



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE INTERFERENTES ENDÓCRINOS: APLICAÇÃO EM
AMOSTRAS DE ÁGUA DA BAÍA DE TODOS OS SANTOS, BA.**

NORMANDO DA SILVA LISBOA FILHO

Salvador

2012

NORMANDO DA SILVA LISBOA FILHO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE INTERFERENTES ENDÓCRINOS: APLICAÇÃO EM
AMOSTRAS DE ÁGUA DA BAÍA DE TODOS OS SANTOS, BA.**

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-graduação em química da Universidade
Federal da Bahia, para obtenção do
título de Mestre em química.

Área de concentração: química analítica

Orientador(a): Prof^a Dr^a. Vanessa Hatje

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Gisele Olímpio da Rocha

Salvador

2012

Sistema de Bibliotecas – IQ/UFBA

Lisboa Filho, Normando da Silva

Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de interferentes endócrinos: aplicação em amostras da água da Baía de Todos os Santos, Ba. / Normando da Silva Lisboa Filho. - 2012.

85 f. : il

Orientadora: Profª. Drª. Vanessa Hatje.

Co- orientadora: Profª Drª Gisele Olímpio da Rocha.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2012.

1. Água do mar - Todos os Santos, Baía de (BA). 2. Água - Poluição - Todos os Santos, Baía de (BA)
. 3. Interferentes endócrinos. 4. Cromatografia líquida. I. Hatje, Vanessa. II. Rocha, Gisele Olímpio da. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. III. Título.

CDD - 363.7394

CDU - 543.544.5:502.5(26)

Agradecimentos

À professora doutora Vanessa Hatje, pela orientação, confiança e ensinamentos, juntamente com a professora doutora Gisele Olímpio da Rocha, pelo apoio essencial na co-orientação deste trabalho.

Ao professor doutor Jailson Bittencourt de Andrade pela disponibilização do cromatógrafo líquido ultra rápido e outros materiais pertencentes ao laboratório de pesquisa em química, LPQ.

À Cristiane Fahning pela colaboração conjunta em todos os momentos deste trabalho.

A Jeancarlo Pereira dos Anjos, pelo trabalho conjunto no cromatógrafo líquido, e pelas orientações valiosas sobre validação de métodos cromatográficos.

A Gabriel Cotrim pela construção do sistema de pré-concentração e por todo o auxílio no manuseio e manutenção deste sistema.

A Luisa pelo apoio primordial nas coletas da BTS.

À Universidade Federal da Bahia e ao Instituto de Química pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Instituto de Química da UFBA, pelos ensinamentos e amizade ao longo do curso.

Aos amigos do laboratório de oceanografia química e do Cienam: Gilmara Eça, Adriele Leite, Adriane Rangel, Luanna Maia, Manuel Macedo pelo companheirismo, amizade e valiosas contribuições.

À CAPES pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Este trabalho é dedicado a Rosemeire Araújo e Normando Lisboa, meus pais.

“A ciência não é uma ilusão, mas seria uma ilusão acreditar que poderemos encontrar noutro lugar o que ela não nos pode dar”

Sigmund Freud

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um procedimento analítico empregado Cromatografia Líquida Ultra Rápida acoplada a Detector de Fluorescência (UFLC-FLU) para determinação de interferentes endócrinos (IEs; bisfenol A (BPA), 4-nonilfenol (4NP), 4-octifenol (4OP), 4-t-octifenol (4TOP), estriol (E3), estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e 17 α -etinilestradiol (EE2)) em água do mar. Foi utilizado um sistema de pré-concentração em fase sólida (cartucho SPE com fase estacionária C18) para extração e pré-concentração dos IE em as amostras de água do mar. A separação foi otimizada e realizada em um tempo total de corrida de 10 min, em uma coluna cromatográfica Shim-pack XR-ODS C-18 (2,0 mm ID x 50 mm), com a fase móvel de acetonitrila e água ultra pura com gradiente de eluição. A vazão foi de 0,12 mL min⁻¹, a temperatura da coluna foi mantida em 60°C e os comprimentos de onda de emissão e excitação foram de 306 nm e 280 nm, respectivamente. O método validado foi aplicado em amostras de água coletadas na Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil. As amostras foram coletadas na Baía da Ribeira, Feira do São Joaquim, Santo Amaro da Purificação, São Francisco do Conde, Cachoeira e Acupe. As recuperações para o IE variaram entre 84,9% (para o composto 4nOP) e 104% (para o composto 4nNP), e a repetibilidade foi adequada (RSD < 4,5%). Os limites de detecção e quantificação encontrados para os compostos estudados variaram de 4 a 27 $\mu\text{g L}^{-1}$ e de 19 a 185 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente para o método cromatográfico. Considerando o fator de concentração de 2000 vezes, o LD e LQ variaram de 2 a 23 ng L⁻¹ e de 9 a 96 ng L⁻¹, respectivamente quando calculados para amostra real. Foi observada a ocorrência dos seguintes IE nas amostras reais: bisfenol A (BPA), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3) e 4-nonilfenol (4NOP) em concentrações que variaram de 5 ng L⁻¹ em Santo Amaro a 18,3 ng L⁻¹ em Cachoeira para o E2, 20 ng L⁻¹ do 4NOP na Ribeira a 135 ng L⁻¹ no estuário do Rio Subaé (Santo Amaro), sendo o 4NOP o contaminante onipresente nas amostras analisadas. A concentração de 38 ng L⁻¹ de E3 foi encontrada apenas nas amostras da Ribeira. A presença de BPA foi detectada em quase todas as amostras (o BPA não foi detectado na Ribeira), em níveis entre 13 ng L⁻¹ no estuário do rio Paraguaçu em Cachoeira e aproximadamente 77 ng L⁻¹ no estuário do rio Subaé. Os resultados sugerem que as regiões estudadas encontram-se possivelmente impactadas em relação os IE estudados e que as concentrações encontradas poderiam indicar possíveis danos ao ecossistema marinho local. O método analítico

empregando SPE e UFLC-FLU se mostrou eficiente na determinação dos oito compostos de interesse usando um volume de amostra de 4 litros.

Palavras-chave: Interferentes endócrinos, cromatografia líquida ultra rápida (UFLC), água do mar, Baía de Todos os Santos.

ABSTRACT

The present study proposes an analytical methodology employing C18 SPE cartridges (for samples clean-up), and a ultra-fast liquid chromatograph coupled to fluorescence detector (UFLC-FLU) for determination of the following endocrine interferings (EI): bisphenol A (BPA), 4n-nonylphenol (4NP), 4-octylphenol (4nOP), 4-t-octylphenol (4TOP), estriol (E3), estrone (E1), 17 β -estradiol (E2) and 17 α -ethynylestradiol (EE2) in sea water. The proposed method was developed, optimized and validated. Separation was done by a total running time of 10 minutes in a Shim-pack XR-ODS C-18 (2.0 mm ID x 50 mm) chromatographic column, mobile phases were acetonitrile / ultra-pure water under gradient programming; eluent flow rate at 0,12 mL min⁻¹; column temperature set at 60°C; emission wavelength of 306 nm and excitation wavelength of 280 nm. The method was validated through assessment of the following parameters: linear range, linearity, selectiveness, precision, accuracy, detection limit (LOD), quantification limit (LOQ), analysis of real samples. Real samples (marine water) were collected from Todos os Santos Bay (TSB). Sampling was done in six different sites, namely Ribeira, São Joaquim, Santo Amaro da Purificação, São Francisco do Conde, Cachoeira, and Acupe. Recoveries ranged from 84.9% (for 4nOP) to 104% (for 4nNP) and also was found a suitable repeatability (RSD <4.5%) for all considered compounds. DL and QL found were 4-27 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 19-185 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively, for the chromatographic method. Considering the concentration factor of 2000 times, the DL and QL ranged from 2 to 23 ng L⁻¹ and 9.3 to 96 ng L⁻¹, respectively, when calculated for real sea water samples. We observed the occurrence of the following EIs in real samples: bisphenol A (BPA), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3) and 4n-octifenol (4NOP) in concentrations ranging from 4.93 ng L⁻¹ in Santo Amaro to 18.3 ng L⁻¹ in Cachoeira for E2, 19.6 ng L⁻¹ in Ribeira, 4NOP to 134.6 ng L⁻¹ in the estuary of Subaé's river (Santo Amaro), and the ubiquitous contaminant in the samples was 4NOP. Concentration level of 38 ng L⁻¹ E3 was observed only in samples from Ribeira. The presence of BPA was detected in almost all samples (BPA was not detected in samples from Ribeira), at levels of 13.4 ng L⁻¹ in the estuary of the river Paraguaçu in Cachoeira, and approximately 77 ng L⁻¹ in the estuary of the river Subaé. Results suggest that regions studied are possibly impacted by the studied EIs what could indicate possible damage to the marine environment sites. The analytical method using SPE UFLC-FLU was efficient for determination of the eight analytes of this study.

Keywords: Endocrine interfering, ultra-fast liquid chromatography (UFLC), validation method,. Todos os Santos Bay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- disfunções endócrinas

Figura 2- hormônios estrogênicos: a) estrona (E1); b) estriol (E3); c) 17 β estradiol (E2); d) 17 α -etinilestradiol (EE2).

Figura 3- estrutura química dos alquilfenóis

Figura 4 - Bacia de drenagem da Baía de Todos os Santos.

Figura 5 - sistema de extração/pré-concentração

Figura 6 – cromatograma resultante da injeção padrões no método proposto por Yu et al. (2011);

Figura 7- cromatograma resultante da injeção dos padrões no método otimizado;

Figura 8 – sistema de pré-concentração adaptado;

Figura 9 - nível da salinidade no eluído do cartucho de SPE

Figura 10 - Fluxograma do preparo da amostra (água do mar) para IE por SPE-UFLC-FLU.

Figura 11 - cromatograma água do mar (branco) e cromatograma da amostra fortificada da mistura dos IEs.

