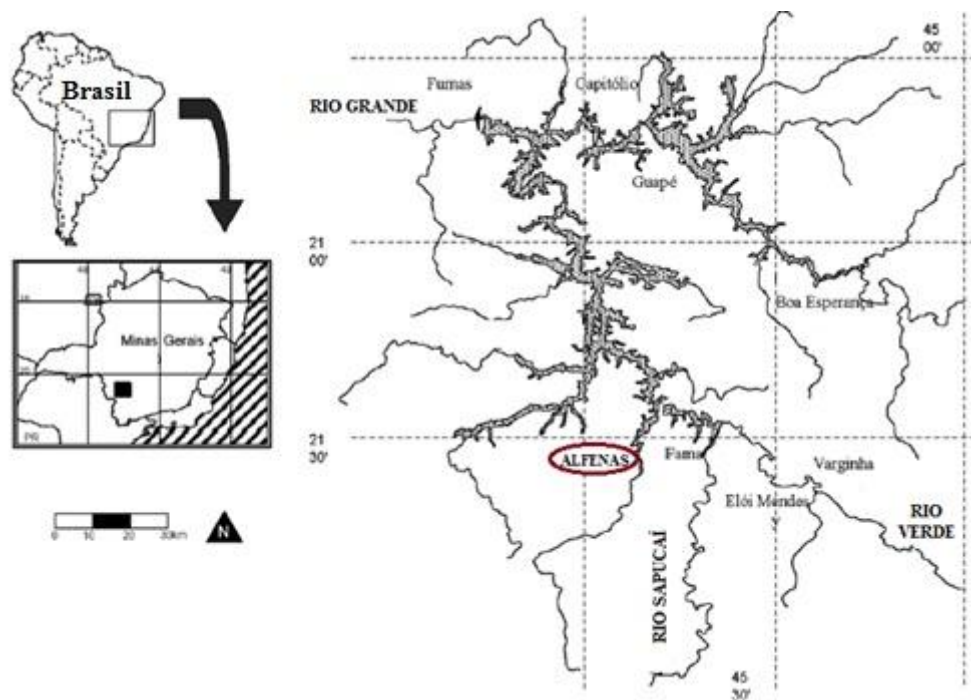


Figura 3.1: Mapa da localização do Lago de Furnas e do município de coleta (Alfenas)

Fonte: Adaptada de Prado et al. (2011).

As amostras foram coletadas em 5 pontos diferentes (P1, P2, P3, P4 e P5) sendo o Ponto 1, o local mais próximo à Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de Alfenas e o Ponto 5, o local mais distante dessa ETE (Figura 3.2). Com a cooperação de um pescador, foram

percorridos de barco aproximadamente 1 km entre cada um dos pontos de coleta. As coletas foram efetuadas entre 11:00 e 13:00 horas e os pontos identificados com um GPS (Tabela 3.1).



Figura 3.2: Pontos de coleta de água superficial do Lago de Furnas no município de Alfenas

Fonte: Google earth (2015).

Tabela 3.1: Coordenadas referentes a cada ponto de coleta de água no Lago de Funas na região de estudo

Pontos	Coordenadas	
Partida	S 21°22'58,34"	O 45°59'59,75"
P1	S 21°23'22,88"	O 45°59'55,95"
P2	S 21°23'05,94"	O 46°00'04,58"
P3	S 21°22'44,70"	O 46°00'09,60"
P4	S 21°21'58,30"	O 46°00'07,95"
P5	S 21°21'35,09"	O 46°00'22,43"

Fonte: Arquivo pessoal.

Foram coletados 5 L de água em cada ponto, retirando-se água da superfície a uma profundidade de aproximadamente 30 cm (água superficial), com auxílio de uma garrafa de van Dorn (Figuras 3.3 e 3.4). A água coletada foi transferida para frascos de plástico previamente limpos e rinsados com a água da coleta no momento da amostragem. Após as coletas, os frascos com as amostras foram envolvidos com papel alumínio (Figura 3.5) e transportados em caixas

térmicas com gelo para o laboratório da UNIFEI - campus Itajubá. Todos os frascos foram armazenadas sob refrigeração a 4°C, para evitar qualquer tipo de degradação da amostra.



Figura 3.3: Foto da garrafa de van Dorn utilizada nas coletas de águas superficiais

Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 3.4: Foto da coleta das amostras de águas superficiais no Lago de Furnas (Alfenas-MG)

Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 3.5: Foto dos frascos envolvidos em papel alumínio contendo as amostras coletadas

Fonte: Arquivo pessoal.

A partir da segunda amostragem, algumas características físico-químicas foram determinadas utilizando uma sonda multiparâmetro. Foram avaliados no entorno dos pontos de amostragens o pH, temperatura, condutividade e oxigênio dissolvido da água. Seguindo os procedimentos fornecidos pela própria sonda multiparâmetro. Primeiramente foi feita a calibração dos sensores de pH e condutividade utilizando uma solução apropriada. Em seguida, essa solução foi retirada e o sensor de oxigênio dissolvido foi calibrado. Concluído essa etapa, os sensores foram imersos na água em cada ponto de coleta e os dados anotados.

3.5 Preparo das amostras

As amostras de cada ponto amostral foram preparadas em triplicatas. Foram filtrados 4 L de água em funil de Buchner com papel filtro qualitativo várias vezes até observar coloração bem clara no papel filtro, em seguida, a água foi filtrada em um sistema de filtração com membrana de filtro de éster de celulose com porosidade de 0,45 μm diversas vezes até que a membrana não apresentasse nenhuma coloração após filtrar a água. Esse procedimento foi repetido para as amostras dos 5 pontos de coleta.

Após as filtrações, o pH das amostras foram ajustados em 8, utilizando hidróxido de amônio $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ e ácido clorídrico $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$, quando necessário. E em seguida foram efetuadas as extrações em fase sólida das amostras.

3.6 Validação das condições cromatográficas

Foi utilizado um cromatógrafo modelo Infinity 1260 da Agilent Technologies, composto por uma bomba quaternária, um injetor automático, um módulo de aquecimento de coluna, um detector ultravioleta com arranjos de diodos (DAD do inglês – *diode array detection*) e um detector por fluorescência (FLD do inglês – *fluorescence detection*). A coluna cromatográfica utilizada foi Eclipse Plus C8 (4,6 mm x 250 mm – 5 μm), também da Agilent Technologies. As condições cromatográficas foram otimizadas a partir de MONTEIRO e ANDRADE (2014), com a otimização de alguns parâmetros.

Todos os analitos estudados apresentam uma absorção na região de UV, portanto, eles podem ser cromatograficamente medidos com um DAD. Porém, os estrogênios estriol, 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol também são altamente fluorescente na fase móvel utilizada, devido a isso, foram determinados por ambos os detectores, afim de avaliar qual detector apresentaria melhores condições de análise frente ao método validado.

Para validar a metodologia analítica, 1,00 mL da solução de trabalho de cada estrogênio, que estava em concentração de 10 mg.L^{-1} , foi transferido para um balão volumétrico de 10,00 mL e avolumado com acetonitrila. O mesmo foi feito para o preparo da solução padrão mista, porém, os quatro estrogênios foram transferidos para um único balão volumétrico. Em seguida, 1,00 mL das soluções padrão individuais e mista foram transferidas para vials de 2,00 mL e injetadas no sistema de CLAE.

A partir da determinação dos tempos de retenção de cada analito, a solução mista foi utilizada para obter as curvas analíticas, determinar a linearidade do método e avaliar os demais parâmetros descritos anteriormente.

3.7 Validação da extração em fase sólida

Para validação do método de extração em fase sólida foi montado um planejamento de experimentos Box-Behnken utilizando o programa *Minitab 16*[®]. Esse planejamento foi feito com três níveis, baixo (codificado “-1”), central (codificado “0”) e alto (codificado “+1”) e quatro fatores a serem alterados, a marca do cartucho, pH da água, vazão da fase móvel durante a extração e solvente de eluição, conforme a Tabela 3.2. Durante as extrações foi mantido fixo o volume de água a ser percolado (1 L), o solvente de condicionamento do cartucho (5,00 mL de metanol) e a solução de lavagem do cartucho (1,00 mL de água: 5% metanol).

Tabela 3.2: Marca do cartucho, pH da amostra, solvente de eluição e vazão da extração a serem otimizados a partir do planejamento Box-Behnken

Fatores alterados	Nível		
	-1	0	+1
Marca do cartucho	Sorblin	Chromabond	Strata-X
pH da água	4	6	8
Solvente de eluição	Metanol	Metanol: Acetato de etila (1:1)	Acetato de etila
Vazão da fase móvel durante a extração	3 mL.min ⁻¹	5 mL.min ⁻¹	10 mL.min ⁻¹

Fonte: Arquivo pessoal.

As combinações dos níveis e fatores gerados com o planejamento de experimentos Box-Behnken resultaram em 28 experimentos como mostrado na Tabela 3.3. Após realizar todos os experimentos do planejamento Box-Behnken foram selecionadas as condições de extração que apresentaram resultados mais satisfatórios. Essa avaliação foi feita a partir dos valores de recuperação obtidos para os quatro estrogênios em estudo.

Tabela 3.3: Condições de extração em fase sólida gerado para cada experimento a partir do planejamento Box-Behnken

Experimento	Cartucho	pH da água	Solvente de eluição	Vazão da fase móvel
1	1	0	-1	0
2	1	0	0	-1
3	0	-1	0	1
4	0	0	1	1
5	0	1	0	-1
6	0	1	0	1
7	1	0	0	1
8	0	0	-1	1
9	-1	-1	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	-1	0	-1
14	1	-1	0	0
15	1	1	0	0
16	-1	0	0	-1
17	-1	0	0	1
18	-1	0	-1	0
19	1	0	1	0
20	0	1	-1	0
21	0	0	1	-1
22	-1	1	0	0
23	1	1	1	1
24	0	-1	-1	0
25	0	-1	1	0
26	0	-1	1	0
27	-1	0	1	0
28	0	0	-1	-1

Fonte: Arquivo pessoal.

Todas as amostras utilizadas foram preparadas fortificando 1 L de água destilada com 50,00 μL de solução mista de trabalho em concentração de 10 mg.L^{-1} , porém ao passar 1L de água e eluir 1,00 mL ocorreu a concentração dessa amostra mil vezes e a concentração final do eluato foi de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, concentração considerada o ponto central das curvas analíticas obtida pelos detectores. O pH da amostra foi ajustado conforme o planejamento.

Em seguida, o adsorvente presente nos cartuchos de extração em fase sólida foram condicionados com 5,00 mL de metanol e a água fortificada foi percolada pelo cartucho. O próximo passo foi a retirada de interferentes do cartucho com 1,00 mL de solução de lavagem e por último o extrato foi eluído com 5,00 mL de solvente de eluição de acordo com o planejamento de experimentos.

Os eluatos foram deixados em banho-maria a aproximadamente 70°C até a secura, dissolvidos em 1,00 mL de acetonitrila e levados a banho ultrasônico por aproximadamente 3 minutos para homogeneização da amostra. Em seguida, foram filtrados com filtro com porosidade de $0,45 \mu\text{m}$ e injetados no sistema de CLAE seguindo as condições cromatográficas descritas anteriormente.

3.8 Tentativa de reutilização dos cartuchos utilizados na extração

Após a realização da extração em fase sólida das amostras de água coletadas no Lago de Furnas, os cartuchos de extração foram preparados para uma tentativa de recuperação de sua fase adsorvente. Para tal, foram condicionados com 10,00 mL de água deionizada, 10,00 mL de acetonitrila e 10,00 mL de metanol e posteriormente foram colocados em um frasco de vidro, coberto com metanol, tampado e armazenados sob refrigeração a uma temperatura de 4°C . Essa ordem de solventes foi seguida devido a polaridade de cada um, deixando por último o solvente em que os cartuchos seriam estocados.

Para verificar se a fase adsorvente dos cartuchos podem ser recuperadas, foi necessário realizar novas extrações. Sendo assim, executou os mesmos procedimentos realizados para a exatidão do método analítico, ou seja, a água destilada foi fortificada com concentrações diferentes (baixa, média e alta) de uma solução mista dos estrogênios em estudo. Após extração e análise no sistema de CLAE, a concentração real foi calculada utilizando o valor da área do pico de cada analito e a equação da reta correspondente a ele. A partir da média dos valores reais de concentração foi determinado a recuperação em porcentagem, através da equação 2.2 (página 45).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Validação da metodologia analítica

Para a validação da metodologia analítica foram avaliados a seletividade, a linearidade, o limite de detecção e o limite de quantificação, a exatidão, a precisão e a robustez (AMARANTE et al., 2001; ANVISA, 2003; BACCAN et al., 2001; BRITO et al., 2002; BRITO et al., 2003; INMETRO, 2010; RIBANI et al., 2004, 2014).

4.1.1 Seletividade

Nas Figuras 4.1 e 4.2 são apresentados os cromatogramas da separação do E3, E2, EE2 e E1, com detecção pelo detector por ultravioleta com arranjo de diodos (DAD) em 285 nm e pelo detector por fluorescência (FLD) em $\lambda_{\text{excitação}} - 230 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} - 310 \text{ nm}$, vale ressaltar, que o estrogênio estrona não foi detectado pelo FLD empregando essa metodologia. Na Figura 4.1 as purezas de pico dos analitos estão destacadas, os valores apresentados são próximos a 1,00, confirmando que o pico é correspondente a seu analito. O tempo de retenção de cada analito nos cromatogramas das Figuras 4.1 e 4.2 estão descritos na Tabela 4.1.

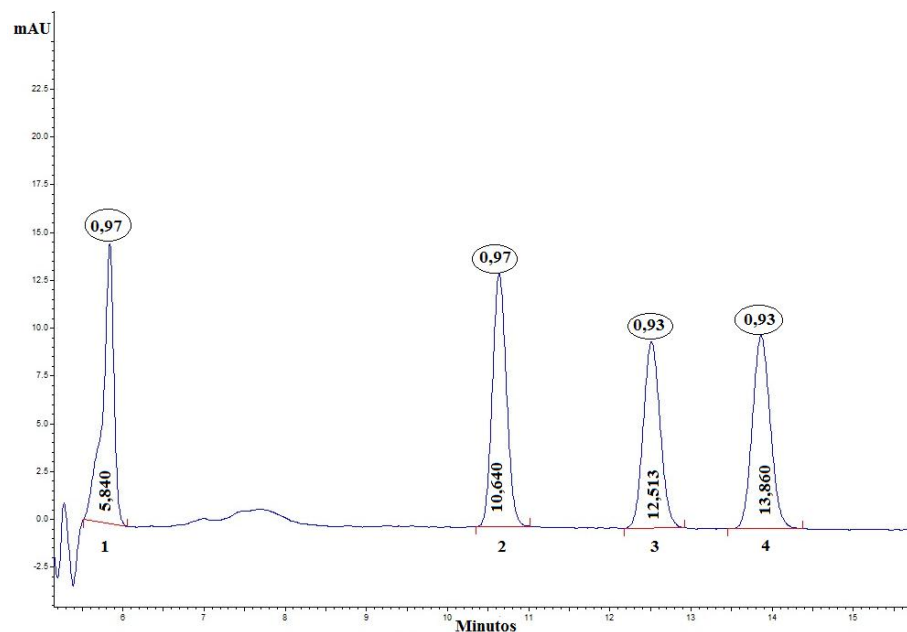


Figura 4.1: Cromatograma referente a separação dos padrões de estrogênios: 1) estriol; 2) 17 β -estradiol; 3) 17 α - etinilestradiol e 4) estrona detectados pelo DAD

Fonte: Arquivo pessoal.

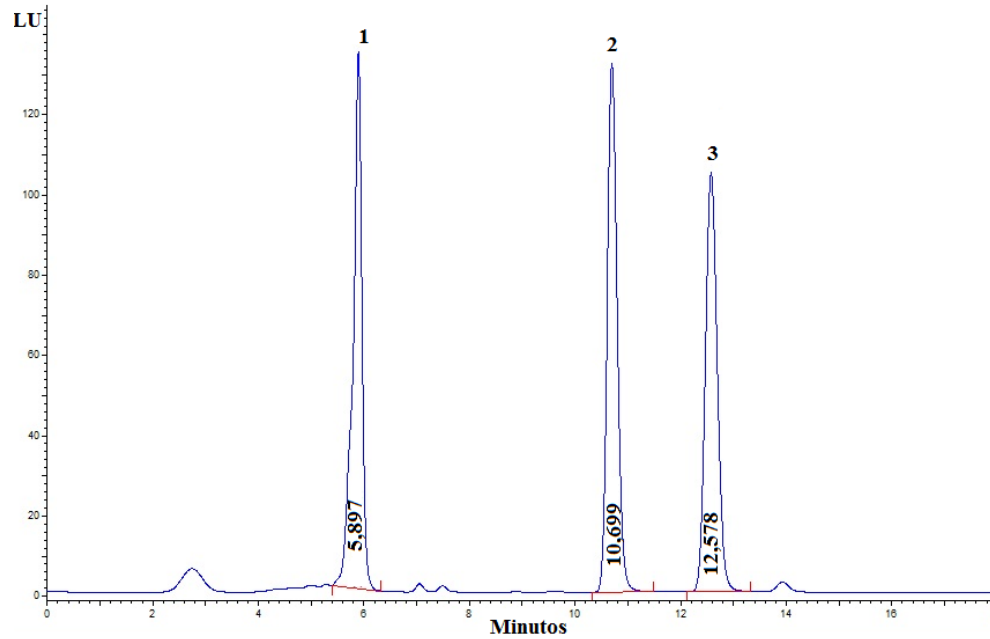


Figura 4.2: Cromatograma referente a separação dos padrões de estrogênios: 1) estriol; 2) 17β -estradiol; 3) 17α -etinilestradiol detectados pelo FLD

Fonte: Arquivo pessoal.

Como pode ser observado nas Figuras 4.1 e 4.2, os estrogênios em estudo apresentaram boa separação, o que comprova que o método proposto foi seletivo fazendo-se o uso de ambos os detectores.

Tabela 4.1: Tempos de retenção da separação dos padrões de estrogênios com detecção pelo DAD e pelo FLD

Estrogênio	Tempo de retenção (minutos) com detecção pelo DAD	Tempo de retenção (minutos) com detecção pelo FLD
Estriol	5,840	5,897
17β -estradiol	10,640	10,699
17α -etinilestradiol	12,513	12,578
Estrona	13,860	ND*

* Estrogênio não detectado pelo detector FLD

Fonte: Arquivo pessoal.

A seletividade do método também pode ser confirmada ao observar as Figuras 4.3 e 4.4 que apresentam o cromatograma do “branco” (ausência dos analitos) com detecção pelo DAD e pelo FLD, respectivamente. Esses cromatogramas não apresentaram nenhum pico próximo às regiões dos tempos de retenção dos quatro estrogênios em estudo, como indicado nas figuras.