Figura 12 - curvas analíticas para os IE (A-estriol, B-BPA, C-17 β -estradiol, D- 17 α -etinilestradiol, E- estrona, F-4t-octilfenol, G-4n-octilfenol, H- 4n-nonilfenol)

Figura 13 - cromatogramas amostras coletadas na BTS.

Figura 14 - cromatogramas amostras coletadas na BTS.

Figura 15 - concentrações dos IE em ng L⁻¹, detectados na BTS.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- excreção diária (μg) estrogênios por seres humanos.

Tabela 2- Comparação entre curvas analíticas para os padrões em água do mar e metanol.

Tabela 3- Algumas figuras de mérito para o método cromatográfico otimizado.

Tabela 4- Limite de detecção e limite de quantificação para os IE no método cromatográfico e amostras de água do mar.

Tabela 5- Teste de repetibilidade, dentro de um mesmo dia, do método cromatográfico para os IEs

Tabela 6- Teste de repetibilidade, entre dias diferentes, do método cromatográfico para os IEs.

Tabela 7- Recuperação média (%) das fortificações e RSD para as concentrações de 25, 100 e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ determinados por UFLC-FLU.

Tabela 8- Estudo de variabilidade entre triplicatas de amostras independentes coletadas na Baía de Todos os Santos.

Tabela 9 - Concentrações de IE encontradas nas amostras de água da Baía de Todos os Santos e em outras regiões do mundo.

LISTA DE SIGLAS

CE - Contaminantes emergentes

IE - Interferentes endócrinos

APE - Alquilfenóis polietoxilados

HPA - Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

BPC - Bifenilas policloradas

E1 - Estrona

E2 - 17 β estradiol

EE2 - 17 α -etinilestradiol

E3 - Estriol

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

BPA - Bisfenol A

4nOP - 4n-octilfenol

4nNP - 4n-nonilfenol

Kow - Coeficiente de partição octanol/água

DEHP - Di-(2-etil-hexil) ftalato

PVC - Cloreto de polivinila

DMP - dimetil ftalato

DEP - dietil ftalato

DIDP - diisodecil ftalato

DINP - diisononil ftalato

DnBP - Di-n-butil ftalato

DIBP - Di-iso-butilftalato

DnOP - N-octil ftalato

SDME - Single drop microextraction

SPE - Solid phase extraction

CG - Cromatografia gasosa

RSD - Desvio padrão relativo

CV - Coeficiente de variação

LD - limite de detecção

LQ - Limite de quantificação

MS - detector de massas

FLU - detector de fluorescência

ACN - Acetonitrila

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE SIGLAS	
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 PRINCIPAIS ESPÉCIES DE IES	21
2.1.1 HORMÔNIOS NATURAIS E ARTIFICIAIS	21
2.1.2 ALGUNS INTERFERENTES DE ORIGEM INDUSTRIAL	26
2.1.3 ALQUILFENÓIS	26
2.1.4 FTALATOS	29
3. MÉTODOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DE IE EM ÁGUAS	31
4. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA	32
5. OBJETIVOS	33
6. PARTE EXPERIMENTAL	34
6.1. REAGENTES E MATERIAIS UTILIZADOS	34
6.2 PROCEDIMENTO DE DESCONTAMINAÇÃO DE VIDRARIA	35
6.3 ÁREA DE ESTUDO E COLETA DE AMOSTRAS REAIS	35
6.4 PREPARO DOS PADRÕES ANALÍTICOS E PREPARO DE AMOSTRA	37
6.5 DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE IE POR UFLC-FLUORESCÊNCIA	38
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
7.1 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO	40
7.2 PREPARO DE AMOSTRAS	44
7.3 VALIDAÇÃO DO SISTEMA ANALÍTICO	48
8. CONCLUSÕES	67
9. REFERÊNCIAS	68

1. INTRODUÇÃO

O modelo de desenvolvimento adotado pelo homem, principalmente após a Revolução Industrial até os dias de hoje, tem favorecido a ocorrência de impactos negativos no meio ambiente, muitas vezes pelo aporte de contaminantes antrópicos (compostos orgânicos e inorgânicos). Estes impactos geram problemas ambientais de extrema relevância e possivelmente irreversíveis. Um dos grandes problemas ambientais associados a este modelo sócio-econômico tem sido o aporte diário de centenas de espécies químicas nos corpos d'água superficiais. Essas espécies, supostamente, subsidiaram a melhoria da qualidade de vida da população ao longo do tempo, uma vez que estas substâncias são cotidianamente usadas para aumentar a produtividade agrícola, garantir a saúde dos animais, aumentar o tempo de vida dos seres humanos, dentre outras aplicações. Após cumprir o papel destinado a elas, parte destas substâncias e/ou seus derivados são descartadas, juntamente com os resíduos sólidos e líquidos e, potencialmente, contaminam o ambiente.

Do ponto de vista analítico, o desenvolvimento de novas técnicas de preparo e pré-concentração de amostras e as etapas posteriores de separação e identificação dessas espécies químicas (e.g. extração em fase sólida, cromatografia gasosa/espectrometria de massas) permitiu o estudo de um grande número de “novos” compostos previamente não detectados em amostras ambientais como água, ar, sedimento e amostras biológicas (RUBIO e PÉREZ-BENDITO, 2009). Estes compostos foram denominados de Contaminantes Emergentes (CE). Grande parte destes contaminantes é persistente no meio ambiente, podendo causar efeitos adversos na biota e no homem, mesmo quando ocorrem em baixas concentrações (POSTIGO et al., 2009). A toxicidade da maioria destes compostos é pouco conhecida e, de um modo geral, não existe legislação que regule o uso e a disposição destas substâncias no meio ambiente.

Dentre os CE, um grande número de substâncias químicas artificiais que são introduzidas no ambiente, assim como algumas substâncias naturais, promovem alterações ambientais e tem o potencial de perturbar o funcionamento dos organismos vivos podendo provocar inclusive alterações na saúde humana. Dentre as alterações possíveis na saúde humana, há um grupo de substâncias orgânicas que modificam o funcionamento do sistema endócrino – conhecidos como interferentes ou disruptores endócrinos. Em 1999, a União Européia publicou uma lista de 533 substâncias com evidências, ou suspeita, de apresentar efeito como interferente endócrino

(EUROPEAN UNION, 1999). Destas, 12 substâncias foram classificadas como as prioritárias para investigação de curto prazo, incluindo neste grupo os estrógenos e alquilfenóis estudados neste trabalho (Bisfenol A, 4n-octilfenol, Estrona, 4-terc-octilfenol, Estriol, β - Estradiol, 17α -etinilestradiol e 4-n-nonilfenol).

Existem algumas definições acerca dos interferentes endócrinos que serão expostas a seguir, as quais foram propostas por organismos e instituições respeitadas internacionalmente e aceitas atualmente. Em 1996, a Comissão Europeia define: Interferente endócrino é uma substância exógena que causa efeitos adversos em um organismo intacto, ou sua descendência, como consequência de alterações na função endócrina. Interferente endócrino potencial é uma substância que possui propriedades que induzem a previsão de atuação como interferente endócrino em um organismo intacto. (EUROPEAN ENVIRONMENTAL AGENCY, 1997). Já em 1997, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S. EPA) define: Interferente endócrino “é uma substância ou mistura química exógena que altera uma ou mais funções do sistema endócrino, bem como a sua estrutura, causando efeitos adversos tanto sobre um organismo e sua descendência, como em populações ou subpopulações de organismos, tendo como base estudos científicos, dados, evidências e princípios de precaução” (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1997; GHISELLI E JARDIM, 2007)

Por sua vez, em 2002, o Programa Internacional de Substâncias Químicas da Organização Mundial da Saúde (IPCS/WHO) define: 1) Interferente endócrino é uma substância exógena ou mistura que altera a(s) função (ões) do sistema endócrino e consequentemente causa efeito adverso à saúde de um organismo intacto, ou à sua descendência, ou à sub-populações 2) Interferente endócrino em potencial é uma substância exógena ou mistura que possui propriedades que podem pressupor a ação como interferente endócrino sobre um organismo intacto, ou à sua descendência, ou a subpopulações (INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 2002).

Na classe dos IE há uma ampla variedade de substâncias naturais e sintéticas (POSTIGO et al., 2009). A maioria destas substâncias são moléculas pequenas que possuem a capacidade de mimetizar, de forma antagonista ou agonista, alguns hormônios esteroidais ou da tireóide. Essas moléculas atuam estimulando a formação de receptores hormonais, bloqueando sítios receptores em uma célula, acelerando a síntese e a secreção de hormônios naturais, desativando enzimas responsáveis pela secreção de hormônios e/ou destruindo a habilidade dos hormônios em interagir com

receptores celulares (SODRÉ et al., 2007, GUISELLI e JARDIM, 2007, MARKEY et al., 2001). Esses compostos podem ter origem antrópica, i.e. gerados pela ação humana, como os xenoestrogênios, fármacos, produtos de cuidados pessoais ou descartes de origem industrial ou natural, como os fitoestrogênios.

Os compostos mais comumente reconhecidos ou classificados como IE são os alquilfenóis polietoxilados (APE), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), bifenilas policloradas (BPC), ftalatos, retardantes de chama bromados, dioxinas, furanos, herbicidas, pesticidas, drogas farmacêuticas e hormônios esteroidais (TAN et al., 2007a, TOZE, 2006, XU et al., 2006, METZLER E PFEIFFER, 2001). Alguns dos compostos que apresentam elevada atividade estrogênica incluem produtos químicos, tais como os alquilfenóis, os ftalatos e os compostos sintéticos e naturais que estão associados ao lançamento de esgotos domésticos, industriais e atividades agrícolas e/ou de carcinocultura (TAN et al., 2007b, POSTIGO et al., 2009).

As substâncias supracitadas participam dos ciclos biogeoquímicos e circulam os diversos compartimentos ambientais a partir do seu lançamento de fontes e vias distintas. Pesticidas, por exemplo, são lançados em áreas restritas a plantações. No entanto, devido ao transporte atmosférico e o escoamento superficial, estas substâncias viajam grandes distancias, potencialmente contaminando solos e recursos hídricos. Resíduos industriais, por sua vez, são lançados direta ou indiretamente no ambiente, por meio de emissões atmosféricas, descargas de resíduos líquidos e sólidos. Produtos de cuidados pessoais, fármacos, como anticoncepcionais e antibióticos e hormônios de origem natural também são lançados no ambiente por meio do esgoto doméstico e das estações de tratamento de esgoto e água. Cabe lembrar que os sistemas de tratamento de esgoto e água para a retirada de CE não é um processo totalmente eficiente, além de serem extremamente caros. Uma vez no ambiente, os CE podem seguir diferentes caminhos: i) acumulação nos compartimentos ambientais como água, solo, sedimento e biota; ii) degradação; e iii) transferência entre compartimentos (LINTELMANN et al, 2003).

A atividade estrogênica de compostos orgânicos sintéticos despertou pouco interesse da comunidade científica até a descoberta de que os pesticidas organoclorados, DDT e seus metabólitos exerciam atividade desreguladora no sistema endócrino humano (FISHER et al., 1952; BITMAN et al., 1968; BITMAN e CECIL, 1970; WRENN et al., 1970). Dentre os compostos identificados como interferentes endócrinos, os mais importantes são os hormônios naturais e artificiais devidos aos seus elevados

potenciais de desregulação endócrina e os xenobióticos estrogênicos (e.g. alquilfenóis e ftalatos) que mesmo não apresentando elevado potencial de desregulação, tratam-se de compostos importantes visto as elevadas taxas de produção e lançamento destes no meio ambiente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presença e distribuição de IE naturais e sintéticos em águas de lagoa costeira foi primeiramente investigada na Europa por *Pojana et al. em 2004*, que determinaram IE por HPLC-MS eletrospray, e posteriormente este autor expandiu as análises a sedimento e biota (*POJANA et al., 2007*) no qual determinou dez IE naturais e sintéticos por HPLC-ESI-MS, detectando IE na faixa de 2,8 a 211 ng L⁻¹ de água e 3,1- 289 µg kg⁻¹ de sedimento. Em muitos países o esgoto é descartado no meio ambiente sem nenhum tratamento. No Brasil, fontes pontuais de descartes de esgotos têm o maior impacto negativo na qualidade da água, uma vez que apenas uma pequena fração desses descartes é tratada (*MARTINS et al., 2008; COUCEIRO et al., 2007; SODRÉ et al., 2007*). De acordo com o IBGE (2008) 30,5% dos descartes municipais de esgotos vão parar em rios que são usados para suprir água potável à população. Enquanto o esgoto de áreas urbanas é a mais importante fonte de poluição em muitos países, não há informações detalhadas de como esses descartes afetam a qualidade do suprimento de água potável para as populações em termos de contaminantes orgânicos.

Estudos envolvendo IE em águas marinhas são menos freqüentes quando comparados à água doce. *Hashimoto et al., (2003)* observaram em seu trabalho que compostos interferentes endócrinos com atividade estrogênica (e.g. alquilfenóis) tem sido detectados na costa japonesa (*FUNAKOSHI et al., 2009*). Existe um consenso sobre compostos IE detectados no meio ambiente e seu potencial de causar efeitos fisiológicos deletérios em humanos e na vida animal (*SUMPTER 1998*). Interferência endócrina tem uma magnitude de mecanismos e ações, incluindo efeitos no crescimento, comportamento, reprodução, e função no sistema imune (*GRAY et al., 1997*).

A ligação entre interferentes endócrinos e problemas associados ao sucesso reprodutivo da fauna ocorreu nos anos 80, quando foi verificado que gaivotas em áreas contaminadas com DDT exibiram órgãos sexuais deformados e proporções sexuais anormais (FRY e TOONE, 1981; FRY et al., 1987). Esta foi uma das primeiras conexões entre um contaminante ambiental e impactos reprodutivos negativos via mecanismo hormonalmente mediado. Desde a sua descoberta, muitos estudos têm registrado a ação dos IE em fauna. Alguns exemplos serão discutidos abaixo.

No lago Apopka, USA, foram documentadas associações entre pesticidas organoclorados, incluindo DDT e seus metabólitos e disfunção endócrina em espécies de crocodilos (GUILLETTE et al., 1994, 1996). Estudos clássicos também mostraram a importância da disfunção endócrina em gastrópodes marinhos expostos a tributil-estanho, originados de tintas anti-incrustantes utilizadas em embarcações e marinas. Populações de gastrópodes mostraram graves declínios e desordens reprodutivas conhecidas como imposex (desenvolvimento de características sexuais masculinas em fêmeas) (GIBBS et al., 1991). Em algumas populações de anfíbios, membros supranumerários e membros amputados têm sido atribuídos à exposição dos organismos a pesticidas e outros compostos de origem antrópica (OUELLET et al., 1997; SPARLING, 2000). Em particular, concentrações traços do herbicida atrazina têm sido associadas com desregulação endócrina em sapos do meio-oeste dos Estados Unidos (HAYES et al., 2002). Produtos da degradação de surfactantes alquilfenóis polietoxilados (APE), que são contaminantes ubíquos presentes em efluentes de estações de tratamento de água, também têm mostrado efeitos estrogênicos (MUELLER e KIM 1978; WHITE et al, 1994; SNYDER et al., 2001 a). Estudos no Reino Unido e nos Estados Unidos também mostraram a influência de efluentes de estações de tratamento de água e esgoto em peixes com graves anormalidades reprodutivas (BEVANS et al., 1996; FOLMAR et al., 1996; HARRIES et al., 1997; PURDOM et al., 1994; JOBLING et al., 1998). Estas anormalidades reprodutivas incluíram mudanças nos níveis de esteróides, na histologia gonadal (ex.: hermafroditismo e intersex) e no aumento dos níveis de vitelogenina (precursor de célula-ovo) em peixes machos. Coletivamente esses impactos dos efluentes de estações de tratamento em peixes machos são referidos como feminilização, pois os peixes que são geneticamente machos exibem características sexuais femininas. Estrogênios de fontes vegetais, conhecidos como fitoestrogênios, também têm sido associados a problemas reprodutivos na fauna desde 1930 (WALKER e JANNEY, 1930; LEVIN et al., 1951; BROOKBANKS et al., 1969; METZLER e PFEIFFER, 1995;

SAFE e GAIDO, 1998). Estes efeitos foram evidenciados em ovinos de certas regiões na Nova Zelândia (MILLINGTON et al., 1964; ADAMS, 1998) e colaboradores (1987) demonstraram que a inabilidade reprodutiva de guepardos no zoológico de Cincinnati estava ligada a uma dieta rica em fitoestrogênios.

Fitoestrogênios são encontrados em uma série de suplementos medicinais, como os utilizados em terapia de reposição hormonal para mulheres em menopausa. Entretanto, visto que o uso destes muitas vezes não é regulado e a toxicidade dos compostos é desconhecida, a importância e o efeito dos fitoestrogênios na dieta humana, seja por ingestão direta de vegetais e/ou produtos vegetais e, possivelmente, por ingestão de fitoestrogênios acumulados em carnes e outros produtos alimentícios deve ser cuidadosamente avaliada.

Atividades industriais que utilizam vegetais como matéria prima, como é o caso das indústrias de polpa de papel, descartam grandes quantidades de fitoestrogênios nos recursos hídricos, potencialmente causando efeitos adversos nos sistemas. Estudos correlacionaram a presença de compostos androgênicos em efluentes, bem como a masculinização de peixes expostos a este (MUNKITTRICK et al., 1997; BORTONE e CODY, 1999; LARSSON et al., 2000; JENKINS et al., 2001).

Os impactos inesperados de IE na fauna estimularam a comunidade científica a questionar sobre os potenciais efeitos desses compostos em seres humanos (COLBORN et al., 1997). Um dos estudos sobre desregulação endócrina em humanos envolve exposição, in útero, ao potente estrogênio sintético dietilestilbestrol. A referida exposição resultou em impactos reprodutivos adversos nos embriões (HERBST et al., 1971; GILL et al., 1979). Neste caso a exposição ao dietilestilbestrol não ocorreu como contaminação ambiental, e sim na utilização de um fármaco administrado a mulheres grávidas (SOWER et al., 1983; RUMSEY e HAMMOND, 1990). Entretanto, a imprevista sensibilidade do sistema reprodutivo humano ao dietilestilbestrol demonstrou claramente que fetos e embriões humanos não são imunes à ação de compostos exógenos que agem como hormônios. O dietilestilbestrol além de ser usado como fármaco, também é aplicado na agricultura como aditivo para engorda de gado e na produção de leite. Estudos científicos têm atribuído diminuição na qualidade e quantidade do esperma humano devido à presença dos interferentes endócrinos no meio ambiente, nas últimas cinco décadas (SHARPE e SKAKKEBAEK, 1993; STONE, 1994; CARLSEN et al., 1995). Similarmente, a literatura sugere que a ocorrência de câncer na mama, testículo e próstata está relacionada à presença de interferentes

endócrinos no ambiente e nos alimentos (KRISHNAN e SAFE, 1993; AHLBORG et al., 1995; CARLSEN et al., 1995; ASHBY, 1997; EPA, 1997; GILLESBY e ZACHAREWSKI, 1998). Entretanto, a literatura ainda apresenta controversa a informação a respeito deste tópico.