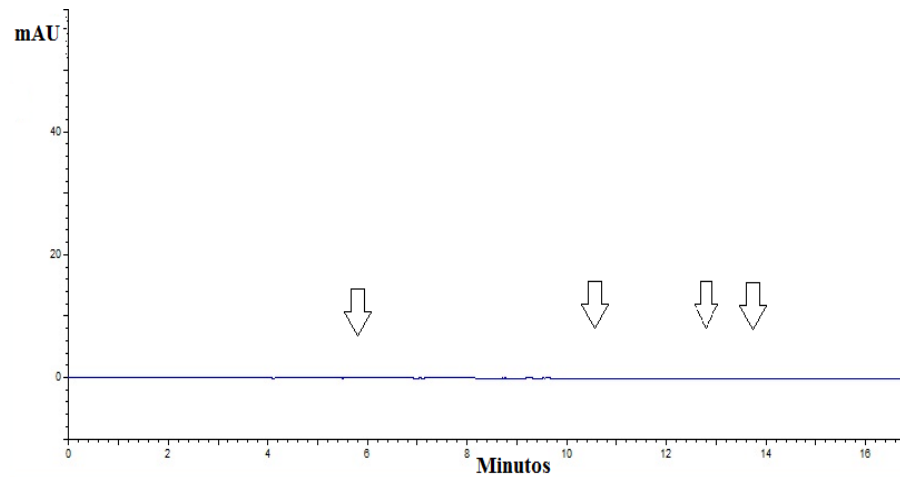


Figura 4.3: Cromatograma referente ao “branco” com detecção pelo DAD

Fonte: Arquivo pessoal.

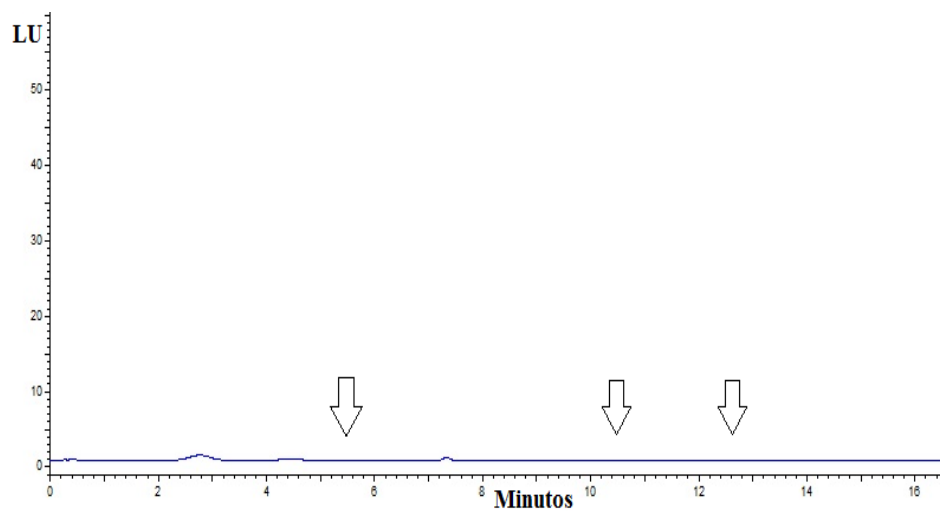


Figura 4.4: Cromatograma referente ao “branco” com detecção pelo FLD

Fonte: Arquivo pessoal.

De acordo com os estudos de López de Alda e Barceló (2000) esse grupo de substâncias apresentam um máximo de absorbância em 197 nm e 281 nm. Porém, em comprimentos de onda inferiores a 230 nm, várias outras substâncias químicas podem apresentar absorção, como por exemplo, o próprio solvente da fase móvel. Por isso, optou-se por utilizar o comprimento de onda de 285 nm. A Figura 4. 5 apresenta os espectros de absorção bidimensionais (2D: comprimento de onda *versus* tempo) de uma solução mista de padrões e do “branco” (ausência

dos analitos). Ao comparar os dois espectros pode-se observar satisfatória seletividade para os analitos (E3, E2, EE2 e E1), no comprimento de onda de 285 nm.

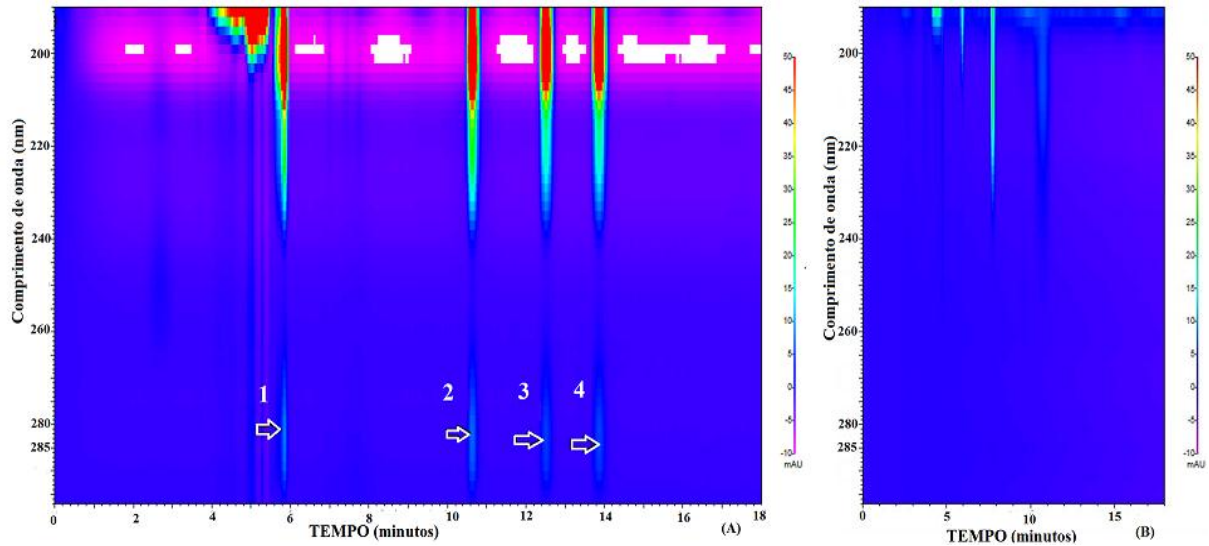


Figura 4.5: Espectros 2D referentes a A) solução mista dos padrões de estrogênios: 1) estriol; 2) 17 β -estradiol; 3) 17 α -etinilestradiol e 4) estrona e B) “branco”

Fonte: Arquivo pessoal.

4.1.2 Linearidade

Soluções padrão mistas contendo os quatro estrogênios em diferentes concentrações (25 a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$), foram injetadas no sistema CLAE. Os picos de cada analito foram integrados e os valores das áreas obtidas foram plotados em função das suas respectivas concentrações para obtenção das curvas analíticas. Com essas informações, foi possível obter os dados das equações das retas e coeficientes de correlação (r^2).

As curvas de calibração se mostraram linear para ambos detectores (DAD e FLD), pois os coeficientes de correlação obtidos situaram-se acima de 0,98, conforme apresentado nas Tabelas 4.2 e 4.3. De acordo com Brito et al. (2003), esses valores apresentam correlação fortíssima entre as variáveis área do pico cromatográfico e concentração do analito.

Tabela 4.2: Equações da reta e coeficientes de correlação dos estrogênios detectados pelo DAD

Estrogênio	Equação da reta	r^2
Estriol	$y = 15,388x - 237,26$	0,9924
17 β -estradiol	$y = 16,366x - 526,74$	0,9885

17 α -etinilestradiol	$y = 15,473x - 682,62$	0,9854
Estrona	$y = 17,307x - 693,63$	0,9895

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 4.3: Equações da reta e coeficientes de correlação dos estrogênios detectados pelo FLD

Estrogênio	Equação da reta	r^2
Estriol	$y = 27608x + 66759$	0,9920
17 β -estradiol	$y = 28561x - 79971$	0,9955
17 α -etinilestradiol	$y = 28047x - 107662$	0,9989

Fonte: Arquivo pessoal.

As curvas de calibração dos estrogênios estriol (E3), 17 β -estradiol (E2), 17 α -etinilestradiol (EE2) e estrona (E1) que foram detectados pelo DAD se mostraram lineares na faixa de 200 a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$, conforme apresentado nas Figuras de 4.6 a 4.9. Já os estrogênios que foram detectados pelo FLD (E3, E2 e EE2) se mostraram lineares entre 25 e 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$, as Figuras de 4.10 a 4.12 apresentam a linearidade de cada um desses estrogênios.

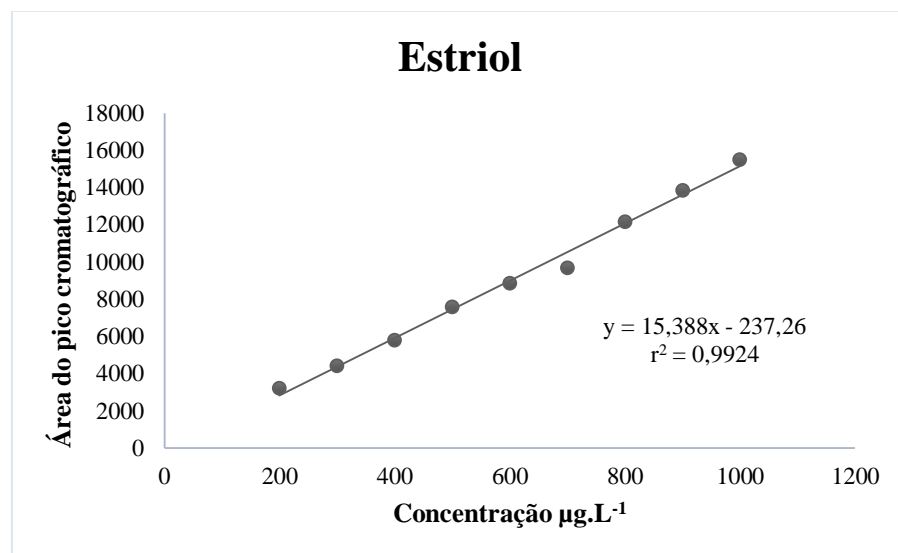


Figura 4.6: Curva de calibração do estriol na faixa estudada, com detecção pelo DAD

Fonte: Arquivo pessoal.

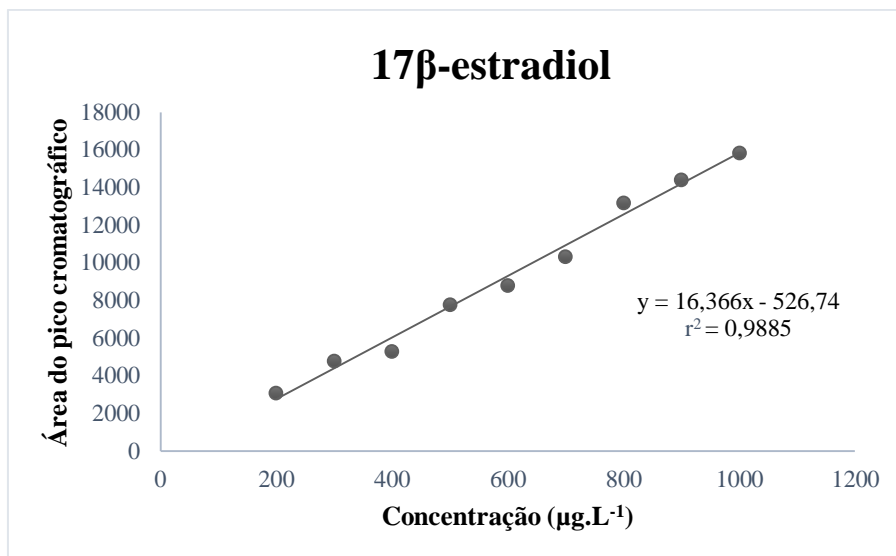


Figura 4.7: Curva de calibração do 17β-estradiol na faixa estudada, com detecção pelo DAD

Fonte: Arquivo pessoal.

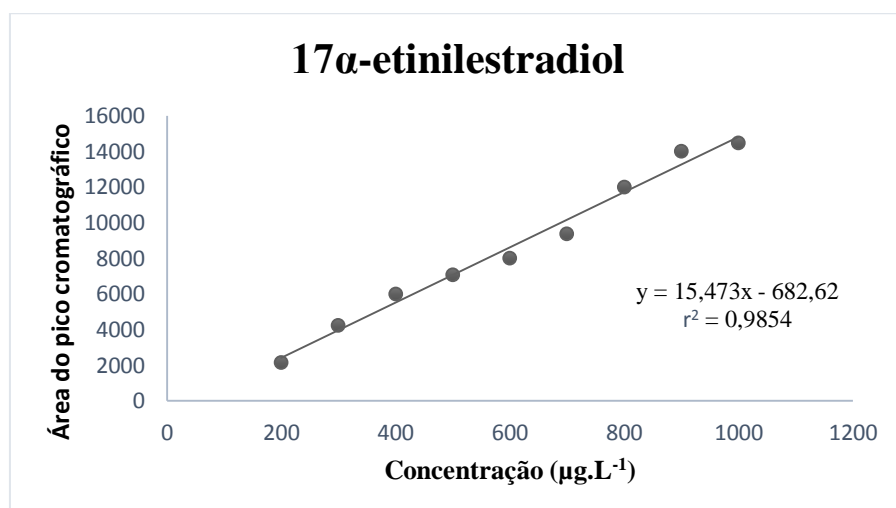


Figura 4.8: Curva de calibração do 17α-etinilestradiol na faixa estudada, com detecção pelo DAD

Fonte: Arquivo pessoal.

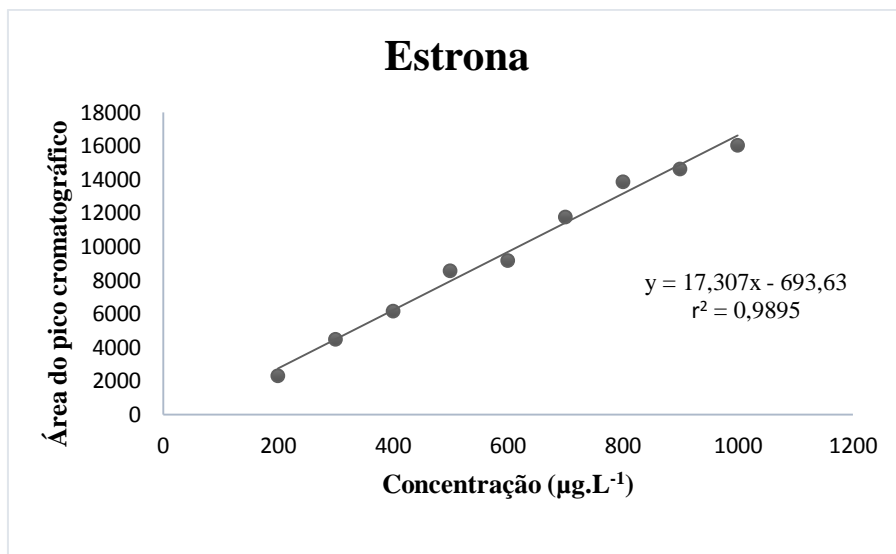


Figura 4.9: Curva de calibração da estrona na faixa estudada, com detecção pelo DAD

Fonte: Arquivo pessoal.

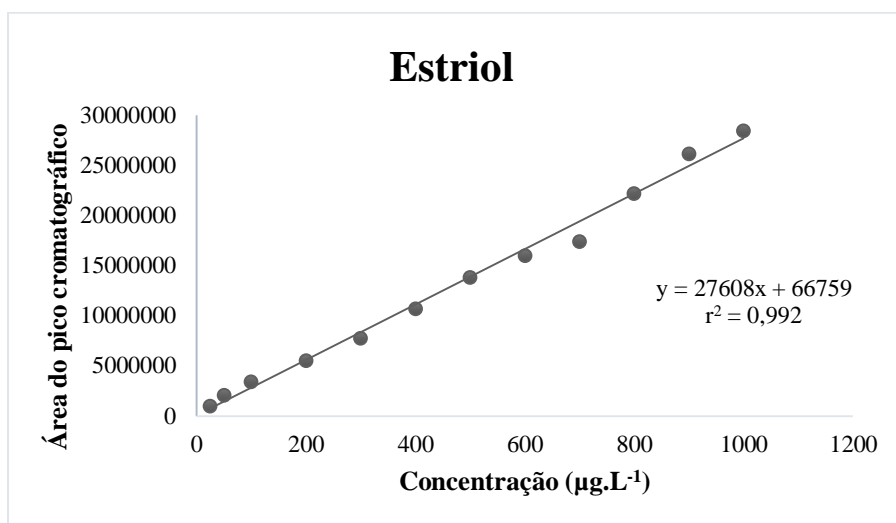


Figura 4.10: Curva de calibração do estríol na faixa estudada, com detecção pelo FLD

Fonte: Arquivo pessoal.

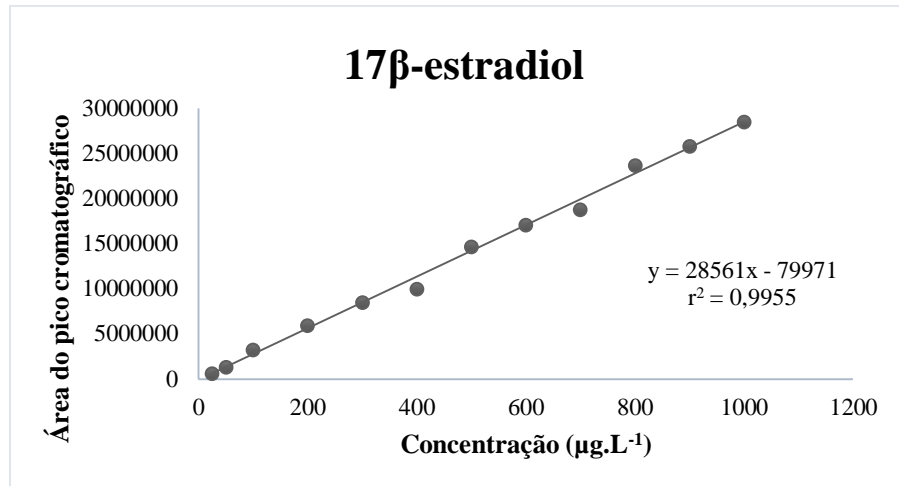


Figura 4.11: Curva de calibração do 17β-estradiol na faixa estudada, com detecção pelo FLD

Fonte: Arquivo pessoal.