Os hormônios são substâncias químicas secretadas pelas glândulas endócrinas. Estas substâncias regulam o metabolismo e a homeostase no organismo além de controlar o crescimento, o desenvolvimento, a reprodução, a manutenção dos níveis normais de glicose e íons no sangue, a pressão sanguínea e as funções do sistema nervoso (LINTELMANN et al., 2003). Os hormônios são transportados pelo corpo através da corrente sanguínea e se ligam a receptores específicos em diversos órgãos e tecidos (LINTELMANN et al., 2003). O complexo formado entre um hormônio e o seu receptor ativa as células ou funções de um órgão, dependendo do hormônio em questão. A ligação hormônio - receptor é baseada no mecanismo "chave e fechadura". Um receptor hormonal possui elevada sensibilidade e afinidade por um hormônio específico, gerando uma resposta quando exposto a concentrações de um determinado hormônio (Figura 1a). Entretanto, estes receptores hormonais também podem se ligar a outras substâncias químicas, como os IEs.

O sistema endócrino pode sofrer alterações quando um DE interage com os receptores hormonais, modificando a sua resposta natural. Dois processos distintos podem ser desencadeados, como ilustrado nas Figuras 1b e 1c.

A substância química pode se ligar ao receptor hormonal e produzir uma resposta, atuando então como um mimetizador, ou seja, imitando a ação de um determinado hormônio. Este processo é denominado de efeito agonista (Figura 1b) (GHISELLI e JARDIM, 2007).

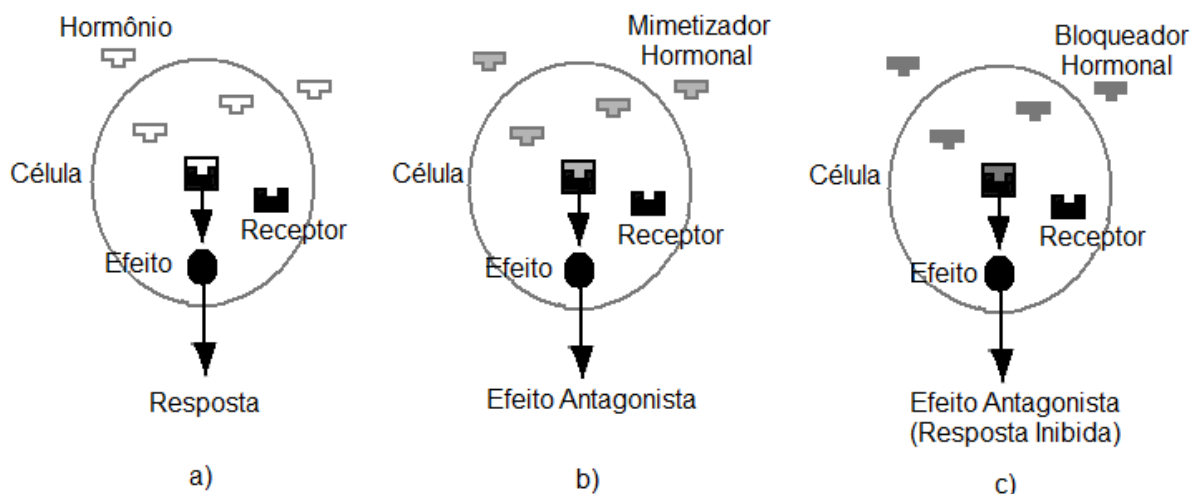


FIGURA 1. Disfunções endócrinas: a) resposta natural, b) efeito agonista, c) efeito antagonista (GHISELLI e JARDIM, 2007).

Se a substância química se ligar ao receptor, mas nenhuma resposta for produzida, ela estará agindo como um bloqueador ou inibidor, ou seja, estará impedindo a interação entre um hormônio natural e seu respectivo receptor. Este processo é denominado de efeito antagonista (Figura 1c) (GHISELLI e JARDIM, 2007).

2.1 PRINCIPAIS ESPÉCIES DE IEs

2.1.1 HORMÔNIOS NATURAIS E ARTIFICIAIS

Os primeiros estudos sobre potenciais efeitos adversos de fármacos em efluentes municipais foram realizados por *Stumm-Zollinger e Fair* em 1965 e *Tabak e Bunch* em 1970. No visionário estudo da biotransformação de hormônios estrogênicos por sedimento ativado, eles notaram que estrogênios naturais e sintéticos poderiam representar uma ameaça ecológica. Outros estudos conduzidos nos EUA durante os anos 1970 mostraram a presença de outros fármacos como ácido clofíbrico e ácido salicílico em efluentes de estações de tratamento de água (GARRISON et al., 1975; HIGNITE e AZARNOFF, 1977). Estudos posteriores mostraram que estrogênios naturais e sintéticos são contaminantes ubíquos em concentrações traços em

efluentes de estações de tratamento de água (TABAK et al., 1981; AHERNE et al., 1985; DESBROW et al., 1998; LEE e PEART, 1998; SNYDER et al., 1999; HUANG e SEDLAK, 2001). Entretanto, relatos indicam que possíveis impactos do fármaco 17 etinilestradiol (ARCAND-HOY et al., 1998) têm estimulado um aumento drástico nas pesquisas de contaminantes emergentes (HALLING-SORENSEN et al., 1998; DAUGHTON e TERNES, 1999; SNYDER et al., 2001). Uma grande variedade de fármacos tem sido classificada como contaminantes emergentes, incluindo os antibióticos, contrastes de raios X, analgésicos, antisépticos, entre outros (HALLING-SORENSEN et al., 1998; DAUGHTON E TERNES, 1999).

Dentre os hormônios sexuais, os estrógenos vêm recebendo maior atenção por serem compostos extremamente ativos biologicamente e estarem relacionados à ocorrência de vários tipos de câncer (GHISELLI e JARDIM, 2007; SCHLUSENER et al., 2005). Os estrogênios naturais fazem parte de um grupo de hormônios esteróides solúveis em gordura originados do colesterol ou da acetil coenzima A. Os estrogênios são responsáveis pelo desenvolvimento das características secundárias femininas relacionadas ao crescimento, à reprodução e ao metabolismo. Eles influenciam no desenvolvimento do sistema reprodutor feminino e masculino, nas funções das glândulas mamárias, do útero, do ovário, testículos e da próstata. Os estrogênios também desempenham um papel importante na manutenção do tecido ósseo, no sistema cardiovascular e no sistema nervoso central. São produzidos principalmente nos ovários e testículos, mas também em outras glândulas como as supra-renais (SHIMADA et al., 2001; MILLER 2009).

Testes de biodegradação em laboratório confirmaram que os estrógenos glucoronados são prontamente desconjugados em esgoto doméstico, presumivelmente devido a grande quantidade de enzimas β -gluconidase produzida pela bactéria fecal *Escherichia coli*. Dessa maneira, as ETE (estações de tratamento de esgoto) podem funcionar como um “balão de ensaio” onde os estrógenos conjugados, biologicamente inativos, são transformados nas formas não conjugadas, ativas. Assim sendo, os efluentes de ETE podem apresentar maior estrogenicidade do que os afluentes (YING et al., 2002).

Estruturalmente, os estrogênios esteróides consistem em um composto de quatro anéis: um fenol, dois ciclohexanos e um ciclopentano. Os estrogênios também são conhecidos como esteróides C18, a diferença entre os compostos está na localização dos grupos funcionais na configuração D-anel, nas posições C16 e C17. A estrona

(E1), por exemplo, possui um grupo carbonila enquanto que o estradiol apresenta um grupo hidroxila na posição C17 (Figura 2). Já o estriol apresenta dois alcoóis um no C16 e outro no C17. A hidroxila do C17 do estradiol pode estar direcionada para baixo em relação ao plano molecular, formando o 17 α -estradiol, ou para cima, formando o composto 17 β -estradiol (E2).

FIGURA 2 – Hormônios estrogênicos: a)-Estrona (E1); b) Estriol (E3); c)17 β -estradiol (E2); d) 17 α -etinilestradiol (EE2).

Os hormônios e seus metabólitos excretados através da urina e fezes seguem para a rede coletora de efluentes domésticos, adentrando depois ao ambiente. O lançamento de efluentes *in natura*, ou mesmo processados, são as principais vias de contaminação do ambiente aquático, seja pelo déficit de infra-estrutura em saneamento, seja pela ineficiência tecnológica e/ou operacional das estações de tratamento. Apesar de possuírem meia-vida relativamente curta quando comparados a outros compostos orgânicos como alguns pesticidas, os estrógenos naturais são continuamente introduzidos no ambiente, o que lhes conferem um caráter de persistência, isso é ilustrado pelos dados de excreção média diária de estrógenos naturais, apresentados na Tabela 1. Estudos relatam, ainda, que até 40% das doses ministradas de estrógenos sintéticos podem ser disponibilizadas para o ambiente (JOHNSON et al. 2000; STRECK 2009).

Os estrógenos naturais tais como o estradiol (E2) e a estrona (E1) têm solubilidade de aproximadamente 13 mg L⁻¹ em água. Estrógenos sintéticos como o 17 α -etinilestradiol (EE2) são bem menos solúveis, apresentando valores de 4,8 mg L⁻¹. Todos estes estrógenos possuem pressão de vapor muito baixa, variando de 2,3 10⁻¹⁰ a 4,5 10⁻¹¹ mm Hg, indicando baixa volatilidade. Das propriedades físico-químicas destes

estrógenos, pode-se observar que são compostos orgânicos hidrofóbicos e de baixa volatilidade (YING *et al.* 2002).

Além dos hormônios naturais, muitos fármacos possuem esteróides produzidos artificialmente em sua formulação. Os principais hormônios sintéticos incluem o 17 α -etinilestradiol (EE2) e os derivados do norgestrel. Estes compostos sintéticos são empregados no mundo todo como contraceptivos e como agentes terapêuticos de reposição hormonal (SODRÉ *et al.*, 2007, MARKEY *et al.*, 2001; PAULOS *et al.*, 2010). O sintético EE2 (17 α -etinilestradiol), supostamente, contribuem para a atividade estrogênica. Os estrogênios esteroidais (Figura 2) E1 (estrona), E2 (17 β -estradiol) e E3 (estriol), assim como o hormônio de efluentes domésticos e de estações de tratamento de água e esgoto (QUEDNOW e PÜTTMANN, 2008, TAN *et al.*, 2007a, TAN *et al.*, 2007b). Esses hormônios são encontrados no ambiente devido, principalmente, a excreção de seres vivos (humanos e fauna; Tabela 1). A tabela mostra as quantidades médias de excreção de homens e mulheres (grávidas, em menopausa e em período menstrual). Pode-se observar que a quantidade de estrogênios liberados no meio ambiente por gestantes é cerca de seis mil vezes maior para o estriol quando comparados com a excreção por mulheres em menopausa. Os valores para homens são sempre inferiores aos das mulheres, sendo que a excreção de 17 α -etinilestradiol ocorre prioritariamente em mulheres. Estrogênios naturais ou sintéticos são excretados, através da urina em suas formas biologicamente ativas (FALCONER, I. R, 2006; KUCH *et al.*, 2000; TERNES *et al.*, 1999) ou seja, como conjugados solúveis em água e, em menor proporção, por meio das fezes. Ainda é necessário lembrar que as quantidades de hormônios excretadas dependem da idade, do estado de saúde, da dieta, maturação sexual, entre outros (SODRÉ *et al.*, 2007).

Tabela 1. Excreção diária (μ g) de estrogênios por seres humanos.

Categoria	Estrona	17 β -estradiol	Estriol	17 α -Etinilestradiol
Homens	3,9	1,6	1,5	—
Mulheres em menstruação	8	3,5	4,8	—
Mulheres na menopausa	4	2,3	1	—
Mulheres em gestação	600	259	6000	—
Mulheres	—	—	—	35

Os esteroides sintéticos consistem principalmente de contraceptivos orais (hormônios inibidores da ovulação) e os esteróides usados em terapias de reposição hormonal durante a menopausa. Outras aplicações de esteróides como, por exemplo, em terapia de câncer de mama são raros e menos expressivos. Hormônios naturais como estradiol ou progesterona não são usados em aplicações orais, exceto em altas dosagens, pois são rapidamente metabolizados, desativados e excretados. Por outro lado, esteróides sintéticos são utilizados basicamente em aplicação oral. Reações de etilinação ou alquilação dos compostos naturais previnem a metabolismo e garantem o efeito desejado. Os esteróides sintéticos mais comuns são etinilestradiol e o mestranol, enquanto que os componentes progestagênicos mais usados em contraceptivos orais são o norgestrel e noretisterona (GOROG et al., 2011). Os esteroides sintéticos, apesar de apresentarem atividade estrogênica e causarem danos à saúde de animais e no homem, podem ser úteis na medicina como adjuvante nos tratamentos de doenças de cunho hormonal entre outras.

Em nível celular, os estrogênios regulam a produção e a secreção de proteínas celulares específicas e controlam a proliferação de células dos órgãos sexuais femininos. Evidências sugerem que o tempo de exposição aos estrógenos ovarianos pode ser o principal fator de risco no desenvolvimento de câncer de mama. Similarmente, a exposição excessiva do embrião durante o desenvolvimento do útero resulta em alterações irreversíveis na estrutura e no funcionamento do trato genital feminino (SODRÉ et al., 2007, MARKEY et al., 2001). Estudos clínicos e experimentais indicam que os estrógenos também têm importante papel no desenvolvimento do trato genital masculino. A exposição de homens a níveis excessivos de estrógenos resulta em diversos sintomas tais como a ginecomastia (o desenvolvimento de seios), a diminuição da libido e a impotência, enquanto níveis mais baixos de andrógenos no sangue geram a diminuição no número de espermatozoides. Dentre os estrogênios produzidos pelos seres humanos, o mais potente é o E2, seguido pelo E1 e o E3 (CARWILE et al., 2009).

Dos vários grupos de substâncias com atividade estrogênica relatada, os hormônios sexuais femininos e os esteróides sintéticos são considerados os mais problemáticos e, portanto, podem causar efeitos prejudiciais aos organismos, mesmo quando presentes em concentrações baixas como, por exemplo, em torno de 5 ng L^{-1} . Mesmo essas concentrações baixas podem resultar em uma reversão do sexo masculino para feminino em espécies de peixe como, por exemplo, caso do medaka japonês (IMAI et al., 2005). Um dos primeiros estudos correlacionando a dispersão ambiental de

estrogênios naturalmente excretados por humanos e seus efeitos ecotoxicológicos foi realizado na Inglaterra, com peixes, à jusante de pontos de lançamento de estações de tratamento de esgoto (ETEs) (LOPES et al, 2010; JOHNSON e SUMPTER, 2001). Os peixes machos produziram a proteína vitelogenina (VTG), normalmente produzida apenas por fêmeas sob a influência do hormônio estrogênico 17 β -estradiol (JOHNSON e SUMPTER, 2001). Além da feminilização de peixes machos (IMAI et al., 2005), a exposição prolongada aos estrogênios também tem sido associada com o aumento da incidência de câncer de testículos e da infertilidade masculina em seres humanos (RODRIGUEZ-MOZAZ et al., 2004). Em mulheres, as disfunções no sistema endócrino podem resultar em várias anomalias, tais como, irregularidade no ciclo menstrual, prejuízos na fertilidade, endometriose e ovários policísticos (BILA e DEZOTTI, 2007).

2.1.2 ALGUNS INTERFERENTES DE ORIGEM INDUSTRIAL

Vários compostos xenobióticos estrogênicos têm papel de destaque entre os Contaminantes Emergentes. Compostos como os alquilfenóis (e.g. bisfenol A, 4-nonilfenol e o 4-terc-octilfenol) e ftalatos, por exemplo, embora exibam um potencial estrogênico relativamente baixo, apresentam muitas aplicações em atividades industriais diversas. Estes compostos são freqüentemente encontrados em efluentes de estações de tratamento de água e em águas superficiais (QUEDNOW e PÜTTMANN, 2008, TAN et al., 2007a, TAN et al., 2007b), águas sub-superficiais (YING et al., 2008), em algas (NAKAJIMA et al., 2007, PORTE et al., 2006, LI et al., 2009), em diversos organismos marinhos (PORTE et al., 2006, RICCIARDI et al., 2008, XU et al., 2006, ISIDORI et al., 2006), em sedimentos e material particulado em suspensão (XU et al., 2006, PATROLECCO et al., 2004).

2.1.3 ALQUILFENÓIS

Alquilfenóis etoxilados (APEs) são uma classe de surfactantes manufacturados através da reação de alquilfenóis (Figura 3) com óxido de etileno. Os APEs são usados na produção de resinas fenólicas, como aditivos plásticos, emulsificantes, agentes umidificantes, agentes dispersantes, além de serem utilizados na agricultura e como

espermicidas. O principal uso dos APEs é como surfactantes não-iônicos. Em 2008 nos Estados Unidos a produção de APEs representa 14% da produção de surfactantes e 35% do total da produção de surfactantes não-iônicos (LEVINSON, 2008).

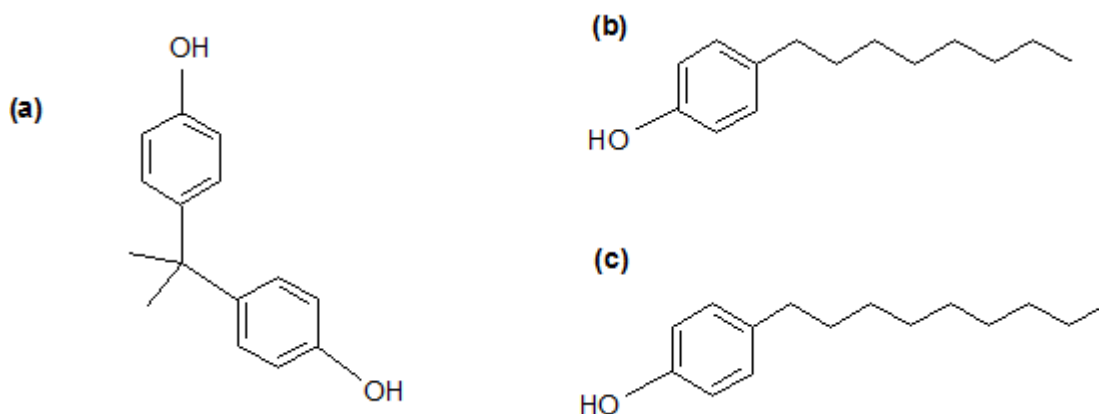


FIGURA 3. Estrutura química dos alquilfenóis: a) Bisfenol A; b) 4-n-octilfenol (4nOP); e c) 4-n-nonilfenol (4nNP).

Por sua vez, os alquilfenóis 4-n-octilfenol (4nOP) e 4-n-nonilfenol (4nNP) (Figura 3-b e 3-c) são utilizados como: i. insumos industriais para a produção de detergentes não-iônicos para uso industrial e uso doméstico; ii. plastificantes e elastômeros; iii. facilitadores do processo de polimerização do acrílico e do acetato de vinila; vi. estabilizantes do látex; v. propelentes de pesticidas (MARKEY et al., 2001).