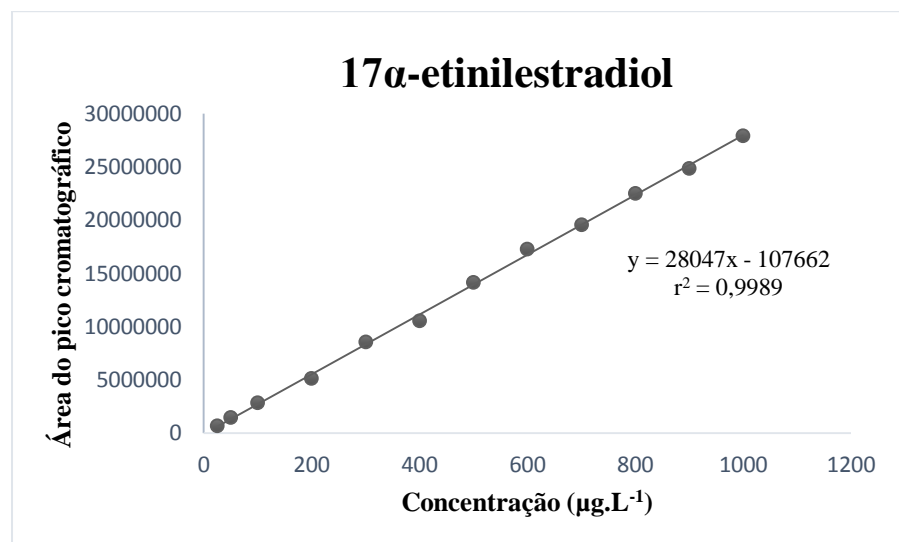


Figura 4.12: Curva de calibração do 17α-etinilestradiol na faixa estudada, com detecção pelo FLD

Fonte: Arquivo pessoal.

A sensibilidade do método foi determinada utilizando as equações da reta referentes a curva de calibração de cada estrogênio, sendo avaliado o valor do coeficiente angular, conforme apresentado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Coeficiente angular da curva de calibração referente a estriol; 17 β -estradiol; 17 α -etinilestradiol e estrona

Estrogênio	Coeficiente angular (deteccção pelo DAD)	Coeficiente angular (deteccção pelo FLD)
Estriol	15,388	27608
17 β -estradiol	16,366	28561
17 α -etinilestradiol	15,473	28047
Estrona	17,307	ND*

* Estrogênio não detectado pelo detector FLD

Fonte: Arquivo pessoal.

O método validado se mostrou mais sensível na detecção dos estrogênios por fluorescência (FLD), uma vez que os valores dos coeficientes angulares dos três estrogênios por ele detectado são maiores que os coeficientes angulares dos estrogênios com detecção por ultravioleta (DAD). Porém, entre os quatro estrogênios detectados pelo DAD, o método apresentou maior sensibilidade para estrona, que por sua vez não pôde ser detectada pelo FLD.

4.1.3 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) instrumental foi determinado através da relação sinal/ruído (S/N), considerando a razão 3:1 para LD e 10:1 para LQ (Tabela 4.5). Os cromatogramas apresentados nas Figuras de 4.13 a 4.16, indicam como a relação sinal/ruído foi determinada.

Tabela 4.5: Limite de detecção e limite de quantificação instrumental dos estrogênios com detecção pelo DAD e pelo FLD

Estrogênio	Detector DAD		Detector FLD	
	LD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Estriol	200	300	25	50
17 β -estradiol	200	300	25	50
17 α -etinilestradiol	200	300	25	50
Estrona	200	300	ND*	ND*

* Estrogênio não detectado pelo detector FLD

Fonte: Arquivo pessoal.

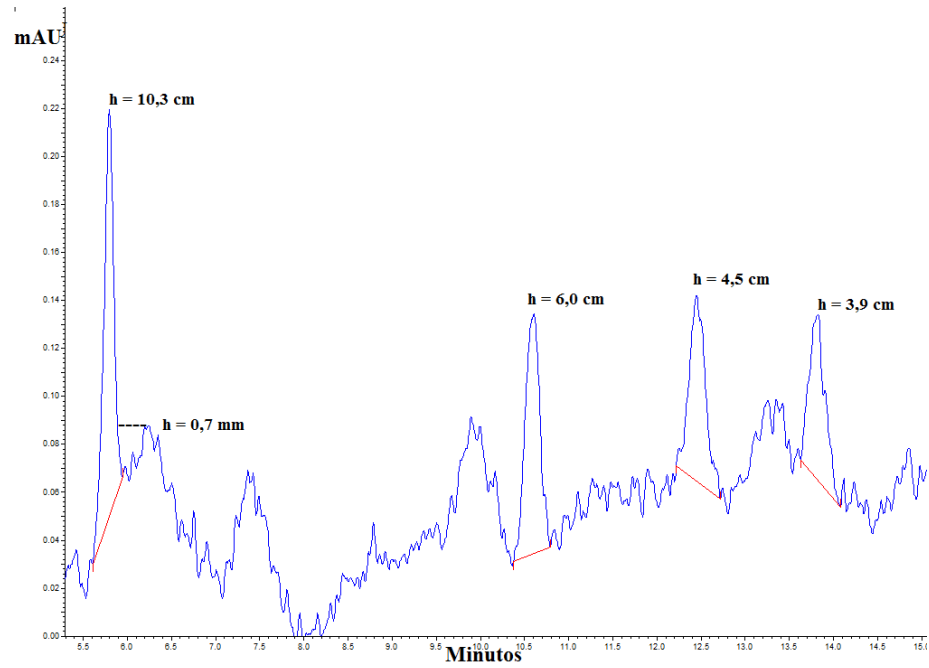


Figura 4.13: Cromatograma usado para a determinação do limite de detecção pela relação sinal/ruído da solução mista de padrões em concentração de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$, com detecção pelo DAD

Fonte: Arquivo pessoal.

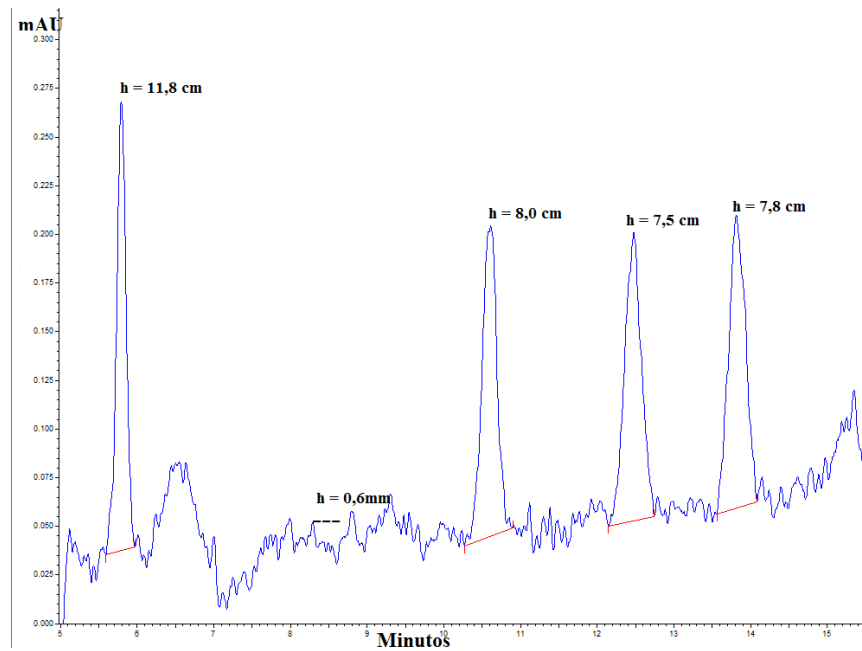


Figura 4.14: Cromatograma usado para a determinação do limite de quantificação pela relação sinal/ruído da solução mista de padrões em concentração de $300 \mu\text{g.L}^{-1}$, com detecção pelo DAD

Fonte: Arquivo pessoal.

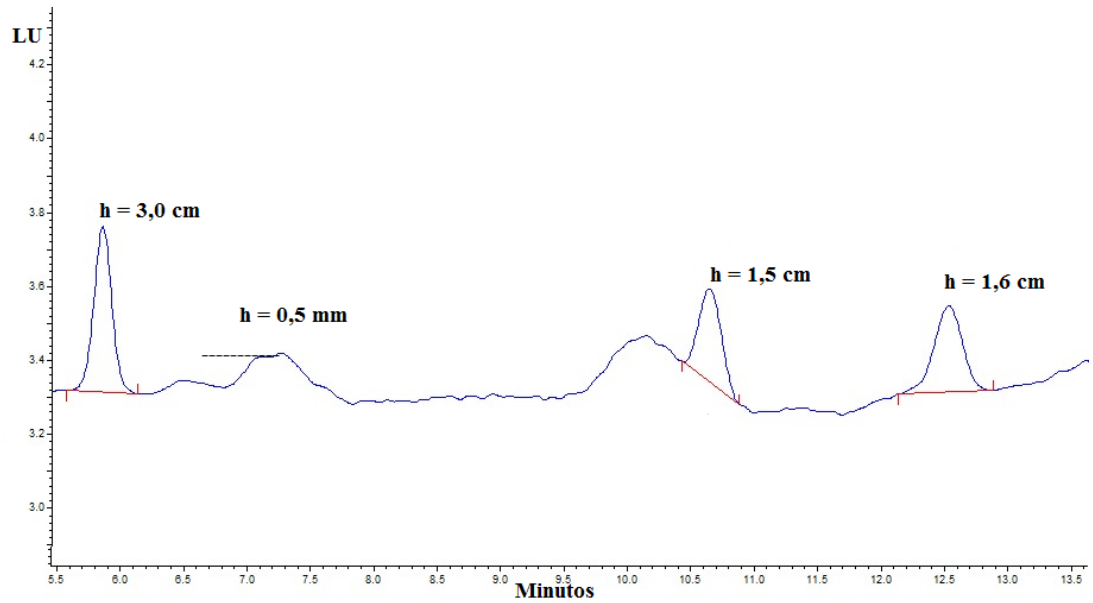


Figura 4.15: Cromatograma usado para a determinação do limite de detecção pela relação sinal/ruído da solução mista de padrões em concentração de $25 \mu\text{g.L}^{-1}$, com detecção pelo FLD

Fonte: Arquivo pessoal.

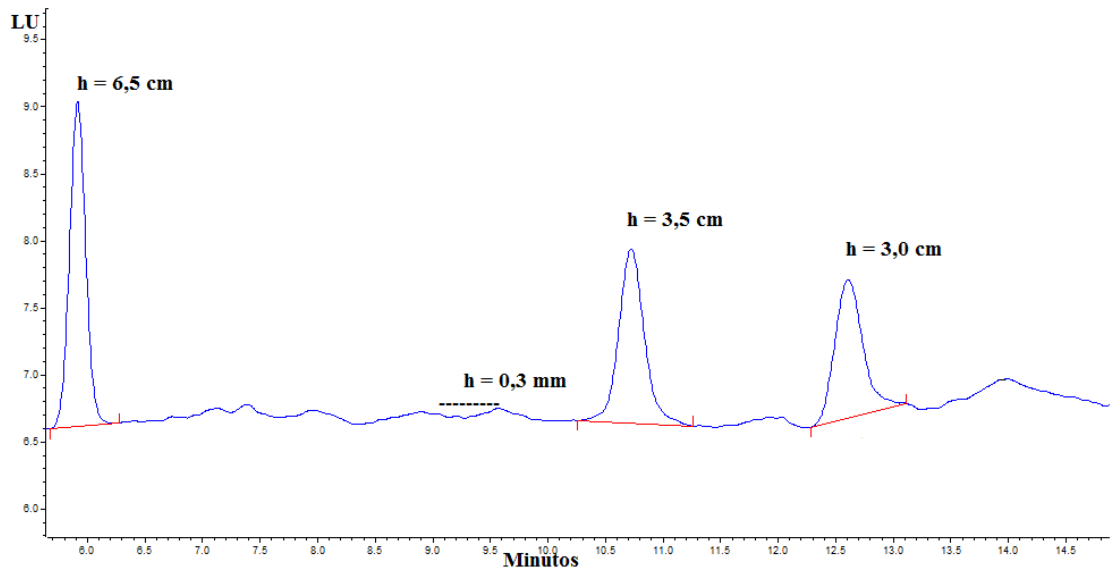


Figura 4.16: Cromatograma usado para a determinação do limite de quantificação pela relação sinal/ruído da solução mista de padrões em concentração de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$, com detecção pelo FLD

Fonte: Arquivo pessoal.

Como a metodologia analítica validada prevê pré-concentração por extração em fase sólida, as amostras foram concentradas mil vezes (de 1L para 1,00 mL), portanto, o método desenvolvido permite detectar e quantificar os estrogênios na concentração de ng.L^{-1} . Sendo assim, os estrogênios em estudo puderam ser detectados e quantificados pelo DAD, em

concentrações de 200 e 300 ng.L⁻¹, respectivamente. Enquanto que, pelo FLD as concentrações foram de 25 ng.L⁻¹ para LD e de 50 ng.L⁻¹ para LQ.

Diante dos valores dos limites de detecção e de quantificação, o FLD pode ser considerado mais sensível frente ao método validado, uma vez que, apresenta valores de LD e LQ inferiores aos apresentados pelo DAD.

4.1.4 Exatidão

Diante da indisponibilidade de Material de Referência Certificado (CRM) de água contaminada com estrogênios, a exatidão do método foi realizada por fortificação de água ultrapura com os padrões dos analitos em três níveis de concentração (0,4; 0,5 e 0,6 µg.L⁻¹). As soluções fortificadas foram extraídas e injetadas no sistema de CLAE. Posteriormente foram determinados os valores de recuperação e do coeficiente de variação de cada analito. As recuperações médias e os coeficientes de variação expressos em porcentagem estão descritos nas Tabelas 4.6 e 4.7.

Tabela 4.6: Dados da exatidão do método para os estrogênios com detecção pelo DAD

Concentração em µg.L ⁻¹ (replicata)	Recuperação média (coeficiente de variação) em %			
	Estriol	17β-estradiol	17α- etinilestradiol	Estrona
0,40 (1)	101,2 (8,0)	75,5 (5,7)	93,5 (9,4)	80,9 (9,0)
0,40 (2)	74,8 (6,6)	74,3 (8,1)	73,6 (6,0)	77,0 (6,0)
0,40 (3)	81,9 (1,8)	62,1 (11,7)	78,8 (6,7)	75,6 (6,3)
0,50 (1)	95,5 (1,4)	95,8 (1,7)	104,7 (7,2)	75,5 (14,7)
0,50 (2)	92,6 (6,4)	91,4 (4,8)	88,7 (4,8)	74,1 (4,6)
0,50 (3)	91,4 (3,7)	81,3 (10,7)	90,7 (3,8)	74,4 (5,8)
0,60 (1)	88,8 (3,2)	80,6 (3,7)	76,3 (7,1)	72,4 (3,8)
0,60 (2)	99,2 (3,8)	90,1 (2,1)	87,8 (8,5)	85,7 (1,2)
0,60 (3)	84,5 (1,4)	77,9 (1,2)	88,7 (8,4)	71,6 (2,4)

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 4.7: Dados da exatidão do método para os estrogênios com detecção pelo FLD

Concentração em $\mu\text{g.L}^{-1}$ (replicata)	Recuperação média (%) – coeficiente de variação (%)		
	Estriol	17 β -estradiol	17 α -etinilestradiol
0,40 (1)	86,5 (0,2)	100,3 (1,7)	101,5 (3,3)
0,40 (2)	80,0 (1,6)	91,9 (4,8)	87,0 (2,4)
0,40 (3)	84,4 (0,4)	90,0 (1,7)	93,9 (6,8)
0,50 (1)	92,9 (1,8)	94,5 (0,5)	98,7 (3,0)
0,50 (2)	91,4 (2,3)	97,7 (4,0)	96,2 (4,6)
0,50 (3)	91,0 (1,3)	94,0 (4,1)	98,7 (4,4)
0,60 (1)	88,3 (0,2)	91,8 (4,3)	93,3 (1,0)
0,60 (2)	99,4 (0,5)	102,7 (3,0)	105,6 (0,6)
0,60 (3)	89,8 (0,7)	97,0 (1,1)	93,6 (0,2)

Fonte: Arquivo pessoal.

Os dados apresentados na Tabela 4.6 mostram que para os estrogênios com detecção pelo DAD, a recuperação média ($R_{\text{média}}$) ficou compreendida entre 62,1 e 101,2% com coeficiente de variação (CV) inferior a 15%. Já na Tabela 4.7, pode-se observar que os estrogênios detectados pelo FLD a exatidão ficou compreendida entre 80,0 e 105,6% com CV inferior 7,0%. Os valores de $R_{\text{média}}$ e CV obtidos para ambos os detectores foram considerados satisfatórios para análise de traços, pois, amostras em concentrações de ng.L^{-1} os critérios de recuperação aceitáveis são entre 40 e 120% com coeficiente de variação (CV) menor que 45% para as repetições (BRITO et al., 2003).

4.1.5 Precisão

A precisão de um método pode ser avaliada de três maneiras diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutividade.

A precisão intermediária avalia as variações dos dados obtidos quando se utiliza o mesmo laboratório porém, em dias diferentes, por analistas e equipamentos diferentes, entre outros (BRITO et al., 2003).

O critério para avaliar a precisão do método foi a comparação entre o valor experimental e o valor tabelado para o teste F para dois conjuntos de amostras ($n=6$ para cada conjunto). As amostras foram preparadas em dias diferentes e por analistas diferentes. A Tabela 4.8 apresenta os valores de recuperação média ($R_{\text{média}}$), de coeficiente de variação (CV), $F_{\text{calculado}}$ e F_{tabelado} para os conjuntos de dados do Analista 1 e 2.

Tabela 4.8: Valores de recuperação média ($R_{\text{média}}$), coeficiente de variação (CV), $F_{\text{calculado}}$ e F_{tabelado} para os conjuntos de dados do Analista 1 e 2

	Estrogênio detectado pelo DAD				Estrogênio detectado pelo FLD		
	E3	E2	EE2	E1	E3	E2	EE2
$R_{\text{média}}$ (%) \pm desvio padrão (n=6) Analista 1	100,6 $\pm 6,8$	112,2 $\pm 7,2$	100,6 $\pm 7,4$	103,5 $\pm 7,6$	104,5 $\pm 1,1$	106,5 $\pm 1,7$	100,3 $\pm 2,1$
$R_{\text{média}}$ (%) \pm desvio padrão (n=6) Analista 2	108,9 $\pm 8,1$	111,1 $\pm 9,9$	107,8 $\pm 5,0$	104,5 $\pm 7,5$	108,0 $\pm 1,9$	101,6 $\pm 2,0$	102,4 $\pm 3,0$
CV (%) Analista 1	6,8	6,3	7,3	10,4	0,6	1,6	2,1
CV (%) Analista 2	7,3	8,8	4,7	7,3	4,3	5,2	5,4
$F_{\text{calculado}}$	1,3	1,9	2,2	1,0	3,2	1,6	2,1
F_{tabelado}	5,05	5,05	5,05	5,05	5,05	5,05	5,05

Fonte: Arquivo pessoal.

De acordo com os valores obtidos com o teste F concluiu-se que não existe diferença significativa entre os valores de variância para uma confiabilidade de 95% uma vez que, o valor de F_{tabelado} para grau de liberdade igual a 5, tanto no denominador quanto no numerador é igual a 5,05 (BACCAN et al., 2001).

A metodologia validada mostrou ser precisa pois, em todos os casos $F_{cal} < F_{tab}$. e as variações entre os resultados foram inferiores a 10,5%, cujo valor foi considerado dentro da faixa aceitável para análise de $ng.L^{-1}$.

4.1.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada alterando, propositadamente $\pm 5\%$ as seguintes condições cromatográficas: a composição da fase móvel (FM), o volume de injeção, a vazão da fase móvel (FM) e a temperatura do compartimento da coluna cromatográfica. As Tabelas 4.9 e 4.10 apresentam os resultados obtidos.

Tabela 4.9: Dados de robustez do método para os estrogênios detectados pelo DAD

Condição cromatográfica alterada	Recuperação média (coeficiente de variação) em porcentagem			
	Estriol	17 β -estradiol	17 α -etinilestradiol	Estrona
FM 52,5% H ₂ O 47,5% ACN	94,5 (10,6)	98,0 (4,4)	70,7 (5,8)	95,5 (8,8)
FM 47,5% H ₂ O 52,5% ACN	84,5 (3,1)	111,6 (3,9)	112,4 (3,3)	112,7 (7,8)
Vazão da FM: 0,475 mL.min ⁻¹	112,2 (2,0)	111,2 (2,3)	107,5 (9,8)	114,1 (7,3)
Vazão da FM: 0,525 mL.min ⁻¹	97,3 (6,3)	100,7 (6,5)	98,2 (7,1)	105,5 (3,9)
Temperatura da coluna: 42°C	113,3 (1,0)	102,6 (1,3)	106,0 (2,1)	108,9 (3,5)
Temperatura da coluna:38°C	111,3 (3,9)	107,3 (6,2)	102,3 (4,6)	110,8 (1,0)
Volume de Injeção: 9,5 μ L	110,7 (3,7)	105,1 (7,3)	100,1 (3,7)	103,4 (8,5)
Volume de Injeção: 10,5 μ L	118,7 (1,8)	111,1 (4,7)	103,4 (5,1)	112,4 (3,6)

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 4.10: Dados de robustez do método para estrogênios detectados pelo FLD

Condição cromatográfica alterada	Recuperação média e (coeficiente de variação) em porcentagem		
	Estriol	17 β -estradiol	17 α -etinilestradiol
FM 52,5% H ₂ O 47,5% ACN	93,2 (1,4)	97,9 (0,2)	96,7 (1,3)
FM 47,5% H ₂ O 52,5% ACN	100,5 (3,4)	104,1 (1,1)	108,5 (4,8)
Vazão da FM: 0,475 mL.min ⁻¹	107,0 (3,0)	108,8 (1,6)	106,1 (1,6)
Vazão da FM: 0,525 mL.min ⁻¹	95,3 (1,5)	97,5 (1,7)	96,4 (1,7)
Temperatura da coluna: 42°C	99,7 (0,2)	101,6 (2,9)	98,6 (0,9)
Temperatura da coluna: 38°C	96,8 (0,4)	102,2 (1,1)	101,0 (3,4)
Volume de injeção: 9,5 μ L	91,0 (0,4)	94,6 (1,7)	93,6 (1,6)
Volume de injeção: 10,5 μ L	100,6 (1,5)	104,1 (0,8)	103,0 (1,8)

Fonte: Arquivo pessoal.

De acordo com os dados apresentados nas Tabelas 4.9 e 4.10, pode-se verificar que os valores de recuperação dos analitos detectados pelo DAD estão entre 70,7 e 118,7% com CV inferiores a 10,6%. Enquanto que, as recuperações dos analitos com detecção pelo FLD estão compreendidas entre 91,0 e 108,8% com CV entre 0,2 e 4,8%.

Como as condições estudadas não apresentaram valores maiores que 45% para os CV e a recuperação está compreendida na faixa de 40 a 120%, nenhum dos parâmetros avaliados mostrou efeito significativo, indicando que o método pode ser considerado robusto frente a estas variações experimentais.

4.2 Condições cromatográficas otimizadas

De acordo com seção 3.6 foram otimizadas as condições cromatográficas para análise dos estrogênios estrona, 17 β -estradiol, estriol e 17 α -etinilestradiol. As condições ótimas estão apresentadas na Tabela 4.11.

Tabela 4.11: Condições cromatográficas otimizadas para análise dos estrogênios empregando CLAE

Tempo de corrida	18 minutos
Composição da fase móvel	Água:Acetonitrila - 50:50 (modo isocrático)
Vazão da fase móvel	0,5 mL.min ⁻¹
Volume de injeção	10 µL
Temperatura da coluna	40°C
Comprimento de onda do detector UV	285 nm
Comprimento de onda do detector de fluorescência	$\lambda_{ex} - 230 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} - 310 \text{ nm}$

Fonte: Arquivo pessoal

4.3 Otimização das condições para extração em fase sólida

Todos os experimentos de extração em fase sólida foram feitos como descrito na seção 3.7 (página 56) e de acordo com a Tabela 3.3. Primeiramente, foi calculado a recuperação para cada estrogênio detectado em cada experimento e em seguida, foi calculada a média desses valores, conforme apresentado na Tabela 4.12.

Tabela 4.12: Valores de recuperação média obtidos para os estrogênios com detecção pelo DAD e pelo FLD após realizar os experimentos de EFS

Experimento	Recuperação média (%)		Experimento	Recuperação média (%)	
	DAD	FLD		DAD	FLD
1	84	106	15	70	88
2	94	106	16	95	108
3	87	94	17	81	93
4	103	102	18	112	107
5	86	97	19	183	106
6	100	92	20	50	56
7	101	103	21	124	91
8	113	119	22	71	73
9	0	0	23	0	73
10	222	98	24	92	102
11	144	97	25	0	47
12	124	97	26	319	74
13	87	87	27	310	167
14	93	89	28	96	103

Fonte: Arquivo pessoal.

Como pode ser observado na Tabela 4.12 em alguns experimentos, como por exemplo o de número 10, os valores de recuperação média ultrapassaram a faixa aceitável de para recuperação dos analitos em análises de concentrações de ng.L^{-1} (40-120%). Os altos valores de recuperações obtidos podem estar relacionados à eluição de outras substâncias juntamente com o analito, interferindo na pureza do pico. Uma das formas de identificar se isso ocorreu, é por meio da pureza espectral dos picos dos analitos, pois quanto mais próximo de 1,00 mais puro é o pico.

O cromatograma da Figura 4.17 representa a separação dos quatro estrogênios de acordo com as condições de extração do experimento 10, em destaque estão os valores de pureza de pico para cada estrogênio.

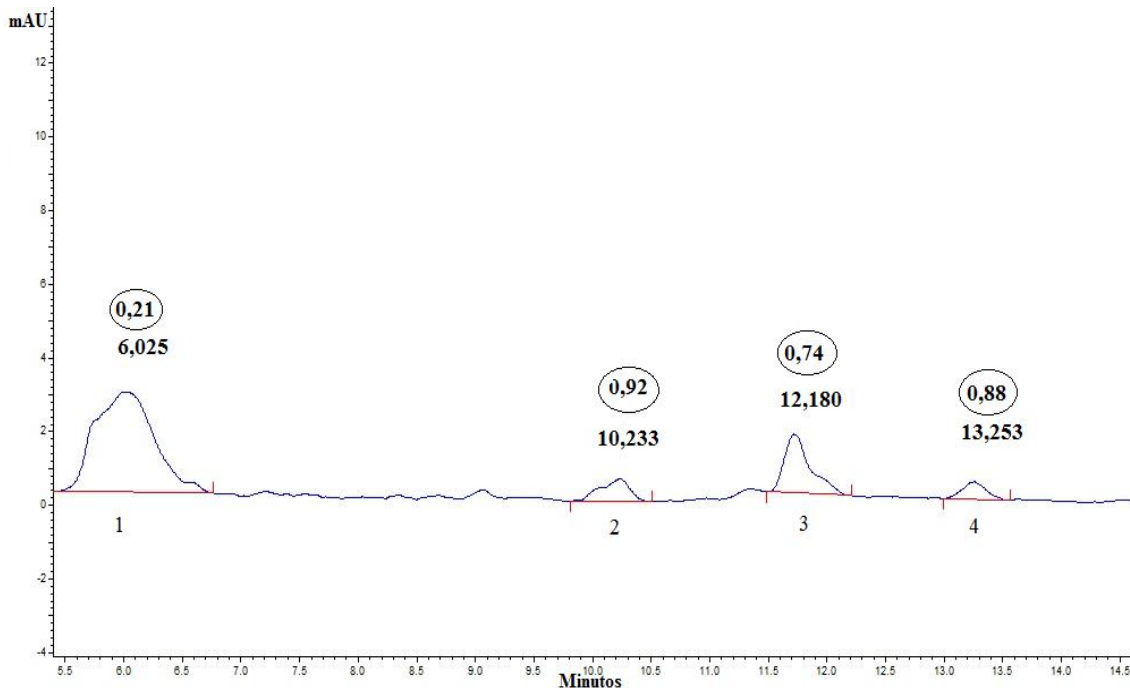


Figura 4.17: Cromatograma referente à separação e pureza espectral dos estrogênios: 1) estriol; 2) 17 β -estradiol; 3) 17 α - etinilestradiol e 4) estrona, extraídos de acordo com o experimento 10

Fonte: Arquivo pessoal.

Os valores de pureza de pico indicam que possivelmente esse analitos não estão puros, principalmente o pico 1 referente ao estriol, que apresenta pureza de pico de 0,21, valor inferior ao valor de referência (1,00).

Após a realização das extrações foi feito o tratamento estatístico dos dados utilizando o software *Statistica 2010* para obter gráficos de superfície de resposta, e a partir disso optar pelas melhores condições de extração. O mais viável foi averiguar o conjunto de condições que fornecesse resultados mais satisfatórios para os quatro analitos, considerando que na amostra real todos os quatro possam estar presente. Sendo assim, para cada experimento realizado foi calculado a média das recuperações obtidas dos quatro estrogênios com detecção pelo DAD e dos três estrogênios com detecção pelo FLD.

Os gráficos de superfície de resposta foram feitos relacionando as médias dos valores de recuperação no eixo Z com dois fatores nos eixos X e Y que estão codificados em -1, 0 e +1. Alguns exemplos dos gráficos gerados estão apresentados nas Figuras de 4.18 a 4.23. As variáveis relacionadas foram: cartucho *versus* pH da água, cartucho *versus* solvente de eluição, cartucho *versus* vazão da fase móvel durante a extração, pH da água *versus* solvente de eluição, pH da água *versus* vazão da fase móvel durante a extração e solvente de eluição *versus* vazão da fase móvel durante a extração.

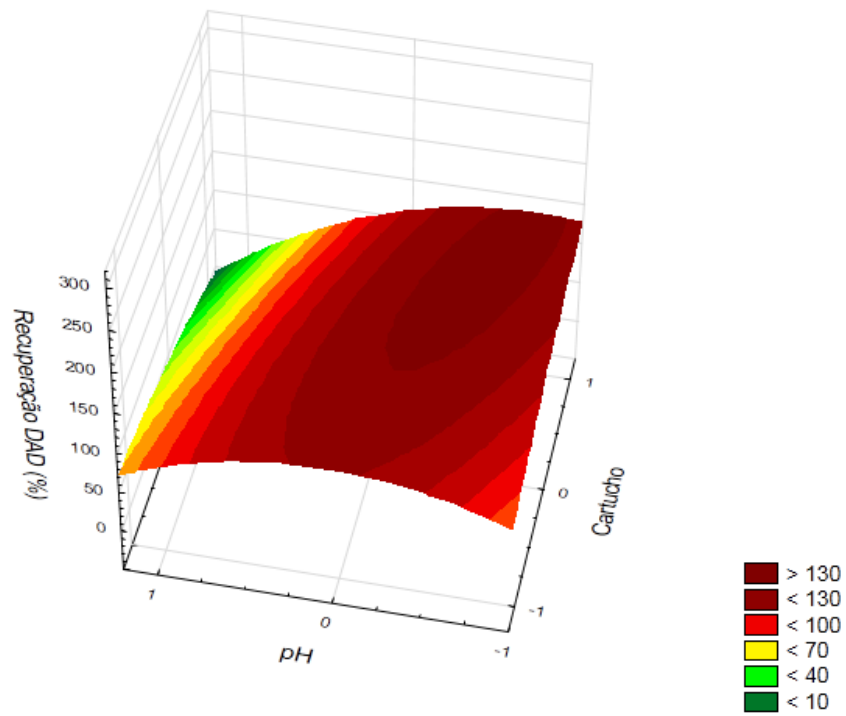


Figura 4.18: Curva de superfície de resposta relacionando marca do cartucho, valor do pH da amostra e recuperação média dos estrogênios detectados por DAD

Fonte: Arquivo pessoal.

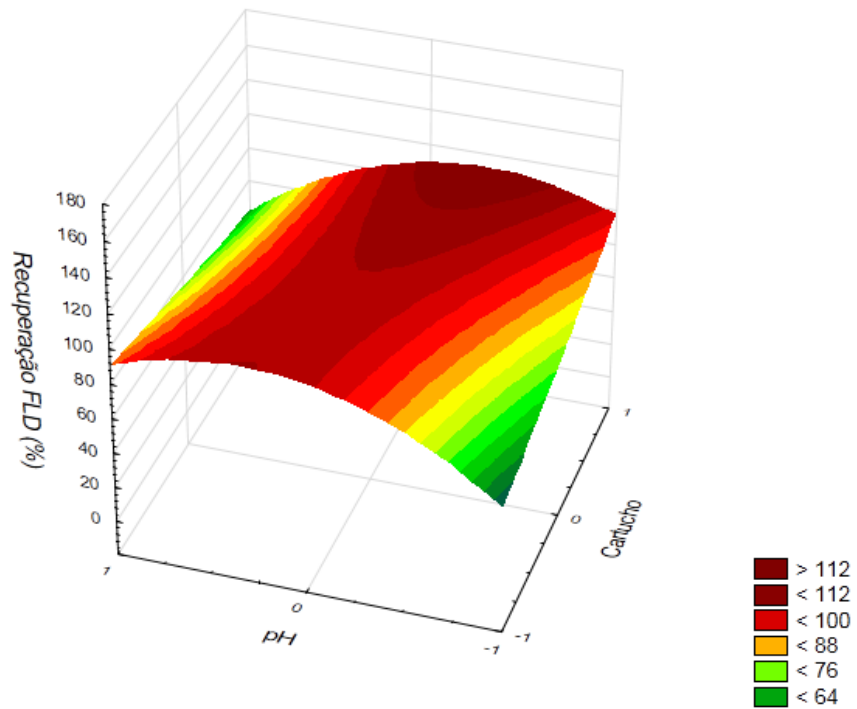


Figura 4.19: Curva de superfície de resposta relacionando marca do cartucho, valor do pH da amostra e recuperação média dos estrogênios detectados por FLD

Fonte: Arquivo pessoal.

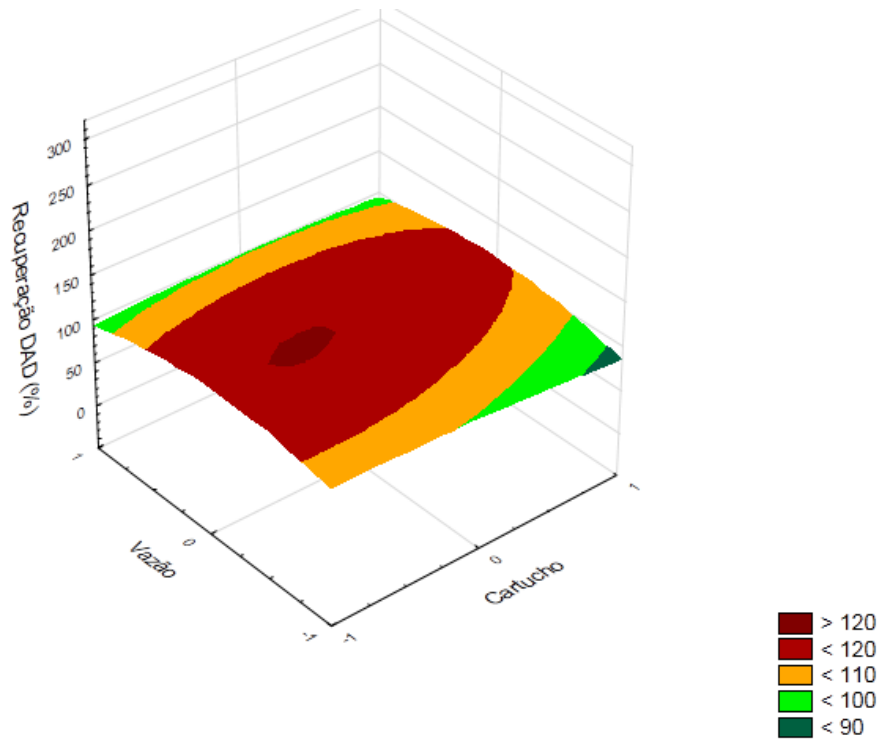


Figura 4.20: Curva de superfície de resposta relacionando marca do cartucho, vazão da extração e recuperação média dos estrogênios detectados por DAD

Fonte: Arquivo pessoal.

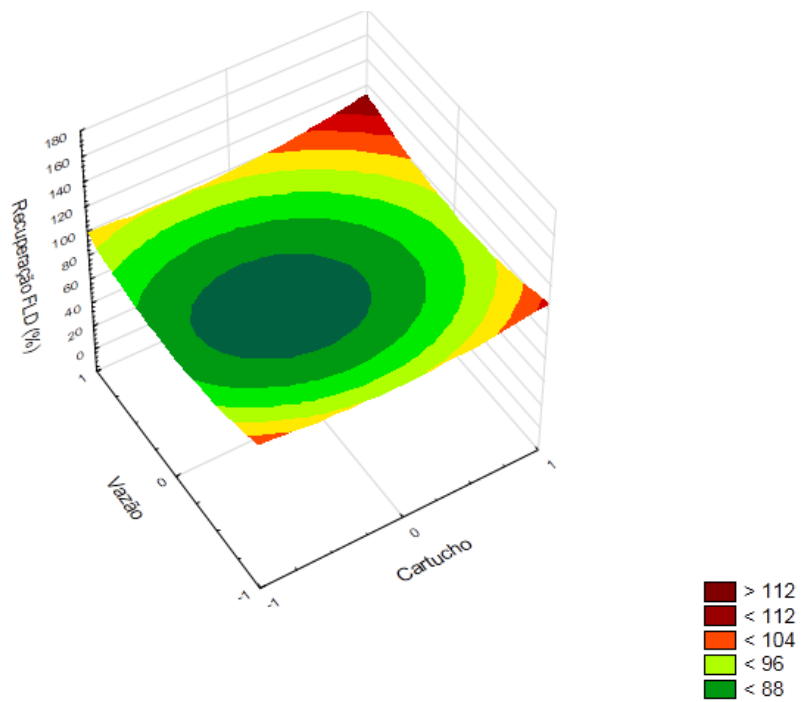


Figura 4.21: Curva de superfície de resposta relacionando marca do cartucho, vazão da extração e recuperação média dos estrogênios detectados por FLD

Fonte: Arquivo pessoal.