Em estações de tratamento de água e no meio ambiente, APEs podem ser degradados microbiologicamente e metabolitos tóxicos, com maior atividade estrogênica, como o p-nonilfenol e p-nonilfenol etoxilado podem ser formados. Os produtos de degradação são mais lipofílicos e, conseqüente, mais tóxicos que os compostos pais, resultando em valores de $\log P_{ow}$ entre 3,9 e 5,99 (LINTELMANN et al., 1996). Devido a esse alto valor de coeficiente de partição octanol/água (P_{ow}), os metabólitos mostram uma tendência de bioacumulação elevada em organismos (AHEL et al., 1993; EKELUND et al., 1990). Em 1991, Soto et al. mostraram que um contaminante do poliestireno, identificado como p-nonilfenol, era capaz de promover proliferação de células cancerígenas. Os autores concluíram que o NP tem comportamento estrogênico, devido à sua capacidade de mimetizar os efeitos do estradiol em células. Experimentos com ratos tratados com p-nonilfenol mostraram que doses de 20 e 50 miligramas causam um significativo aumento no índice mitótico do endométrio (LEE e LEE, 1996). Produtos da degradação dos alquilfenóis têm se

mostrado estroginicamente ativos e capazes de se acumularem na biota (SNYDER et al., 2001). Algas, peixes, patos, lesmas e caranguejos todos acumulam o nonilfenol e derivados nos seus tecidos. (AHEL et al., 1993; EKELUND et al., 1990; KEITH et al. 2001). Alquilfenóis foram encontrados e identificados na água de produção de plataformas de petróleo, o que muito provavelmente pode contribuir para a crescente presença desta classe de compostos em águas oceânicas com possibilidade de bioacumulação e biomagnificação destes compostos na biota marinha (BOITSOV et al., 2007).

O bisfenol A (BPA; Figura 3a), pertence aos bis(hidroxifenil) metanos, sendo um dos compostos químicos mais produzidos no mundo (LINTELMANN et al., 2003). Na Alemanha, por exemplo, 210.000 toneladas foram produzidas em 1995 (RIPPEN,1998), enquanto que em todo mundo foram produzidos 640 mil toneladas em 1993 e 3 milhões de toneladas em 2010 (NEW SCIENTIST JOURNAL U.S.A, 2010). O BPA é sintetizado para diversas aplicações, sendo um intermediário na manufatura de polímeros, um componente das resinas epóxi e resinas poliéster-estireno resistentes à corrosão. Outras aplicações incluem o uso do BPA como estabilizador para plastificantes em PVC, policarbonatos, fungicida, antioxidantes e como retardantes de chama. O BPA também é utilizado como resina para preenchimento dental e na indústria de embalagens, incluindo a indústria alimentícia. Atualmente é documentado que o BPA pode migrar das embalagens para os alimentos (MARAGOU et.al., 2006). Uma vez descartado no meio ambiente, o BPA é distribuído entre ar, água, solo, sedimento e biota (NORDIC COUNCIL OF MINISTERS, 1996). Com base na sua alta solubilidade em água, baixa pressão de vapor ($5,32 \times 10^{-6}$ Pa a 25°C) e baixa constante Henry (10^{-5} - 10^{-6} Pa $\text{m}^3 \text{mol}^{-1}$), conclui-se que o BPA tem a tendência de partição em água, sendo que a taxa de evaporação do solo e água deve ser baixa. Considerando o valor $\log K_{oc}$ de 2,5 – 3,2 e o alto valor de $\log P_{ow}$ pode-se assumir que o composto é adsorvido em materiais orgânicos. O transporte do bisfenol A no meio aquático é a forma predominante de distribuição do composto entre os compartimentos ambientais.

2.1.4 FTALATOS

Ftalatos ou ésteres do ácido ftálico são compostos sintéticos que vem sendo utilizados na indústria desde os anos 1930, principalmente como plastificantes em polímeros e como aditivos de vários produtos: inseticidas, tintas, embalagens, cosméticos, coberturas de assoalho, forros, roupas ou isolantes em dispositivos elétricos. Sua produção mundial é crescente (passou de 1,8 milhões de toneladas em 1975 para 4,3 milhões toneladas em 2006), sendo um quarto deste valor representado pelo di-(2-etil-hexil)ftalato (DEHP) usado na produção de cloreto de polivinila (PVC) (DARGNAT et al., 2009, SODRÉ et al., 2007, GUISELLI e JARDIM, 2007). Os ftalatos mais comumente utilizados são o dimetilftalato (DMP), dietilftalato (DEP), di-n-butilftalato (DnBP), di-iso-butilftalato (DiBP), di-(2-etil-hexil)ftalato (DEHP) e o di-n-octil-ftalato (DnOP). Atualmente, a legislação europeia recomenda a redução do uso de ftalatos em diferentes produtos tais como cosméticos e embalagens de alimentos (DARGNAT et al., 2009). Os Estados Unidos classificam DEHP, DBP e BBP como tóxicos. Recentemente, estes foram banidos principalmente da produção de mamadeiras e brinquedos infantis. Em alguns casos, esses compostos são substituídos na indústria por DIDP e DINP que são considerados atóxicos. Entretanto, DINP e DIDP são compostos que se espalham rapidamente no meio ambiente e acumulam-se nos organismos. Por este motivo, a entrada desses compostos no ambiente deveria ser inibida. A legislação alemã sugere substituir todos os materiais que contêm ftalato, de forma gradual, por materiais livres de ftalatos, como polietileno e polipropileno, onde for possível (UNITED STATES CONSUMER PRODUCT SAFETY COMMISSION (CPSC), 2009).

A estrogenicidade de ftalatos tem sido relatada em uma série de estudos tanto *in vivo* quanto em *in vitro* (KORNER et al., 1999; PICARD et al., 2001, SUMPTER, J., 1998;). Ftalatos estão envolvidos em uma série de problemas fisiológicos associados ao sistema reprodutivo de diferentes espécies de peixes e mamíferos. Na realidade, os ftalatos usados como plastificantes, não estão quimicamente ligados às matrizes dos polímeros, assim eles podem ser facilmente mobilizados e lançados no ambiente durante sua produção, uso e disposição. Considerando as pressões de vapor relativamente altas, os ftalatos podem volatilizar para a atmosfera e sofrer transporte e acumulação em outros compartimentos como a hidrosfera e litosfera (HASHIMOTO et al., 2003).

Adicionalmente, os ftalatos se tornaram alvo de preocupações pela suspeita destes estarem causando a puberdade prematura em crianças. Foram encontradas elevadas concentrações desses compostos em brinquedos, o que estimulou a regulamentação

do uso destes em alguns países. Por exemplo, desde 1999 o uso de três ésteres de ftalatos (DEHP, DBP e BBP) em artigos infantis foi totalmente proibido na União Européia e outros três (DNIP, DIDP e di-n-octil ftalato (DNOP)) estão proibidos em artigos que podem ser colocados na boca de uma criança. No entanto, esses plastificantes continuam sendo encontrados em produtos alimentícios e hospitalares (GARTNER et al., 2009) .

Os ftalatos também têm mostrado efeitos cancerígenos mesmo em baixas concentrações (LARSEN et al., 2002; NUTI et al., 2005). O valor do LD₅₀ para ratos foi relatado em 25 g kg⁻¹. Para humanos esse valor é estimado como sendo 140 mg kg⁻¹ dia⁻¹ (Shaffer et al., 1945). Estes valores são relativamente elevados para a rotina de exposição humana a esses plastificantes. A absorção de DEHP através da pele tem sido relatada ser baixa. Nenhum estudo dérmico em humanos foram encontrados. No entanto, Barber et al., (1992) e Scott et al., (1987) em comparação da absorção in vitro de DEHP através de rato e da pele humana descobriram que a permeabilidade ao DEHP foi consideravelmente maior para a pele de rato em relação à pele humana.

As principais vias de exposição dos ftalatos para os humanos são através da: i. inalação desses compostos associados ao material particulado atmosférico; ii. ingestão direta de alimentos contaminados com estes compostos (a adição de ftalatos em alimentos é proibida, no entanto o contato com embalagens, recipientes ou mesmo ferramentas de processamento podem transferir esses contaminantes para os alimentos) e iii. contato com materiais hospitalares que contenham estes compostos.

Os dois maiores plastificantes suspeitos de serem interferentes endócrinos são DEHP e DBP. Muitos ftalatos (DnBP, DiBP e DEP) apresentam potencial de desregulação endócrina de 6 a 7 vezes menor que o 17β-estradiol (HARRIS et al., 1997). No entanto, o fato deles serem produzidos e liberados no meio ambiente em larga escala, seus potenciais efeitos adversos não podem ser desprezados. Assim como os alquilfenóis etoxilados, os ftalatos sofrem degradação no meio ambiente, gerando compostos-filhos mais tóxicos. Por exemplo, os compostos 2-etil-hexanol e 2-etil-hexanal degradados do DEHP são mais tóxicos, de acordo com modelos ecotoxicológicos para mamíferos, peixes e artrópodes (NALLI et al., 2002; HORN et al., 2004). Em estudos que buscam identificar o impacto destes compostos no ambiente, deve-se considerar a presença e toxicidade dos compostos filhos.

3. MÉTODOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DE IE EM ÁGUAS

A natureza hidrofóbica dos estrogênios, alquilfenóis, BPA e ftalatos, baseada nos coeficientes de partição entre octanol-água (K_{ow}) favorece a adsorção destes IE no material particulado em suspensão. Assim, se esses IE estiverem presentes em estações de tratamento de água ou esgoto, por exemplo, apenas uma parcela destes será removida. Se estes IE estiverem presentes em água de lagos, rios e oceanos estes tenderão a se acumular no material particulado em suspensão e/ou nos sedimentos (PORTE et al., 2006). Estes também poderão contaminar a biota (i.e. algas, organismos filtradores e peixes), podendo então biomagnificar ao longo da cadeia trófica (DARGNAT et al., 2009, LI et al., 2009; RICCIARDI et al., 2008, NAKAJIMA et al., 2007). Mesmo com essas características, uma porção dos IE permanece dissolvida na água e desta forma alcança maior distribuição nos ecossistemas aquáticos. Assim, métodos para determinação dos IE em águas superficiais não apenas fluviais, mas também nas zonas estuarinas e marinhas são imprescindíveis para melhor entender o destino, transformações, transporte e possíveis impactos destes contaminantes nos ecossistemas costeiros.