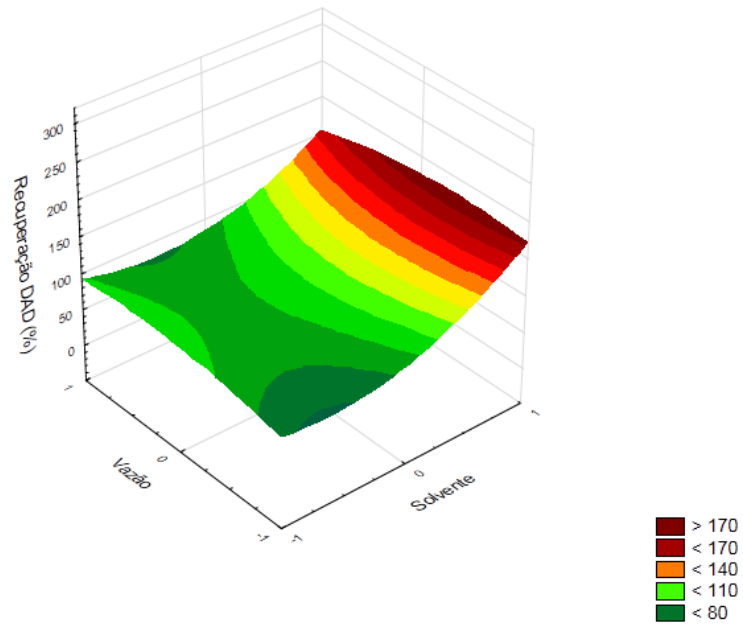


Figura 4.22: Curva de superfície de resposta relacionando solvente, vazão da extração e recuperação média dos estrogênios detectados por DAD

Fonte: Arquivo pessoal.

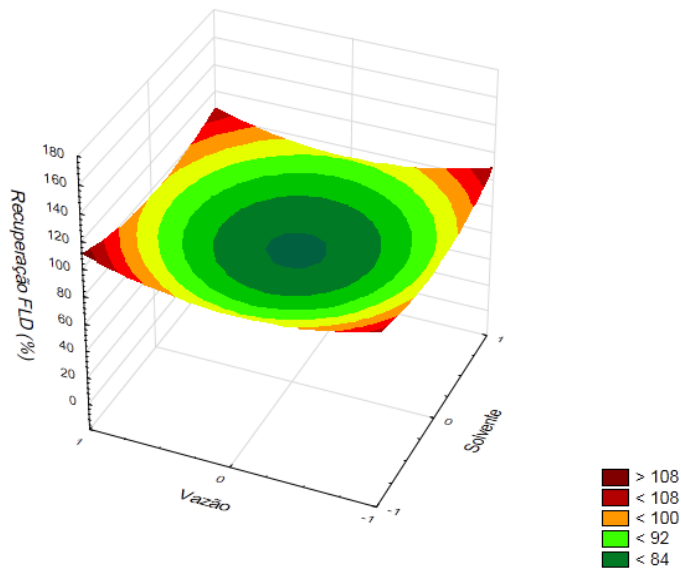


Figura 4.23: Curva de superfície de resposta relacionando solvente, vazão da extração e recuperação média dos estrogênios detectados por FLD

Fonte: Arquivo pessoal.

A partir dos dados gerados pôde-se estabelecer os fatores que apresentaram maior influência para a extração em fase sólida dos estrogênios em estudo.

Na relação cartucho e pH da amostra (figuras 4.18 e 4.19), observa-se que o pH mais adequado foi igual a 8, uma vez que, os valores de pKa do E1, E2, E3 e EE2 são: 10,34; 10,23; 10,40 e 10,05, respectivamente, o que indica que são ácidos fracos e apresentam maior estabilidade em valores de pH próximos a 10, ou seja, em meio básico. Outro fator que também pode influenciar é a fase sólida presente no cartucho. Os sorventes a base de sílica apresentam maior estabilidade a pH na faixa de 2-8 (JARDIM, 2015).

Ao relacionar vazão da fase móvel durante a extração com cartucho (Figuras 4.20 e 4.21), nota-se que na menor vazão produziu melhores resultados, pois quanto maior o tempo que a amostra ficar em contato com a fase sólida do cartucho maiores serão as chances de ocorrer interações entre os analitos e o sorvente.

A maioria dos experimentos apresentou valores de recuperação dentro da faixa aceitável para ambos detectores, porém, de acordo com as curvas de superfície de resposta optou-se pelo experimento de número 5 que apresentou as seguintes condições: cartucho da marca Chromabond C18-ec, pH da água igual a 8, Metanol: Acetato de Etila (1:1) como solventes de eluição e vazão da fase móvel durante a extração de 3 mL.min⁻¹. Essas condições de extração em fase sólida foram as que apresentaram melhor desempenho dentre os 28 experimentos e valores de recuperação mais satisfatórios.

4.4 Tentativa de reutilização dos cartuchos utilizados na extração

Uma caixa com 30 cartuchos para extração em fase sólida da marca Chromabond C-18 ec, com volume de 6 mL, adsorvente de 500 mg custa em média R\$535,00 (cotação obtida em 16/06/2016), segundo o representante do fabricante Macherey-Nagel no Brasil. Devido aos altos custos agregados à compra desses cartuchos, foi realizado uma tentativa de reutilização do adsorvente.

Os cartuchos de extração foram preparados como descrito na seção 3.8. Alguns deles ficaram armazenados imersos em metanol por cerca de 30 dias, enquanto que outros ficaram imersos no mesmo solvente por apenas 3 dias.

As extrações em fase sólida foram feitas em triplicatas juntamente com um branco em cada nível de concentração. A água destilada foi fortificada com solução mista em concentrações de 0,40; 0,50 e 0,60 µg.L⁻¹. Vale ressaltar que, as condições de extração não foram modificadas, ou seja, foram as mesmas obtidas na otimização da extração em fase sólida. Na Tabela 4.13 estão apresentados os valores de recuperação média dos estrogênios.

Tabela 4.13: Valores de recuperação obtidos para os estrogênios estriol, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol após tentativa de reutilização dos cartuchos de extração

Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Recuperação média (%)		
	Estriol	17 β -estradiol	17 α -etinilestradiol
0,40 (1)	5,8	4,8	5,2
0,40 (2)	16,7	3,9	7,3
0,40 (3)	27,9	34,4	36,9
0,50 (1)	19,1	14,1	15,6
0,50 (2)	20,4	16,2	18,3
0,50 (3)	15,4	9,9	11,1
0,60 (1)	9,3	10,6	12,0
0,60 (2)	9,7	9,1	10,9
0,60 (3)	34,5	29,8	33,0

Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com a Tabela 4.13, observou-se que as recuperações médias apresentaram valores inferiores à faixa aceitável (compreendida entre 40-120%), isso comprova que não foi possível recuperar as fases adsorventes presentes nos cartuchos.

Como esses cartuchos já foram utilizados, possivelmente ocorreu alguma deformação e/ou obstrução dos sítios específicos de reconhecimento das moléculas dos analitos, impedindo que as mesmas fossem efetivamente retidas pelos sítios ativos presentes no adsorvente. Pode-se destacar também, que nesse caso, não houve interferência do tempo que os cartuchos ficaram imersos no solvente, pois, tanto os cartuchos que ficaram imersos 30 dias, assim como, os que ficaram 3 dias, apresentaram baixa porcentagem de recuperação. No entanto, não foi encontrado na literatura trabalhos relacionados a esse assunto, impedindo que seja feitas comparações entre os resultados obtidos e outros estudos.

4.5 Determinação dos estrogênios no Lago de Furnas no município de Alfenas- MG

4.5.1 Algumas características físicas e químicas das amostras e do entorno dos pontos de coleta

A fim de identificar se as amostras de água coletadas e o ambiente no entorno dos pontos de coleta estavam de acordo com os padrões para corpos de água determinados pela Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) 357/2005, foi feita a medição do oxigênio dissolvido na água, do pH, da condutividade e da temperatura da água (Tabela 4.14).

Tabela 4.14: Valores de pH, oxigênio dissolvido, condutividade e temperatura medidos no entorno dos pontos de coleta de água na região de estudo

Data da amostragem	Ponto de coleta	pH	Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)	Temperatura (°C)	Condutividade (µS.cm ⁻¹)
09-03-2016	1	6,16	5,48	28,22	22
	2	6,96	5,38	28,23	20
	3	7,05	5,07	28,11	25
	4	7,05	5,26	27,96	27
	5	7,11	5,65	28,31	22
07-04-2016	1	8,36	8,14	29,21	30
	2	8,32	8,10	29,13	33
	3	7,61	7,30	28,23	28
	4	8,11	7,07	28,52	25
	5	8,10	6,99	28,73	30
28-04-2016	1	6,42	4,60	26,63	ND
	2	6,75	4,05	26,92	ND
	3	6,74	4,18	27,00	ND
	4	6,71	3,88	26,96	22
	5	6,77	3,44	27,03	14
19-05-2016	1	6,29	3,75	24,25	32
	2	6,33	3,05	23,98	28
	3	6,39	2,77	24,06	35
	4	6,38	2,90	24,02	37
	5	6,44	3,75	24,02	39

ND: Nenhum valor foi determinado nesse ponto.

Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com os dados da Tabela 4.14, observa-se que os parâmetros que demonstraram mudança significativa foram: oxigênio dissolvido na água, variando de 8,14 mg.L⁻¹ no mês de abril para 2,77 mg.L⁻¹ no mês de maio.

O pH é considerado como uma das variáveis ambientais mais importantes e uma das mais difíceis de interpretar, devido ao grande número de fatores que podem influenciá-lo, tais como, as relações entre matéria orgânica, seres vivos, rocha, ar e água. (ALVES et al., 2008; VASCONCELOS; SOUZA, 2011). A decomposição da matéria orgânica libera dióxido de carbono (CO₂), com isso, há um aumento no valor do pH dos corpos d'água. Isso afeta diretamente os ambientes aquáticos, uma vez que, a solubilidade e disponibilidade de compostos orgânicos em águas pode aumentar significativamente quando são sorvidos em matéria orgânica dissolvida (ALVES et al., 2008; YAMAMOTO et al., 2003).

De acordo com a Resolução CONAMA 357/2005, o Lago de Furnas é classificado como rio classe II, e os valores aceitáveis de pH são entre 6,0 e 9,0. Sendo assim, os valores medidos se enquadram dentro da faixa permitida, variando de 6,16 a 8,36.

Outra característica quantificada, foi o oxigênio dissolvido (OD) na água, que é imprescindível à sobrevivência dos organismos aeróbios. Ambientes aquáticos com baixos teores de OD além de apresentarem riscos à vida dos organismos, indicam a presença de sólidos orgânicos, uma vez que, a decomposição da matéria orgânica pelas bactérias aeróbias é acompanhada pelo consumo do OD na água (VASCONCELOS; SOUZA, 2011).

Segundo a Resolução CONAMA 357/2005 o oxigênio dissolvido da água em qualquer amostra não deve ser inferior a 5 mg.L⁻¹. Diante dos valores apresentados na Tabela 4.16, observa-se que as amostragens dos dias 28/04/16 e 19/05/16 apresentaram valores de OD inferiores a 5 mg.L⁻¹, ou seja, abaixo do nível permitido. Isso pode estar relacionado ao fato de que no dia 01/05/16 ocorreu um acidente ambiental, matando toneladas de tilápias que estavam sendo criados em tanques-redes (ponto de coleta 5). Esse fato foi amplamente divulgado pela imprensa local (G1-Sul de Minas, 02/05/2016). Para a Polícia Militar de Meio Ambiente, esse acidente pode ter sido decorrente da diminuição do oxigênio na água, pois, no dia do ocorrido o valor medido foi de 1 mg.L⁻¹. Segundo um professor da Universidade Federal de Alfenas, a ausência do sol e previsão de chuva por vários dias seguidos, contribuiu para a diminuição de oxigênio na água e pode ter sido a causa da morte de algas vermelhas, que liberam substâncias tóxicas ao morrerem, colaborando para acelerar o processo de mortandade dos peixes (G1-Sul de Minas, 02/05/2016). No entanto, esse não foi o primeiro acidente dessa natureza. Em

11/03/13 algo semelhante aconteceu no mesmo local, devido a seca do ano de 2012, o nível do Lago abaixou e uma espécie de alga se desenvolveu, com o aumento de chuvas e temperatura, houve proliferação dessas algas o que fez reduzir a quantidade de oxigênio dissolvido da água causando a morte de peixes (Globo Rural, 11/03/2013).

A temperatura pode interferir na condutividade elétrica, na quantidade de oxigênio dissolvido e na solubilidade de vários compostos. Além disso, o crescimento microbiano é influenciado por temperaturas ótimas (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007; DONADIO; GALBIATTI; PAULA, 2005). Sendo assim, quanto maior a temperatura, maior será a atividade microbiana e maior será a biodegradabilidade dos IEs presentes na água, uma vez que, a biodisponibilidade desses compostos estão intimamente ligados à ação de micro-organismos. A sorção de muitos IEs apresentam uma relação inversamente proporcional à temperatura, ou seja, quanto maior a temperatura menor será a sorção de tal composto (KHANAL et al., 2006; KRAEMER et al., 2009).

De acordo com a Tabela 4.14, observa-se que as temperaturas variaram de 23,98 a 29,21°C. Essas oscilações referem-se à variações sazonais, pois, as temperaturas mais baixas referem-se à amostragem do mês de maio, que já estava próximo ao inverno, enquanto que, as temperaturas mais altas são referentes as amostragens de dezembro a abril, abrangendo as outras estações do ano.

A condutividade é a expressão numérica da capacidade da água conduzir corrente elétrica. Esse parâmetro depende da concentração iônica e indica a quantidade de sais existentes na coluna d'água e, portanto apresenta uma medida indireta da concentração de poluentes. Esse parâmetro não é estabelecido pela Resolução CONAMA 357/2005, porém segundo a CETESB (2009) níveis superiores a $100 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ podem indicar ambientes impactados. De acordo com as medições, os valores de condutividade estão compreendidos entre 14 e $39 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, bem abaixo dos limites estabelecidos pela CETESB, indicando que possivelmente esses pontos de amostragens não apresentam altas cargas de poluição. Vale ressaltar que, os valores de condutividade dos pontos 1, 2, e 3 da amostragem do dia 28/04/16 não foram determinados, devido a falhas técnicas do aparelho utilizado durante as coletas dessas amostras.

Além das características medidas com a sonda multiparâmetros em campo, após o transporte das amostras de água para o laboratório da Universidade, foram realizadas análises de turbidez em todas as amostras (Tabela 4.15).

Tabela 4.15: Valores da turbidez medida em cada amostra de água coletada

Ponto de coleta	Amostragem	Amostragem	Amostragem	Amostragem
	09/03/16	07/04/16	28/04/16	19/05/16
	Turbidez (UNT)	Turbidez (UNT)	Turbidez (UNT)	Turbidez (UNT)
1	4,5	6,0	5,6	3,8
2	4,3	5,2	5,5	3,4
3	4,9	2,8	5,0	3,7
4	4,4	2,4	5,3	3,5
5	5,0	2,3	4,6	3,9

Fonte: Arquivo pessoal

De acordo com a Resolução CONAMA 357/2005, os valores de turbidez permitidos para um rio de classificação classe 2 é de até 100 UNT (Unidade Nefelométrica de Turbidez). Valores acima desse limite podem indicar que cargas poluidoras atingiram essa área do Lago constantemente, seja por meio de esgoto bruto doméstico, industriais, resíduos de animais ou outras fontes difusas de contaminação. No entanto, os valores aferidos foram inferiores a 6,0 UNT, indicando que os pontos amostrais apresentavam água com reduzida turbidez.

4.5.2 Extração das amostras coletadas

De acordo com as curvas das superfícies de resposta obtidas optou-se pelo experimento de número 5 para realizar a extração das amostras de água coletadas. As extrações das amostras foram realizadas para cada um dos 5 pontos de amostragens, utilizando um sistema *Vacuum Manifold* (Supelco) da seguinte maneira:

- 1) O pH da amostra foi ajustado para 8 com auxílio de uma chapa de agitação, um medidor de pH e adição de ácido clorídrico $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ e hidróxido de sódio $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, este último foi adicionado apenas quando o pH ultrapassava 8,0;
- 2) O cartucho da marca Chromabond C18-ec ($0,45 \mu\text{m}$, 500 mg, 6 mL) do fabricante Macherey- Nagel, foi condicionado com 5,00 mL de metanol a uma vazão de 3 mL.min^{-1} ;
- 3) A amostra (1L) foi percolada pelo cartucho a uma vazão de 3 mL.min^{-1} ;
- 4) O cartucho foi lavado com 1,00 mL de uma solução de água: 5% metanol a uma vazão de 3 mL.min^{-1} ;
- 5) Os analitos foram eluídos com adição de 5,00 mL de metanol:acetato de etila ao cartucho a uma vazão de 3 mL.min^{-1} ;

Os eluatos foram secos, resuspenso em 1,00 mL de acetonitrila e injetados no sistema de CLAE para análise cromatográfica.

4.5.3 Análise cromatográfica das amostras coletadas

Através da validação da metodologia analítica, foi possível constatar que o detector FLD, foi mais sensível, apresentou limites de detecção e de quantificação menores e valores de recuperação mais próximos de 100%. Portanto, optou-se por analisar os estrogênios estriol (E3), 17β -estradiol (E2) e 17α -etinilestradiol (EE2) com esse detector. No entanto, a estrona (E1) não é uma substância fluorescente e utilizando o método validado foi detectada apenas pelo detector por ultravioleta com arranjo de diodos (DAD). A Figura 4.24 mostra um dos cromatogramas obtidos na análise das amostras coletadas no Lago de Furnas, com detecção pelo FLD.