Ainda existem poucos métodos analíticos disponíveis para a extração e quantificação de IEs, visto os mesmo ocorrem em concentrações tão baixas quanto 1 ng L^{-1} de água (TAN et al., 2008). Considerando ainda a ubiquidade destes compostos, devido ao amplo espectro de suas características químicas e propriedades físico-químicas (hidrofilicidade/lipofilicidade, pressão de vapor, etc), estes compostos podem estar acumulados em diversas matrizes ambientais complexas, como água, sedimento e biota, representando um grande desafio analítico. Adicionalmente, o potencial de bioacumulação e de persistência no meio ambiente têm colocado o estudo dos interferentes endócrinos no centro das pesquisas dos CE, devido os seus possíveis efeitos na saúde humana e dos ecossistemas.

Métodos analíticos baseados em cromatografia a gás ou líquida seguidos de espectrometria de massa são os mais usados para a quantificação de micropoluentes orgânicos em água. Entretanto apesar do progresso recente, os limites de quantificação ainda são altos (i. e. $\mu\text{g L}^{-1}$). Portanto a quantificação de IE em água

requer um passo inicial de extração e pré-concentração para viabilizar a detecção de valores menores que $0,1 \text{ ng L}^{-1}$.

4. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA

Enquanto é possível encontrar em literatura diversos estudos de caracterização de interferentes endócrinos presentes em água doce e em sedimentos (principalmente de ETEs e água de rio), os dados sobre a ocorrência e o comportamento dos IE em águas estuarinas e marinhas são ainda limitados (FERGUSON et al., 2001; GARRITANO et al., 2006). Além disso, a distribuição / partição dos DE em diferentes compartimentos ou a presença em diferentes componentes de um mesmo compartimento ambiental (p. e. a partição entre água, biota, material particulado em suspensão e sedimento) ainda não são completamente entendidos (BOWMAN et al., 2002). Dados sobre a ocorrência, níveis de concentração e possíveis impactos causados por IE na costa brasileira ainda são raros ou inexistentes, justificando a necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos com limites de detecção compatíveis aos níveis de concentração dos IE no ambiente, ou seja, na ordem de poucos ng L^{-1} ou menores. Sendo os níveis ambientais dos DE tão baixos e ainda considerando-se as amostras com salinidade elevada fornecer amostras com matrizes inerentemente mais complexas do que as consideradas em estudos já publicados, depara-se com grandes desafios analíticos a serem solucionados. Somente após o desenvolvimento e validação de métodos analíticos confiáveis e robustos para esse tipo de problemas, será possível estudar mais consistentemente os aportes, distribuição, possíveis mecanismos de remoção, efeitos ecotoxicológicos dos DE no ambiente. O grupo de substâncias consideradas neste estudo são preferencialmente emitidas para o ambiente por esgoto doméstico e por efluentes industriais. Entretanto, uma parte considerável das cidades e comunidades localizadas no entorno da Baía de Todos os Santos (BTS) não possuem estação de tratamento de esgoto. Desse modo, boa parte do esgoto doméstico e de efluentes industriais são lançados para BTS sem qualquer tratamento. E é muito provável a ocorrência dos DE no esgoto não tratado e destes chegarem até as águas da BTS.

5. OBJETIVOS

Desenvolver, otimizar e validar metodologia analítica para a determinação dos seguintes interferentes endócrinos: bisfenol A, 4-n-octilfenol, 4-terc-octilfenol, 4-n-nonilfenol, estrona, , estriol, 17 β - estradiol e 17 α -etinilestradiol em amostras de água do mar por cromatografia líquida de ultra velocidade com detector de fluorescência (UFLC-FLU).

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 REAGENTES E MATERIAIS UTILIZADOS

Os padrões analíticos, solventes e demais materiais utilizados neste estudo foram:

- Acetonitrila grau cromatográfico J.T.Baker (Santa Ana, EUA);
- Metanol grau cromatográfico J.T.Baker (Santa Ana, EUA);
- Diclorometano grau cromatográfico Makron Chemicals (Charlotte, EUA);
- Água purificada em sistema MILLI-Q-PLUS MILLIPORE (Bedford, EUA);
- Hexano grau cromatográfico, J.T Baker (Santa Ana, EUA);
- Cartuchos SPE C18 (tubo de polipropileno, capacidade de 6 mL e massa de C18 de 500mg), Waters (Milford, EUA);
- Bomba de vácuo ,modelo WP6111560, Millipore (Bedford, EUA);
- Banho de ultrassom com ajuste de frequência (de 25 a 40 Hz) e ajuste de temperatura (de 30 a 100 °C) com capacidade de 5 L, ELMA (Singen, Alemanha);
- Extran detergente neutro, Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Bisfenol A 99 % de grau pureza, Sigma-Aldrich (EUA);
- 4-n-nonilfenol 99% de grau de pureza, Sigma-Aldrich (EUA);
- 4-octilfenol 99% de grau cromatográfico, Sigma-Aldrich (EUA);
- 4-terc-octilfenol 99% de grau de pureza, Sigma-Aldrich (EUA);
- Estrona 99% de grau de pureza, Sigma-Aldrich (EUA);
- 17 β -estradiol 99% de grau de pureza, Sigma-Aldrich (EUA);
- 17- α -etinilestradiol 99% grau HPLC, Sigma-Aldrich (EUA);

- Estriol 98% de grau de pureza, Sigma-Aldrich (EUA);
- As vidrarias utilizadas foram compradas da Hexis (Brasil);
- Cromatógrafo líquido ultra-rápido, (UFLC), Shimadzu, LC-20AD, com detector de fluorescência RF-20A, auto amostrador SIL20A HT. Coluna Shimadzu Zorbax XDB-C18 (50 x 2 mm), com tamanho de partícula 2,2 µm e tamanho do poro 12 nm.

6.2 PROCEDIMENTO DE DESCONTAMINAÇÃO DE VIDRARIA

Devido aos níveis reduzidos de concentrações dos compostos de interesse encontrados em ambientes aquáticos, foram adotados alguns procedimentos para minimizar possíveis contaminações originadas durante as etapas de amostragem, preservação e pré-tratamento das amostras. Todo o trabalho foi realizado em ambiente limpo, com pouca circulação de pessoas. As vidrarias utilizadas ao longo do estudo foram previamente descontaminadas por meio de banho de ultrassom com uma solução de extran 10% por 30 minutos. Em seguida, as vidrarias foram enxaguadas com água deionizada e, posteriormente, com água ultrapura. Após a secagem, em ambiente limpo e sem poeira, as mesmas foram lavadas com diclorometano. Durante todo o processo de descontaminação, a vidraria foi colocada em bandejas limpas, sendo que folhas de papel alumínio foram utilizadas para revestir o material descontaminado.

6.3 ÁREA DE ESTUDO E COLETA DE AMOSTRAS

A Baía de Todos os Santos (BTS), segunda maior baía do Brasil, está localizada a 12°50'S de latitude e 38°38'W de longitude, e possui comprimento e largura respectivamente de 32 km e 50 km (Figura 4). No seu entorno, vivem mais de três milhões de habitantes (CRA, 2008; HATJE e DE ANDRADE, 2009). Uma parte considerável dos municípios e comunidades da região não possui sistema algum (ou mesmo não possuem um sistema adequado) de tratamento de esgoto, o que inevitavelmente, ocasiona o descarte do esgoto doméstico sem tratamento para a BTS e/ou seus afluentes. A área mais urbanizada e industrializada da BTS está localizada na Região Metropolitana de Salvador (RMS).

Muitas atividades antrópicas influenciam a qualidade ambiental da BTS e de seus ecossistemas, como o aporte de efluentes domésticos e industriais (química, petroquímica, etc.), a deposição inadequada de resíduos sólidos, e as atividades agrícolas e de carcinocultura desenvolvidas na região (CRA, 2008; Hatje e DE ANDRADE, 2009). Os rios Paraguaçu, Subaé e Jaguaripe são os três maiores tributários da BTS.

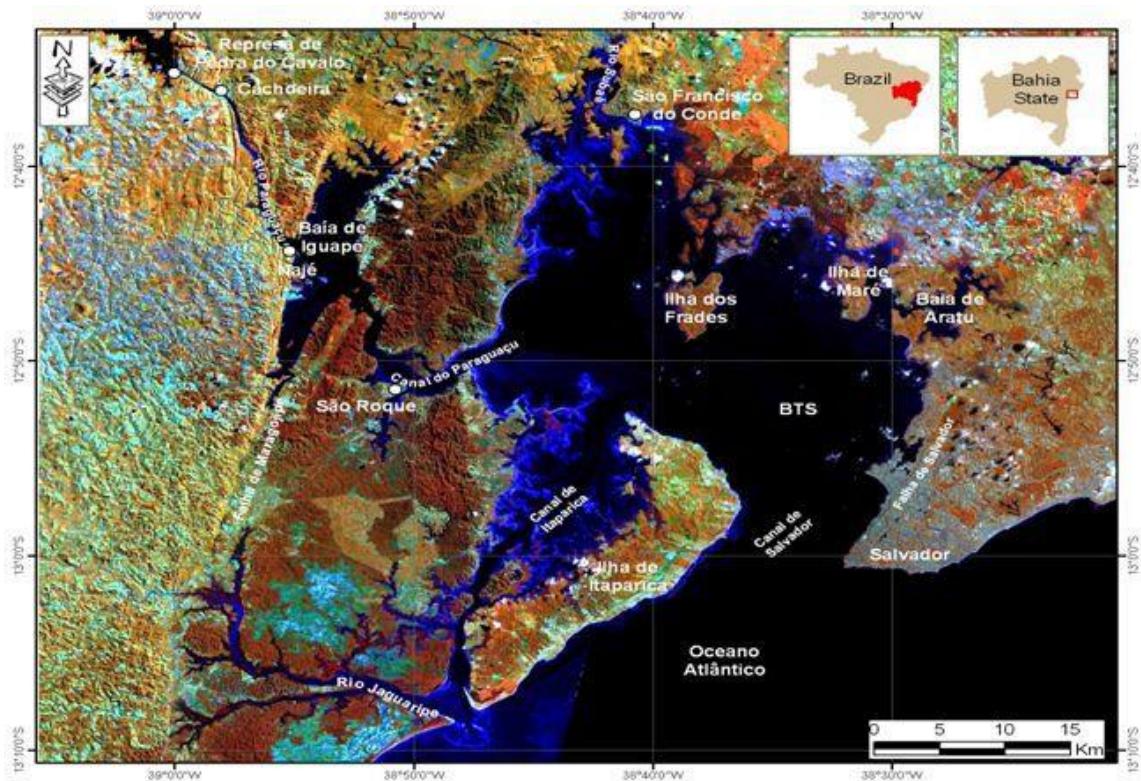


Figura 4: Bacia de drenagem da Baía de Todos os Santos, BA, Brasil [CIRANO e LESSA, 2007].