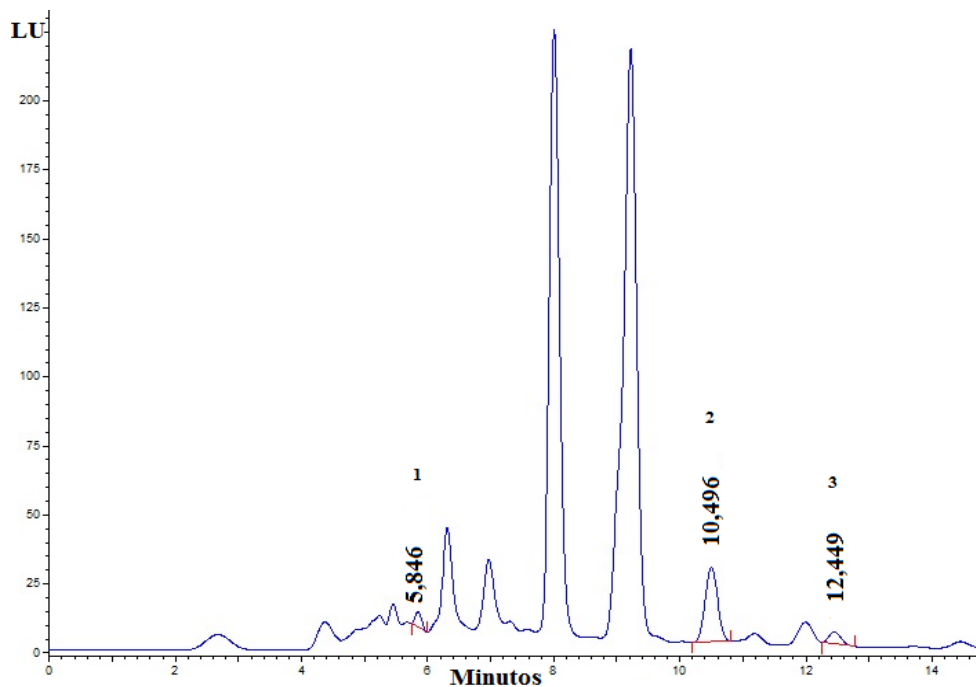


Figura 4.24: Cromatograma de uma das amostras de água coletadas no Lago de Furnas, referente à separação dos estrogênios com detecção pelo FLD: 1) estriol; 2) 17β -estradiol; 3) 17α -etinilestradiol

Fonte: Arquivo pessoal.

Pode-se observar que os analitos apresentaram boa separação e os tempos de retenção obtidos são próximos aos valores apresentados na Tabela 4.1 da Seção 4.1.1. Vale ressaltar que, a estrona detectada apenas pelo DAD durante a validação da metodologia analítica empregada, não foi encontrada em nenhuma das amostras coletadas.

Os resultados apresentados na Tabela 4.16, são referentes às concentrações médias e desvio padrão para cada estrogênio encontrado nos cinco pontos de coleta durante as cinco campanhas de amostragens, realizadas entre dezembro de 2015 e maio de 2016.

Tabela 4.16: Concentração média e desvio padrão encontrado para estriol, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol nas amostras de água coletadas na região de estudo

Amostragem (data)	Estrogênio	Ponto de coleta				
		Concentração média (ng.L ⁻¹) \pm desvio padrão				
		1	2	3	4	5
1 (07/12/2015)	E3	ND	ND	ND	202 \pm 8,6	237 \pm 10,7
	E2	76 \pm 1,4	75 \pm 1,4	101 \pm 1,4	*1732 \pm 8,6	*2089 \pm 6,6
	EE2	ND	ND	ND	322 \pm 10,4	320 \pm 11,0
2 (09/03/2016)	E3	ND	< LQ	157 \pm 4,6	366 \pm 5,0	181 \pm 14,1
	E2	154 \pm 3,8	116 \pm 0,6	124 \pm 0,6	*9998 \pm 2,6	195 \pm 3,4
	EE2	ND	ND	118 \pm 0,6	209 \pm 4,6	196 \pm 3,8
3 (07/04/2016)	E3	318 \pm 3,0	208 \pm 6,6	182 \pm 0,6	120 \pm 1,0	110 \pm 3,1
	E2	*2536 \pm 1,0	*1993 \pm 1,4	*1792 \pm 0,6	*1415 \pm 0,6	*1066 \pm 1,1
	EE2	422 \pm 5,0	284 \pm 2,5	256 \pm 10,1	180 \pm 2,2	141 \pm 1,1
4 (28/04/2016)	E3	153 \pm 18,2	ND	ND	ND	ND
	E2	*1101 \pm 0,0	411 \pm 6,7	436 \pm 2,0	236 \pm 1,1	231 \pm 1,0
	EE2	143 \pm 4,0	67 \pm 2,9	63 \pm 1,6	< LQ	< LQ
5 (19/05/2016)	E3	ND	ND	ND	ND	ND
	E2	321 \pm 1,6	183 \pm 2,5	254 \pm 1,1	194 \pm 0,6	206 \pm 0,6
	EE2	76 \pm 0,0	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

*Amostras que foram diluídas 10 vezes para compreenderem a faixa de concentração da curva analítica do método validado; ND = Não Detectado.

Fonte: Arquivo pessoal.

De modo geral, os resultados da Tabela 4.16 mostram que em todos os pontos de coleta de todas as amostragens realizadas, foi encontrado pelo menos um dos estrogênios em estudo.

O estriol (E3) se mostrou abaixo do LD em 52% das amostras. Em 4% ficou abaixo do LQ, porém, acima do LD. Foi efetivamente quantificado em 44% das amostras em concentrações entre $11 \pm 3,1$ e $366 \pm 5,0$ ng.L⁻¹. Assim, podemos afirmar que o E3 foi detectado em 48% das amostras.

O 17 β -estradiol (E2) foi detectado e quantificado em todas as amostras. As concentrações encontradas mostraram-se entre $75 \pm 1,4$ e $9998 \pm 2,6$ ng.L⁻¹

O 17 α -etinilestradiol (EE2), se mostrou abaixo do limite de detecção em 20% das amostras. Em 24% foi detectado, porém, não pôde ser quantificado e em 56% das amostras foi efetivamente detectado em concentrações de $63 \pm 1,6$ a $422 \pm 5,0$ ng.L⁻¹. Dessa forma, podemos assumir que esse estrogênio foi detectado em 80% das amostras.

Como descrito anteriormente, a estrona foi detectada apenas usando-se DAD empregando esse método, porém, esse estrogênio não foi encontrado em nenhuma das amostras amostras coletadas no Lago de Furnas. Outros autores também fizeram o uso de DAD e FLD em seus trabalhos, pelo fato da estrona e de outras substâncias analisadas não serem fluorescentes. Pérez e Escandar (2016) coletaram amostras de sedimentos de uma estação de tratamento de água (ETA) e de águas (mineral, subterrânea e de rio), na cidade de Rosário na Argentina. E1, E2, E3 e EE2 foram encontrados de forma geral, em concentrações de 12-39; 11-96; 12-105 ng.L⁻¹ nas amostras de água subterrânea, mineral e de rio, respectivamente. Já nas amostras de sedimentos dos rios Carcarañá, Paraná e na própria ETA, as concentrações encontradas foram de 5-25; 7-24,2; 6-18 ng.g⁻¹, respectivamente.

Resultados semelhantes aos apresentados no corrente estudo, foram relatados por Montagner e Jardim (2011). Um método analítico foi otimizado para a determinação de 15 contaminantes emergentes em águas superficiais do Rio Atibaia na cidade de Campinas (SP), usando extração em fase sólida e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta com arranjo de diodos e por fluorescência. O método foi aplicado para o monitoramento espacial e sazonal desses contaminantes emergentes incluindo, estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2). Dentre esses três estrogênios, o E2 foi o mais detectado, estando presente em 35% das 26 amostras em concentrações elevadas, assim como no corrente estudo, variando de 106 a 6806 ng.L⁻¹. O EE2 foi encontrado em apenas três amostras e a E1 não foi detectada pela metodologia otimizada.

Concentrações próximas aos valores encontrados para estriol no corrente estudo, foram apresentados por Belhaj et al. (2015), que avaliaram durante um ano o comportamento e a

variação sazonal dos estrogênios estriol (E3), 17β -estradiol (E2), estrona (E1) e 17α -etinilestradiol (EE2), em amostras de águas residuais e lodo de uma estação de tratamento de esgoto (ETE), na Tunísia. Em relação as amostras de águas residuais, o estrogênio E1 foi detectado nos 3 pontos de coleta, variando de 10 a 50 ng.L^{-1} . Já os demais, foram detectados nos pontos 1 e 2 nas seguintes concentrações: 10,8 e 9 ng.L^{-1} para E2, 36,7 e 32 ng.L^{-1} para EE2 e 398 e 328 ng.L^{-1} para E3. Os resultados mostraram forte relação entre a remoção dessas substâncias com a flutuação sazonal, sendo a estação do verão a qual apresentou valores mais elevados de remoção ($\geq 80\%$) para os 4 estrogênios em estudo. Notou-se que no inverno e na primavera, a concentração de E1 e E2 no efluente excedeu largamente as concentrações encontradas no afluente. E no inverno o lodo da ETE apresentou um nível relativamente elevado de estrogênios não degradados.

Muitos trabalhos na literatura relataram a determinação desses estrogênios, porém, foram detectados em concentrações menores em comparação às encontradas nas amostras do presente estudo. Monteiro e Andrade (2015) desenvolveram e validaram uma metodologia analítica para a determinação dos estrogênios sintéticos levonorgestrel (LNG) e 17α -etinilestradiol (EE2) em águas superficiais do Rio Sapucaí em Itajubá (MG). A amostragem foi realizada na região urbana de Itajubá, durante o período chuvoso. O EE2 foi encontrado nos 5 pontos de coletas em concentrações entre 67,4 e 99,1 ng.L^{-1} , enquanto que o LNG não foi encontrado em nenhum ponto de coleta. Em Belo Horizonte (MG), Moreira e colaboradores (2009) analisaram amostras de águas do Rio das Velhas, Morro Redondo e do Lago de Vargem das Flores, as quais apresentaram no geral concentrações entre 1,5 e 36,8 ng.L^{-1} para 17β -estradiol e de 3,0 a 54 ng.L^{-1} para 17α -etinilestradiol. Outros autores, relataram concentrações mais baixas ainda de E2 e EE2 em amostras de águas subterrâneas na região de Rhône-Alpes (França), sendo, 0,3 e 1,3 ng.L^{-1} para E2 e 0,5 e 3,0 ng.L^{-1} para EE2 (VULLIET et al., 2008). Na Áustria, Bursch e colaboradores (2004) avaliaram águas em locais de rotina de controle de qualidade da água, perfazendo 27 locais de amostragens em águas superficiais e 59 lugares em águas subterrâneas, totalizando 261 e 112 amostras coletadas, respectivamente. Os interferentes endócrinos analisados foram: 17β -estradiol, estriol, estrona, 17α -etinilestradiol, 4-nonilfenol, 4-nonilfenoletoxilato e produtos de suas degradações, octilfenol e octifenol-etoxilato, além, do bisfenol. Em mais de 50% das amostras de águas superficiais, E2 e E1 foram detectados, porém, em baixas concentrações, em média, de 0,13 e 0,35 ng.L^{-1} , respectivamente. Já nas amostras de águas subterrâneas, o E2 foi detectado em 50% das amostras com valor máximo de 0,79 ng.L^{-1} .

Em contra partida, trabalhos realizados no Brasil, assim como, em outros países, encontraram esses estrogênios em concentrações superiores às concentrações relatadas no corrente estudo. Na cidade de Campinas (Brasil) em análises de amostras de águas superficiais, foram encontradas concentrações na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$ de E1, E2, e EE2 variando os valores entre, 3,5-5,0; 1,9-6,0 e 1,2-3,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente (GHISELLI; JARDIM, 2007). Daniel e Lima (2014) determinaram a presença dos estrogênios estrona, estriol, 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol em amostras de águas do Rio Tubarão, na divisa entre os municípios de Santo André e Mauá (SP). Nesse estudo foram detectados concentrações significativamente relevantes dos estrogênios estriol e estrona, 0,4 e 0,32 g.L^{-1} , respectivamente. Chaves (2015), validou um método analítico e empregou EFS e CLAE-UV para a determinação dos interferentes endócrinos bisfenol-A (BFA), β -estradiol (E2), 17α -etinilestradiol (EE2) e estrona (E1), no Rio Paraíba do Sul em Aparecida (SP). Amostras de águas superficiais foram coletadas em profundidades diferentes e em um ponto próximo de captação para abastecimento público (50 m a jusante do descarte de esgoto do Santuário Nacional de Aparecida). Concentrações elevadas foram encontradas para todos os analitos, variando de: 0,032-0,088 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para BFA; 0,009-0,40 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para E2; 0,07-0,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para EE2 e 0,107-0,91 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para E1. A autora inferiu que os valores obtidos podem estar relacionados ao número de visitantes à cidade, ao tratamento convencional de esgoto que talvez seja ineficiente e ao índice pluviométrico e temperatura. Uma vez que, tais substâncias quando encontradas em ng.L^{-1} já apresentam riscos para o sistema endócrino de animais e à biota, essa exposição se torna muito mais preocupante ao passo que os estrogênios estão sendo encontrados na ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$ e g.L^{-1} .

Os trabalhos descritos anteriormente, ratificam que os resultados encontrados no Lago de Furnas no município de Alfenas não é um caso particular, mostrando que rios de diferentes lugares do Brasil apresentam contaminação de suas águas por algum dos quatro interferentes endócrinos em estudo.

Analisando cada amostragem particularmente, percebemos que na amostragem 1 (07/12/2015), E3 e EE2 foram encontrados apenas nos pontos 4 e 5 e em concentrações altas, superiores a 202 ng.L^{-1} . Enquanto que, o estrogênio E2 foi detectado e quantificado em todas as amostras, em concentração de 60 a 90 ng.L^{-1} nos pontos 1, 2 e 3. Já nos pontos 4 e 5, as concentrações encontradas desse estrogênio foram altas o suficiente para extrapolar a curva analítica (1000 ng.L^{-1}), tornando-se necessário fazer a diluição dessas amostras. Sendo assim, uma alíquota de 100 μL da amostra foi diluída em 900 μL de acetonitrila e analisado novamente

no sistema cromatográfico. Portanto, as concentrações reais encontradas para E2 nos pontos de coleta 4 e 5 foram 1683 e 2112 ng.L⁻¹, respectivamente.

O mesmo procedimento de diluição se repetiu para a amostragem 2 e 4, onde o 17 β -estradiol (E2) foi encontrado em concentrações de 9998 e 1101 ng.L⁻¹ nas amostras dos pontos 4 e 1, respectivamente.

Todos os estrogênios em estudo, exceto estrona, foram detectados e quantificados nas amostras de água dos cinco pontos de coleta da amostragem 3. Porém, o E2 foi encontrado em concentrações superiores a 1000 ng.L⁻¹ em todas as amostras e, por isso, essas tiveram que ser diluídas conforme descrito anteriormente.

Na amostragem 5, na maioria das amostras o 17 α -etinilestradiol (EE2) foi detectado, mas não pôde ser quantificado, pois, a concentração encontrada para tal estrogênio foi inferior ao limite de quantificação do método (50 ng.L⁻¹). Diante disso, conclui-se que o EE2 foi encontrado em concentrações consideravelmente menores ao comparar com as concentrações obtidas na amostragem 3, que estão compreendidas entre 141 e 422 ng.L⁻¹.

Em um estudo realizado por Li et al. (2013) foi monitorado a biodegradação de 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2) em amostras de água e solo, esses compostos apresentaram meias-vidas de 1,7; 5,3 dias para E2, EE2, respectivamente, indicando que o EE2 não era tão facilmente biodegradável como os demais IEs em estudo. Os autores averiguaram que, conforme havia a formação de E1, as concentrações de E2 e EE2 diminuíam, em seguida, a concentração de E1 diminuiu e ao mesmo tempo estriol (E3) foi detectado. Por isso, foi proposto a seguinte via de biotransformação desses estrogênios: E2 - EE2 - E1 - E3. Foi observado também durante a biodegradação de uma amostra de solo contendo EE2 a formação de E3, porém, E1 não foi formado como produto intermediário, constatando assim, que há a possibilidade de ocorrer uma conversão aeróbia do EE2 ao E3. No corrente estudo estriol (E3) foi detectado e quantificado em poucas amostras. De acordo com os dados da Tabela 4.19, em todas as amostras que foram detectados E3, também foram detectados concentrações de EE2. Isso pode representar um indicativo que o E3 presente nas amostras, poderia ser proveniente da conversão aeróbica de EE2 à E3.

Há trabalhos que não estudam o estriol, talvez pelo fato desse estrogênio eluir nos primeiros minutos de análise da amostra, podendo coeluir com substâncias que irão interferir no seu pico e dificultar sua separação. Girotto e colaboradores (2007) otimizaram um método de extração em fase sólida utilizando ferramentas quimiométricas para extrair E1, E2 e EE2.

No Ceará, Pessoa e colaboradores (2012) otimizaram um método analítico para determinar E1, E2 e EE2 em efluente tratado por sequência de lagoas, para tal, utilizaram extração em fase sólida e cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas. Lopes et al. (2010) investigaram a presença de E1 e E2 em amostras de água de diferentes lugares. As coletas foram realizadas na nascente do córrego Rico, após passagem pela área urbana do município de Monte Alto (localizado entre a nascente e Jaboticabal), no ponto de captação de água para Jaboticabal e após passagem pela ETA da cidade. Os autores concluíram que as concentrações mais altas para os dois estrogênios foram encontradas entre Monte Alto e Jaboticabal, onde há cerca de 92 propriedades rurais e lançamento de esgoto bruto, podendo ser essas, as maiores fontes de aporte de estrogênios para a água.

No presente estudo, a estrona (E1) não foi detectada nem quantificada pela metodologia analítica otimizada. Porém, as altas concentrações encontradas para 17 β -estradiol (E2), levam a crer que estrona possa estar presente no Lago de Furnas, pois, ao ser excretado o estrogênio E2 é oxidado à E1. Por outro lado, diante do valor de coeficiente de sorção da estrona (4882), o maior dentre esses quatro estrogênios, pode-se esperar alto potencial de sorção em solos e sedimentos, o que reduziria sua concentração em meios aquosos (DOLAR et al., 2012; GUEDES-ALONSO et al., 2014; HAMID; ESKICIOGLU, 2012).

Os estrogênios E3, E2 e EE2 podem não terem sido detectados em algumas amostras pelo fato de estarem na forma conjugada, basicamente na forma de sulfatos e glucoronídeos. Esses conjugados polares, são biologicamente inativos e mais solúveis em água em comparação com o seu homólogo não conjugado correspondente. Portanto, para monitorar a presença desses estrogênios, seria necessário um método analítico específico para sua determinação. Trabalhos tanto no Brasil, como em outros países, têm sido desenvolvidos para análise dessas substâncias em ambientes aquáticos, solo ou efluentes.

Kuster e colaboradores (2009) monitoraram a presença de 5 fitoestrogênios, 3 progestogênios, 5 estrogênios livres, incluindo E1, E2, E3 e EE2 e 6 estrogênios conjugados (E3G, E2G, E1G, E3S, E2S e E1S) em vinte amostras de águas. As amostras foram coletadas nos Rios Guandú, Paraíba do Sul e Macaé, no Canal Pavuna e em duas lagoas situadas na parte sul da cidade do Rio de Janeiro. Os resultados mostraram que os fitoestrogênios chegaram à concentrações de até 366 ng.L⁻¹, os progestogênios até 47,1 ng.L⁻¹ e os estrogênios a 7,3 ng.L⁻¹. Referente a essa última classe de hormônios, foram detectados estriol (E3) e estradiol-17-glucoronídeo (E2G) em mais de 50% das amostras, já o estradiol-3-sulfato (E2S) e estriol-3-sulfato (E3G) foram encontrados em pelo menos duas amostras.

Groepert, Dror e Berkowitz (2014) estudaram a detecção, destino e transporte dos estrogênios estrona (E1), 17β -estradiol (E2) e estrona-3-sulfato (E1-3S) no solo. Foram realizados testes de coluna de laboratório de pequena escala para investigar transporte e degradação do E2, e formação de E1-3S e E1. Para avaliar a influência da atividade microbiana do solo, uma porção de solo foi autoclavado e a solução de fundo tratada com azida de sódio. Os resultados demonstraram que E2 é degradado a E1 e E1-3S no solo não autoclavado, e em solo autoclavado é degradada a apenas E1. Além disso, a formação de E1-3S é impulsionada biologicamente, enquanto que, a transformação de E2 a E1 não requer interações biológicas.

Zheng e colaboradores (2013) investigaram o destino do estrogênio conjugado 17α -estradiol-3-sulfato de efluentes de laticínios e fizeram uma comparação entre a degradação aeróbia e anaeróbia e a formação de metabolito. Para avaliar os riscos potenciais, a cinética de degradação e mecanismos de 17α -estradiol-3-sulfato foram sistematicamente investigados em soluções aquosas misturadas com efluentes de laticínios. Concluíram que sob as mesmas condições de incubação, as taxas de degradação anaeróbia da 17α -estradiol-3-sulfato eram significativamente menores do que as taxas de degradação aeróbicas, sugerindo que este contaminante pode acumular-se em ambientes anaeróbicos ou anóxicos. Três produtos de degradação foram caracterizados em ambas as condições aeróbias e anaeróbias a 25°C , com estrona-3-sulfato e 17α -estradiol identificado como metabolitos primários e estrona, identificada como produto de um metabolito secundário.

Sabe-se que as concentrações dos interferentes endócrinos encontrados em ecossistemas aquáticos podem estar relacionadas às variações espaciais e sazonais. Sendo assim, durante o período chuvoso as concentrações dessas substâncias podem aumentar, por meio de lixiviação de campos agrícolas, industriais e pastagens, ou diminuir devido a diluição dos corpos d'água. Já no período de estiagem, a tendência é que as concentrações dos IEs se elevem, como consequência da diminuição dos níveis de água de rios e lagos.

Embora a situação prevista fosse que em dezembro de 2015, o volume de água do Lago de Furnas estivesse alto devido ao período chuvoso e durante os meses de abril e maio devido a estiagem esse volume decaísse, foi vivenciado uma situação contrária, a escassez de chuva decorrente do ano de 2015 impediu que o volume de água aumentasse e esse aumento só pôde ser observado a partir de janeiro de 2016 (Figura 4.25).

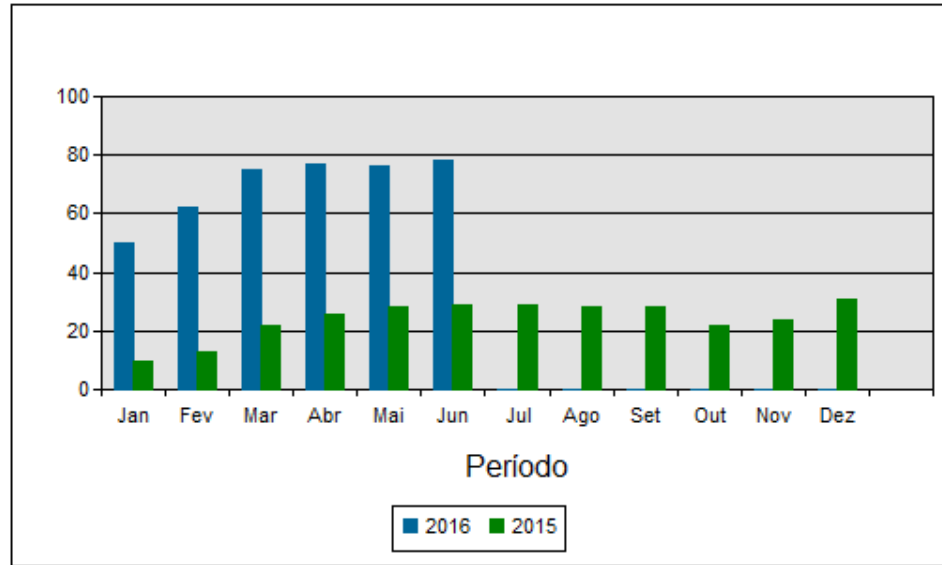


Figura 4.25: Gráfico referente ao volume útil de água do Lago de Furnas nos anos de 2015 e 2016

Fonte: ONS-Operador Nacional do Sistema Elétrico.

Observando a Figura 4.25, percebe-se que não foi possível encontrar uma relação significativa entre o volume útil de água do Lago de Furnas com as concentrações encontradas para os estrogênios em estudo.

Como descrito anteriormente, na amostragem 1 (dezembro) o baixo volume de precipitação impediu que o nível de água do Lago de Furnas aumentasse. Esse fato pode ter influenciado nas altas concentrações encontradas para estriol, 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol.

A amostragem 3, efetuada no mês de abril apresentou concentrações mais elevadas para E3, E2 e EE2. Isso pode estar relacionado ao fato de ter sido o mês com o menor valor de precipitação. Em contra partida, no mês de maio (amostragem 5) foram encontradas as menores concentrações desses três estrogênios. Porém, ao comparar as taxas de precipitação dos meses de 2016, pressupõe-se que nas amostras coletadas no mês de março, encontrassem concentrações menores e não na amostragem realizada em maio, considerado período de estiagem. Da mesma forma, Manickum; Jhon (2014), relataram comportamento contrário ao esperado em seu estudo, pois, encontraram concentrações mais elevadas dos IEs que estavam sendo analisados em efluentes, durante a primavera (início das chuvas) do que no inverno (estiagem).

Todavia, resultados opostos foram relatados por Sodré; Locatelli; Jardim (2010), que investigaram a ocorrência de seis contaminantes emergentes em amostras de água da cidade de Campinas. Os estrogênios estrona e 17β -estradiol foram detectados apenas em amostras

coletadas durante o período de estiagem, ainda assim, em concentrações inferiores aos seus limites de quantificação.

Uma vez que o crescimento dos microrganismos depende intimamente da temperatura (CLARA et al., 2005), esperava-se que as amostras coletadas nos meses de dezembro e março (primavera e verão), apresentassem concentrações inferiores desses estrogênios em relação às amostras coletadas no mês de maio (próximo ao inverno), pois, em estações com temperaturas mais elevadas, como primavera e verão, há maior probabilidade de ocorrer a degradação desses estrogênios por meio de atividades microbianas. Porém, os resultados revelaram uma relação contrária, constando concentrações menores durante a amostragem 5 (maio) em que a temperatura média aferida foi de $24,1 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, enquanto que na amostragem 2 (março) a temperatura média foi de $28,2 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

No entanto, na literatura estão relatados resultados esperados para essas mudanças de temperaturas. Nie et al (2012) averiguaram em seu estudo que as concentrações de E2, E3 e EE2 na fase sólida da lama de retorno da ETE, foram maiores na estação do inverno e menores na primavera e a situação contrária a essa aconteceu apenas para E1. Esse fato foi estreitamente relacionado com a baixa atividade microbiana e a concentração de licor de sólidos suspensos mistos. Os autores também analisaram amostras de efluente e afluente, nas quais as concentrações de E1 e E2 foram muito superiores no efluente durante o inverno. Além disso, notou-se que no verão, foi atingido percentuais elevados de remoção para os seis IEs em estudo, devido à alta taxa de biodegradação que essas substâncias apresentaram nessa estação do ano.

Chen et al. (2010), no sul de Taiwan analisaram amostras de águas de descargas de um confinamento de animais. Os resultados mostraram que as concentrações de E1, E2 e E3 foram mais elevadas no inverno do que na primavera, exceto as concentrações de E1 e E3 em um dos pontos de amostragens. Possivelmente pelo fato desse ponto estar localizado próximo a uma via aquática, podendo ter a interferência de diferentes fontes de águas. Os autores acreditam que, as altas concentrações encontradas estão relacionadas a pequena diluição devido à baixa pluviosidade no período estudado, além da reduzida atividade microbiana e menor capacidade de degradação desses estrogênios. Durante o inverno, houve menos chuvas (0,5 mm total) e uma temperatura média baixa ($20,6^{\circ}\text{C}$). No entanto, na primavera, a temperatura média foi maior ($26,9^{\circ}\text{C}$), assim como o total de precipitação (109 mm). Portanto, pode-se inferir que, as alterações de temperatura de aproximadamente 5°C , teve um efeito estatisticamente significativo sobre os resultados obtidos.

Essa relação poderá variar sempre, pois, cada vez mais, os períodos chuvosos/estiagem e as estações do ano, estão menos definidas como consequência dos diversos impactos ambientais que o planeta Terra têm sofrido (STEFFEN et al., 2015).

Diante os resultados apresentados, pode-se inferir que as concentrações encontradas para os estrogênios estriol, 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol são altas, porém, em vários estudos reportados na literatura científica os mesmos já foram detectados em concentrações superiores. Tais concentrações determinadas pelo corrente estudo, podem estar intimamente relacionadas ao fato do despejo de esgoto bruto nessa região do Lago, uma vez que, os pontos de coleta estão localizados próximo à ETE de Alfenas. No ano de 2014 (janeiro), a mortalidade de tilápias foi registrada duas vezes na mesma área do Lago em um intervalo de uma semana. De acordo com professores das Universidades da cidade, esse ocorrido pode estar associado a falta de oxigenação da água e ao baixo volume e qualidade (contaminação) da água que entra pelos córregos próximos a essa região da represa (Jornal Alfenas Hoje, 2013). Além disso, segundo uma pesquisa realizada no ano de 2013 pela Epamig (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais), Alfenas é o município banhado pelo Lago de Furnas que apresenta o maior índice de poluição devido aos despejos de esgoto *in natura* (sem tratamento).

5- CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

A metodologia analítica validada para o monitoramento de estrona (E1), estriol (E3), 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2), se mostrou adequada de acordo com as figuras de mérito avaliadas. Diante das respostas obtidas com o detector por fluorescência (FLD) tais como, alta sensibilidade, valores ótimos de recuperação dos analitos e baixos LQ e LD optou-se por trabalhar com o mesmo para detecção dos estrogênios E3, E2 e EE2. Foi utilizado o detector por ultravioleta com arranjo de diodos (DAD) apenas para detecção da E1, uma vez que, esse estrogênio não foi detectado por FLD utilizando a metodologia validada.

A utilização de métodos quimiométricos para a realização do planejamento de experimentos e tratamento dos dados se mostrou eficiente, fornecendo informações úteis para a execução dos experimentos mais relevantes para os níveis e fatores determinados. Diante disso e da análise das curvas de superfícies de resposta geradas, foi possível determinar o experimento com melhor desempenho para extrair os quatro estrogênios em estudo.

Devido os custos dos cartuchos de extração em fase sólida tentou reutilizá-los, para tal, foram condicionados e estocados com solventes apropriados. Após os procedimentos de fortificação e extração das amostras de água, obteve valores de recuperação inferiores ao intervalo aceitável para análise de amostras de água em concentrações de ng.L⁻¹. Diante disso, concluiu-se que as tentativas de reutilização dos cartuchos não foram bem sucedidas.

As cinco campanhas de amostragens foram realizadas entre os meses de dezembro de 2015 e maio de 2016, em 5 pontos diferentes de coleta. De modo geral, todos os estrogênios, exceto E1, foram encontrados em todas as amostragens em pelo menos um dos pontos de coleta. As concentrações para E3, E2 e EE2 variaram de 11-366, 75-9998 e 63-422 ng.L⁻¹, respectivamente.

Diante dos resultados obtidos torna-se necessário realizar novas amostragens e aprofundar os estudos acerca desse tema. Além disso, seria interessante o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a determinação desses estrogênios em sua forma conjugada. Outros contaminantes emergentes também podem ser analisados tanto na região de estudo como em outras partes do Lago de Furnas, uma vez que, esse assunto foi pouco explorado pela comunidade científica até o presente momento.

REFERÊNCIAS

- ALVES, E. C. et al. Avaliação da qualidade da água da bacia do rio Pirapó – Maringá, Estado do Paraná, por meio de parâmetros físicos, químicos e microbiológicos. **Acta Science Technology**, v. 30, n. 1, p. 39-48, 2008.
- AMARANTE, O. P. J. et al. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Caderno de Pesquisa**, v. 12, n. 1/2, p. 116-131, 2001.
- ANA. Agência Nacional de Água. BOLETIM DE MONITORAMENTO DO RESERVATÓRIO DE FURNAS. Brasília, v. 3, n. 2, p. 1-13, dez. 2015.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003.
- AQUINO, S. F. DE; BRANDIT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. DE L. Removal of pharmaceuticals and endocrine disrupters in sewage treatment plants: literature review. **Eng. Sanit. Ambient.**, v. 18, n. 3, p. 187-2014, 2013.
- ARAÚJO, A. S. F. DE; MONTEIRO, R. T. R. BIOLOGICAL INDICATORS OF SOIL QUALITY. **Biosci. J.**, v. 23, n. 3, p. 66-75, 2007.
- ARIS, A. Z.; SHAMSUDDIN, A. S.; PRAVEENA, S. M. Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. **Environment International**, v. 69, p. 104-119, 2014.
- BACCAN, N.; ANDRADE, J. C.; GODINHO, O. E. S.; BARONE, J. S. Química Analítica Quantitativa Elementar. São Paulo: Edgard Blucher, ed. 3, p. 1-31, 2001.
- BARBOSA, A. F. et al. Solid-phase extraction system for Pb (II) ions enrichment based on multiwall carbon nanotubes coupled on-line to flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 71, p. 1512–1519, 2007.
- BAREL-COHEN, K. et al. Monitoring of natural and synthetic hormones in a polluted river. **Journal of Environmental Management**, v. 78, p. 16-23, 2006.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401-1406, 2006.
- BELHAJ, D. et al. Fate of selected estrogenic hormones in an urban sewage treatment plant in Tunisia (North Africa). **Science of the Total Environment**, v. 505, p. 154–160, 2015.
- BENOTTI, M. J. et al. Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U. S. drinking water. **Environmental Science Technology**, v. 43, n. 3, p. 597-603, 2009.
- BERGAMASCO, A. M. D. D. et al. Bioluminescent yeast estrogen assay (BLYES) as a sensitive tool to monitor surface and drinking water for estrogenicity. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, p. 3288-3293, 2011.

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

BIRCH, G. F. et al. Emerging contaminants (pharmaceuticals, personal care products, a food additive and pesticides) in waters of Sydney estuary, Australia. **Marine Pollution Bulletin**, v. 97, p. 56-66, 2015.

BOLONG, N. et al. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. **Desalination**, v. 239, p. 229–246, 2009.

BORGES, K. B.; MANO, V.; PEREIRA, A. C. Introdução ao preparo de amostras. In: Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. Rio de Janeiro: LTC, cap. 1, p. 2-8, 2015.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução n. 357 de 17 de março de 2005**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3&ano=2005>>. Acesso em: 28 maio 2016.

BRITO, M. N. et al. AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO E DA PRECISÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS MEDIANTE ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 12, p. 155-168, 2002.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BROSSA, L.; MARCÉ, R. M.; BORRUL, F.; POCURRUL, E. Application of on-line Solid-Phase Extraction-Gas Chromatography- Mass Spectrometry to the Determination of Endocrine Disruptors in Water Samples. **Journal of Chromatography A**, v. 963, p. 287-294, 2002.

BROWNE, D. J. et al. CE with a boron-doped diamond electrode for trace detection of endocrine disruptors in water samples. **Electrophoresis**, v. 34, n. 14, p. 2025-2032, 2013.

BURSCH, W. et al. Endocrine disruptors in the aquatic environment: the Austrian approach-ARCEM. **Water Science and Technology**, v. 50, n. 5, p. 293-300, 2004.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

CASTRO- CORREIA, C.; FONTOURA, M. A influência da exposição ambiental a disruptores endócrinos no crescimento e desenvolvimento de crianças e adolescentes. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, v. 10, n. 2, p. 186-192, 2015.

CHANG, H. et al. Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: Comparison to estrogens. **Water research**, v. 45, p. 732-740, 2011.

CHAVES, K. S. **Determinação dos desreguladores endócrinos bisfenol-A, β -estradiol, 17 α -etinilestradiol e estrona no Rio Paraíba do Sul. 2015**. 133 p. Dissertação (Mestre em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

CHEN, T-S. et al. High estrogen concentrations in receiving river discharge from a concentrated livestock feedlot. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 3223–3230, 2010.

CHEN, Y. et al. Review: Sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, p. 191-219, 2008.

CHEVALIER, N.; FÉNICHEL, P. Endocrine disruptors: New players in the pathophysiology of type 2 diabetes?. **Diabetes & Metabolism**, v. 41, p. 107–115, 2015.

CHONG, M. N.; JIN, B.; CHOW, C. W. K. C. Saint, Recent developments in photocatalytic water treatment technology: A review. **Water Research**, v. 44, n. 10, p. 2997-3027, 2010.

COLMAN, J. R. et al. Effects of the synthetic estrogen, 17alpha-ethinylestradiol, on aggression and courtship behavior in male zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 91, n. 4, p. 346-354, 2009.

COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. In: *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: UNICAMP, cap. 1, p. 17-45, 2006.

DANIEL, M. DA S.; LIMA, E. C. DE. Determinação simultânea de estriol, b-estradiol, 17 α -etinilestradiol e estrona empregando-se extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). **Ambiente & Água -An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 9, n. 4, p. 688-695, 2014.

DEBLONDE, T.; COSSU-LEGUILLE, C.; HARTEMANN, P. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, p. 442-448, 2011.

DIAS, A. C. V. et al. Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. 120, p. 41-47, 2015.

DOLAR, D. et al. Removal of emerging contaminants from municipal wastewater with an integrated membrane system, MBR-RO. **Journal of Hazardous Materials**, v. 239-240, p. 64-69, 2012.

DONADIO, N. M. M.; GALBIATTI, J. A.; PAULA, R. C. DE. Qualidade da água de nascentes com diferentes usos do solo na Bacia Hidrográfica do Córrego Rico, São Paulo, Brasil. **Eng. Agríc.**, v.25, n.1, p.115-125, 2005.

DUONG, C. N. et al. Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven Asian countries. **Chemosphere**, v. 78, p. 286-293, 2010.

ESPERANZA, M. et al. Fate of sex hormones in two pilot-scale municipal wastewater treatment plants: Conventional treatment. **Chemosphere**, v. 66, p. 1535–1544, 2007.

FERREIRA, A. P. Desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: Complicações ao meio ambiente. **Acta Scientiarum – Technology**, v. 35, n. 2, p. 307-316, 2013.

FERREIRA, S. L. C. et al. Review: Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, p. 79–186, 2007.

FERREIRA, S. L. C. et al. Review: Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 2–14, 2007.

G1-Sul de Minas. Duzentas toneladas de tilápias são achadas mortas no Lago de Furnas. Disponível em: <<http://g1.globo.com/mg/sul-de-minas/noticia/2016/05/mais-de-200-toneladas-de-tilapia-morta-sao-encontradas-em-lago-de-furnas.html>>. Acesso em: 27 maio 2016.

G1-Sul de Minas. Falta de sol pode ter contribuído para morte de peixes no Lago de Furnas. Disponível em: <<http://g1.globo.com/mg/sul-de-minas/noticia/2016/05/falta-de-sol-pode-ter-contribuido-para-morte-de-peixes-no-lago-de-furnas.html>>. Acesso em: 27 maio 2016.

GAVRILESCU, M. et al. Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. **New Biotechnology**, v. 32, n. 1, 2015.

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

GIMENO, S.; KOMEN, H.; GERRITSEN, A. G. M.; BOWMER, T. Feminization of young males of the common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-*tert*-pentylphenol during sexual differentiation. **Aquatic Toxicology**, v. 43, p. 77-92, 1998.

GIROTTO, G. et al. Estrógenos em água: otimização da extração em fase sólida utilizando ferramentas quimiométricas. **Eclética Química**, v. 32, n. 2, p. 61-67, 2007.

Globo Rural. Mortandade de peixes no Lago de Furnas (MG) prejudica criadores. Disponível em: <<http://globoplay.globo.com/v/2451854/>>. Acesso em: 10 junho 2016.

GOEPPERT, N.; DROR, I.; BERKOWITZ, B. Fate and transport of free and conjugated estrogens during soil passage. **Environmental Pollution**, v. 206, p. 80-87, 2015.

GOKSØYR, A. Endocrine disruptors in the marine environment: mechanisms of toxicity and their influence on reproductive process in fish. . **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 69, p. 175-184, 2006.

GOMES, R. L.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. Determination of endocrine disruptors in sewage treatment and receiving waters. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 10, p. 697-707, 2003.

GORGA, M. et al. Occurrence and spatial distribution of EDCs and related compounds in waters and sediments of Iberian rivers. **Science of the Total Environment**, v. 503-504, p. 64-86, 2015.

GORGA, M.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using

dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1295, p. 57-66, 2013.

GUEDES- ALONSO, R. et al. Liquid chromatography methodologies for the determination of steroid hormones in aquatic environmental systems. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 3-4, p. 14-27, 2014.

Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras: água, sedimentos, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – São Paulo, CETESB. Brasília, 2011.

GÜLTEKIN, I.; INCE, N. H. Synthetic endocrine disruptors in the environment and water remediation by advanced oxidation processes. **Journal of Environmental Management**, v. 85, n. 4, p. 816-832, 2007.

HAMID, H.; ESKICIOGLU, C. Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. **Water Research**, v. 46, p. 5813-5833, 2012.

HAMPL, R.; KUBÁTOVÁ, J.; STÁRKA, L. Steroids and endocrine disruptors—History, recent state of art and open questions. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 155, p. 217-223, 2014.

HERNÁNDEZ-BORGES, J. et al. Sample treatments prior to capillary electrophoresis–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1153, p. 214–226, 2007.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. Introdução às Separações Cromatográficas. In: *Princípios de Análise Instrumental*. Porto Alegre: Bookman, ed. 6, 2009. p. 776-801.

HUBER, M. M. ET AL. Oxidation of Pharmaceuticals during Ozonation and Advanced Oxidation Processes. **Environment Science Technology**, v. 37, p. 1016-1024, 2003.

HUANG, B. et al. Effects and bioaccumulation of 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol following long-term exposure in crucian carp. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 112, p. 169-176, 2015.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo demográfico de 2009. Disponível em: <<http://censo2009.ibge.gov.br/>>. Acesso em: out 2015.

IGAM. Instituto Mineiro de Gestão das Águas. Plano Diretor de Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica do Entorno do Lago de Furnas. Alfenas, abril de 2013.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos DOQ-CGCRE-008, fevereiro de 2010.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: UNICAMP, cap. 9, p. 273-397, 2006.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para preparação de Fases Sólidas. **Química Nova**, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

JARDIM, I. C. S. F. Princípios da extração em fase sólida. In: *Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos*. 1.ed. Rio de Janeiro: LTC, cap. 8, p. 64-79, 2015.

JARDIM, W. F. et al. An integrated approach to evaluate emerging contaminant in drinking water. **Separation and Purification Technology**, v. 84, p. 3-8, 2012.

JOBLING, S. et al. Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. **Environment Science Technology**, v. 32, n. 17, p. 2498–2506, 1998.

JOHNSON, A. C.; BELFROID, A.; DI CORCIA, A. Estimating Steroid estrogen Inputs into Activated Sludge Treatment Works and Observations on their 163 Removal from the Effluent. **The Science of the Total Environment**, v. 256, p. 163-173, 2000.

KABIR, E. R.; RAHMAN, M. S.; RAHMAN, I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, p. 241-258, 2015.

KHANAL, S. K. et al. Fate, transport, and biodegradation of natural estrogens in the environment and engineered systems. **Environment Science & Technology**, v. 40, n. 21, p. 6537-6546, 2006.

KIDD, K. A. et al. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 21, p. 8897–8901, 2007.

KIYMA, R.; WADA-KIYMA, Y. Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. **Environment International**, v. 83, p. 11-40, 2015.

KJELDSSEN, L. S.; BONEFELD-JØRGENSEN, E. C. Perfluorinated compounds affect the function of sex hormone receptors. **Environ Sci Pollut Res**, v. 20, p. 8031–8044, 2013.

KÖRNER, O. et al. Water temperature and concomitant waterborne ethinylestradiol exposure affects the vitellogenin expression in juvenile brown trout (*Salmo trutta*). **Aquatic Toxicology**, v. 90, p. 188-196, 2008.

KRAEMER, A. F. et al. Environmental Fate of Imidazolinone Herbicides – A Review. **Planta Daninha**, v. 27, n. 3, p. 629-639, 2009.

KUMAR, R. et al. Efficient analysis of selected estrogens using fabric phase sorptive extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1359, p. 13-25, 2014.

KUMAR, V. et al. De-conjugation behavior of conjugated estrogens in the raw sewage, activated sludge and river water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 227-228, p. 49-54, 2012.

KUMAR, V. et al. Rapid determination of free and conjugated estrogen in different water matrices by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 77, p. 1440–1446, 2009.

- KUSTER, M. et al. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). **Environment International**, v. 35, p. 997–1003, 2009.
- LAI, K. M. et al. Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. **Environment Science Technology**, v. 34, p. 3890–3894, 2000.
- LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos:Rima, 2004.
- LESKINEN, P. et al. Bioluminescent yeast assays for detecting estrogenic and androgenic activity in different matrices. **Chemosphere**, v. 61, p. 259–266, 2005.
- LI, B. Et al. Assessing estrogenic activity and reproductive toxicity of organic extracts in WWTP effluents. **Environmental toxicology and pharmacology**, n. 39, p. 942–952, 2014.
- LI, J.; JIANG, L.; LIU, X.; LV, J. Adsorption and aerobic biodegradation of four selected endocrine disrupting chemicals in soilwater system. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.76, p. 3-7, 2013.
- LIMA, D. L. D.; SCHNEIDER, R. J.; ESTEVES, V. I. Sorption behavior of EE2 on soils subjected to different long-term organic amendments. **Science of the Total Environment**, v. 423, p. 120-124, 2012.
- LINTELMANN, J. et al. Endocrine Disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). **Pure Applied Chemistry**, v. 75, n. 5, p. 631-681, 2003.
- LIU, B.; LIU, X. Direct Photolysis of Estrogens in Aqueous Solutions. **Science of the Total Environment**, v. 320, p. 269-274, 2004.
- LIU, Z. H.; KANJO, Y.; MIZUTANI, S. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment d physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: a review. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 731-748, 2009.
- LOPES, L. G. et al. ESTROGÊNIO EM ÁGUAS NATURAIS E TRATADAS DA REGIÃO DE JABOTICABAL – SÃO PAULO. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 639-643, 2010.
- LÓPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELÓ, D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 892, p. 391–406, 2000.
- LÓPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELÓ, D. Use of solid-phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water. **Journal of Chromatography A**, v. 938, p. 145–153, 2001.
- LÓPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELÓ, D.; FRESENIUS J. Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters. **Analytical Chemistry**, n. 371, p. 437–447, 2001.
- MANICKUM, T.; JOHN, W. Occurrence, fate and environmental risk assessment of endocrine disrupting compounds at the wastewater treatment works in Pietermaritzburg (South Africa). **Science of the Total Environment**, v. 468–469, p. 584–597, 2014.

MARCOUX, M. A.; MATIAS, M.; OLIVER, F.; KECK, G. Review and prospect of emerging contaminants in waste – Key issues and challenges linked to their presence in waste treatment schemes: General aspects and focus on nanoparticles. **Waste Management**, v. 33, p. 2147-2156, 2013.

MATOZZO, V. et al. Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. **Environment International**, v. 34, p. 531–545, 2008.

MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Spatial and Seasonal Variations of Pharmaceuticals and Endocrine Disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil). **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1452-1462, 2011.

MONTEIRO, B. R.; ANDRADE, S. J. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação dos hormônios sintéticos 17α -etinilestradiol e levonorgestrel em águas superficiais. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 2, p. 391-400, 2015.

MOREIRA, D. S. et al. Occurrence of endocrine disrupting compounds in water sources of Belo Horizonte Metropolitan Area, Brazil. **Environmental Technology**, v. 30, n. 10, p. 1041–1049, 2009.

NIE, Y.; QIANG, Z.; ZHANG, H.; BEN, W. Fate and seasonal variation of endocrine-disrupting chemicals in a sewage treatment plant with A/A/O process. **Separation and Purification Technology**, v. 84, p. 9–15, 2012.

NGHIEM, L.D.; MANIS, A.; SOLDENHOFF, K.; SCHÄFER, A. I. Estrogenic hormone removal from wastewater using NF/RO membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 242, p. 37–45, 2004.

NOPPE, H.; LE BIZEC, B.; VERHEYDEN, K.; DE BRABANDER, H. F. Novel analytical methods for the determination of steroid hormones in edible matrices. **Analytica Chimica Acta**, v. 611, p. 1-16, 2008.

OLIVEIRA, M. A. L. DE. et al. Planejamento de experimentos aplicado ao preparo de amostras. In: Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. Rio de Janeiro: LTC, cap. 4, p. 19-27, 2015.

ONS. Operador Nacional do Sistema Elétrico. Disponível em: <http://www.ons.org.br/historico/percentual_volume_util_out.aspx>. Acesso em: 30 junho 2016.

PENU, R. et al. Graphene and gold nanoparticles based reagentless biodevice for phenolic endocrine disruptors monitoring. **Microchemical Journal**, v. 121, p. 130-135, 2015.

PÉREZ, R. L.; ESCANDAR, G. M. Multivariate calibration-assisted high-performance liquid chromatography with dual UV and fluorimetric detection for the analysis of natural and synthetic sex hormones in environmental waters and sediments. **Environmental Pollution**, v. 209, p. 114-122, 2016.

PESSOA, G. P. et al. DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA AVALIAR REMOÇÃO DE ESTROGÊNIOS EM ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTOS. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 968-973, 2012.

PESSOA, G. P. et al. Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 490, p. 288-295, 2014.

PETROVIĆ, M.; GONZALEZ, S.; BARCELÓ, D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **Trends in Analytical Chemistry**, v.22, p. 685-696, 2003.

PRADO, P. S.; SOUZA, C. C.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Reproductive disruption in lambari *Astyanax fasciatus* from a Southeastern Brazilian reservoir. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1879–1887, 2011.

PRATER, J. R.; HORTON, R.; THOMPSON, M. L. Reduction of estrone to 17 β -estradiol in the presence of swine manure colloids. **Chemosphere**, v.119, p. 642-645, 2015.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n.1, p. 68-76, 2001.

RACZ, L. A. R.; GOEL, K. Fate and removal of estrogens in municipal wastewater. **Journal of Environmental Monitoring**, n. 12, p. 58-70, 2010.

REIS FILHO, R. W.; ARAÚJO, J. C. DE; VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 817-822, 2006.

RIBANI, M. COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. G. Desenvolvimento e validação de método para separação de isoflavonas em extrato seco de soja. **Ciência e Natura**, v. 36, p. 501-510, 2014.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RICHTER, C. A. et al. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. **Reproductive Toxicology**, v. 24, p. 199-224, 2007.

SAARISTO, M. et al. Sand goby (*Pomatoschistus minutus*) males exposed to an endocrine disrupting chemical fail in nest and mate competition. *Hormones and Behavior*, v. 56, p. 315-321, 2009.

SAARISTO, M. et al. Exposure to 17 α -ethinyl estradiol impairs courtship and aggressive behavior of male sand gobies (*Pomatoschistus minutus*). **Chemosphere**, v. 79, p. 541-546, 2010.

SABESP. COMPANHIA DE SANEAMENTO BÁSICO DO ESTADO DE SÃO PAULO. Água no planeta. disponível em:

< <http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaoId=97>>. Acesso em: set 2015.

SHIN, H-S.; SHIN, S. K.; OH, J-A. Sensitive Determination of Natural and Synthetic Steroidal Hormones of a Free and Conjugated Form in Surface Water by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v. 32, n. 3, p. 809- 814, 2011.

SILVA, C. P.; OTERO, M.; ESTEVES, V. Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review. **Environmental Pollution**, v.165, p. 38-58, 2012.

SILVA, D. P.; MELO, C. F.; OLIVEIRA, J. L. M. Avaliação “in vitro” da desregulação estrogênica causada por poluentes orgânicos. **Saúde & ambiente em revista**, v. 2, n. 2, p. 82-91, 2007.

SILVA, R. B. et al. Preparation and characterization of a new HPLC C18 reversed phase containing thiocarbamate groups. **Microchemical Journal**, v. 82, p. 150–158, 2006.

SMITH, R. M. Review: Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. **Journal of Chromatography A**, v.1000, p. 3–27, 2003.

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

SOLÉ, M.; PORTE, C.; BARCELÓ, D. Analysis of the estrogenic activity of sewage treatment works and receiving waters using vitellogenin induction in *øsh* as a biomarker. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 9, p. 518-525, 2001.

SORENSEN, J. P. R. et al. Emerging contaminants in urban groundwater sources in Africa. **Water research**, v. 7 2, p. 51-6 3, 2015.

SOTO, A. M. et al. Androgenic and Estrogenic Activity in Water Bodies Receiving Cattle Feedlot Effluent in Eastern Nebraska, USA. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 3, p. 346-352, 2004.

SOVERCHIA, L. et al. Modulation of vitellogenin synthesis through estrogen receptor beta-1 in goldfish (*Carassius auratus*) juveniles exposed to 17 β -estradiol and nonylphenol. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 209, p. 236-243, 2005.

STEFFEN, W. et al. Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. **Science**, v. 347, p. 1-17, 2015.

STUMPE, B., MARSCHNER, B. Factors controlling the biodegradation of 17 β -estradiol, estrone and 17 α -ethinylestradiol in different natural soils. **Chemosphere**, v. 74, p. 556-562, 2009.

SWEDENBORG, E. et al. Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 43, p. 1–10, 2009.

TOMŠÍKOVÁ, H. et al. High-sensitivity analysis of female-steroid hormones in environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 34, p. 35-58, 2012.

TRENHOLM, R. A. et al. Broad range analysis of endocrine disruptors and pharmaceuticals using gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Chemosphere**, v. 65, p. 1990–1998, 2006.

VAN DER BURG, B. et al. Optimization and prevalidation of the in vitro ER α CALUX method to test estrogenic and antiestrogenic activity of compounds. **Reproductive Toxicology**, n. 30, p. 73–80, 2010.

VANDENBERG, L. N. et al. Bisphenol-A and the Great divide: A Review of Controversies in the Field of Endocrine Disruptors. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 1, p. 75-95, 2009.

VASCONCELOS, V. DE M. M., SOUZA, C. F. Caracterização dos parâmetros de qualidade da água do manancial Utinga, Belém, PA, Brasil. **Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 6, n. 2, p. 305-324, 2011.

VASCONCELOS, Y. Levedura Luminescente. Revista Pesquisa FAPESP, ed. 193, p.69-71, março, 2012.

VULLIET, E.; WIEST, L.; BAUDOT, R.; GRENIER-LOUSTALOT, M. F. Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1210, p. 84–91, 2008.

YAMAMOTO, H. et al. Effects of physical – chemical characteristics on the sorption of selected endocrine disruptors by dissolved organic matter surrogates. **Environment Science & Technology**, v. 37, n. 12, p. 2646-2657, 2003.

YING, G. G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y. J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. **Environment International**, v. 28, n. 6, p. 545-551, 2002.

ZENG, Q.; LI, Y.; GU, G. Nitrate-dependent degradation of 17 α -ethinylestradiol by acclimated activated sludge under anaerobic conditions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, p. 1841-1847, 2009.

ZHANG, J. et al. Study on the sorption behaviour of estrone on marine sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v.76, p. 220–226, 2013.

ZHAO, J-L. et al. Estrogenic activity and identification of potential xenoestrogens in a coking wastewater treatment plant. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 112, p. 238–246, 2015.

ZHENG, W. et al. Fate of estrogen conjugate 17 α -estradiol-3-sulfate in dairy wastewater: Comparison of aerobic and anaerobic degradation and metabolite formation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 258-259, p. 109–115, 2013.