6.4 PREPARO DOS PADRÕES ANALÍTICOS E PREPARO DE AMOSTRAS REAIS

Foram preparadas soluções-estoque, em álcool metílico grau cromatográfico, com concentração de 1000 mg L^{-1} , para cada um dos compostos estudados. A solução-estoque foi utilizada para preparar as soluções-padrão, através de diluições sucessivas, para construção das curvas analíticas em concentrações que variaram de 1 a $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Após o preparo, cada solução-estoque foi filtrada utilizando membrana de acetato de celulose de $0,45 \text{ } \mu\text{m}$ (Millipore, EUA) e posteriormente injetada no sistema cromatográfico (UFLC-Flu). As curvas analíticas foram feitas utilizando o método de calibração externa, com 10 níveis diferentes de concentração ($1\text{-}200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) das soluções-padrão para todos os analitos, exceto para a estrona que foi considerado 12 níveis diferentes de concentração de sua solução-padrão, variando de $1\text{-}2000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

As amostras reais, imediatamente após a chegada ao laboratório, foram filtradas em membrana de acetato de celulose de $0,45 \text{ } \mu\text{m}$ (Millipore, EUA) para a retirada do material particulado em suspensão. Em seguida, os 4 litros de água foram pré-concentrados e extraídos utilizando a técnica de extração em fase sólida (SPE), utilizando cartuchos preenchidos com resina C18, em sistema de filtração e pré-concentração adaptado de *Sodré et al. (2010)* (figura 5). O sistema de filtração e pré-concentração utilizado foi baseado no sistema desenvolvido por *Sodré et al (2010)*, em que foram feitas modificações / adaptações no desenvolvimento do presente estudo. O sistema de pré-concentração utilizado favorece a acumulação dos analitos de interesse, que tem afinidade com o substrato contido no cartucho adsorvente de C18 e, ainda, possibilita a extração dos analitos, concentrando-os em um pequeno volume de amostra.

Após as diluições convenientes para o preparo das soluções-padrão e o preparo das amostras, os mesmos foram injetados em sistema de UPLC-Fluorescência. As injeções foram realizadas em triplicata e a identidade dos analitos foi tentativamente encontrada pela comparação dos tempos de retenção (t_r) dos picos das amostras e dos analitos das soluções-padrão.

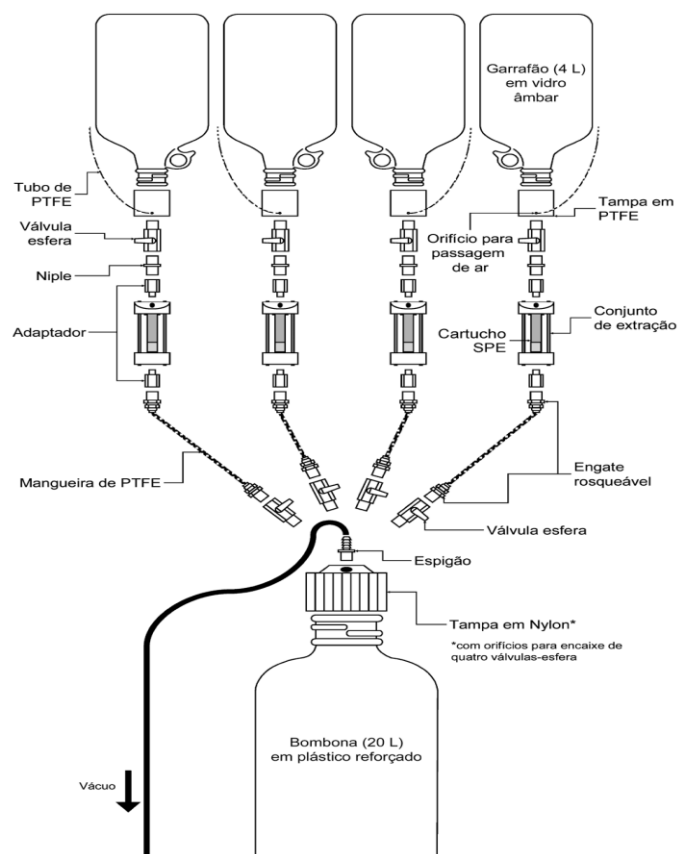


FIGURA 5: Sistema completo empregado para extração em fase sólida de contaminantes emergentes (CEs) em amostras de águas naturais. (SODRÉ et al., 2010)

6.5 DESENVOLVIMENTO, OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE IE POR UFLC-FLUORESCÊNCIA

Foi utilizado um Cromatógrafo Líquido Ultra Rápido (UFLC) modelo Shimadzu LC-20AD Prominence, equipado com duas bombas de alta pressão (modelo LC-6AD), detector de fluorescência (FLU; modelo RF-20A), degaseificador (modelo DGU-20A3), uma interface modelo (CBM-20 A) e injetor automático com auto-amostrador modelo SIL-20A HT. As separações foram realizadas empregando-se uma coluna Shimadzu – Zorbax Eclipse XDB-C18 (50 x 2 mm), com tamanho de partícula 2,2 μm e tamanho do poro 12 nm.

Os primeiros testes deste estudo foram baseados nas condições cromatográficas propostas por Yu et al. (2011), o qual desenvolveu e validou uma metodologia para a

determinação de diversos grupos de fármacos, hormônios esteróides e produtos de cuidados pessoais em amostras de sedimento fluvial. Neste método, os compostos foram determinados por UHPLC-MS/MS. A separação cromatográfica foi realizada numa coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 (50 mm x 2,1 mm) com tamanho de partícula de 1,8 μm , conectada a uma pré-coluna C18 com 4 mm x 2 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). A temperatura da coluna foi mantida a 25°C e foi utilizada uma vazão de 0,3 mL min^{-1} . Neste estudo, para a separação dos derivados de estrogênios e compostos fenólicos, foram utilizados como fases móveis água ultrapura (eluente A) e acetonitrila (eluente B) no seguinte gradiente de eluição: início em 70% de B, após uma etapa em que variou de 70% a 80% de B em 1 minuto de duração; após passou-se de 80% a 85% de B em 5 minutos; então de 85% a 100% de B em 1,5 minutos, mantendo-se em 100% de B por 3 minutos; e por último, restabeleceu-se a proporção inicial de B (70%) em 1 minuto em um tempo total de corrida de 12 minutos. Com esse método os autores obtiveram recuperações de 63% a 119% com desvio padrão relativo de 15%. Os limites de quantificação foram da ordem de 0,1-3 ng g^{-1} de sedimento.

Entretanto, não foi obtida boa reprodução do método cromatográfico proposto *Yu et al* (2011). Os resultados obtidos com a utilização deste método de partida não permitiram uma boa separação entre os compostos considerados, assim, foram necessárias modificações nas condições cromatográficas. Para tanto, foram testados e otimizados (otimização univariada) dos seguintes parâmetros: (i) uso de diferentes eluentes, (ii) variação da temperatura da coluna, (iii) estabelecimento do gradiente adequado de eluentes, (iv) ajuste da vazão dos eluentes (fluxo constante durante a corrida), e (v) testes de gradiente de fluxo de eluentes no decorrer da corrida. Todos os testes representam a tentativa de obter melhores respostas do detector, sempre considerando uma melhor separação dos analitos em um menor tempo total de corrida.

Após a obtenção de uma separação cromatográfica satisfatória dos IEs, efetuou-se a validação do método através da obtenção das figuras analíticas tais como curva analítica, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, efeito da matriz da amostra, sensibilidade, robustez, precisão, exatidão e teste com amostras reais, de acordo com o estabelecido por diversas agências reguladoras tais como a ANVISA, INMETRO, IUPAC (INMETRO 2003, ANVISA 2003, IUPAC 2003) e em conferências internacionais sobre harmonização de procedimentos analíticos (ICH 1995, US Pharmacopeia Convention 1999).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Os primeiros testes deste estudo foram baseados nas condições cromatográficas propostas por Yu *et al.* (2011). Resumidamente, o método publicado por Yu *et al.* (2011) consiste: uso de água ultrapura (eluyente A) e acetonitrila (eluyente B), o gradiente de eluentes começou em 70% de B, após variou de 70% a 80% de B em 1 minuto de duração; passou-se de 80% a 85% de B em 5 minutos; então de 85% a 100% de B em 1,5 minutos, mantendo-se em 100% de B por 3 minutos; e por último, restabeleceu-se a proporção inicial de B (70%) em 1 minuto em um tempo total de corrida de 12 minutos. A coluna foi do tipo C18 a 25°C e fluxo de 0,3 mL min⁻¹. Tentou-se utilizar o mesmo método para a determinação dos IE nas amostras de água do mar. Entretanto, ao injetar solução-padrão mista de 200 µg L⁻¹ dos oito IEs, foi observado número razoavelmente grande de coeluições dos picos dos analitos (estrona e 17- α -etinilestradiol, bisfenol A e 17- β estradiol, 4n-nonilfenol e 4n-octilfenol) (Figura 6). Tentou-se então desenvolver um novo método cromatográfico.

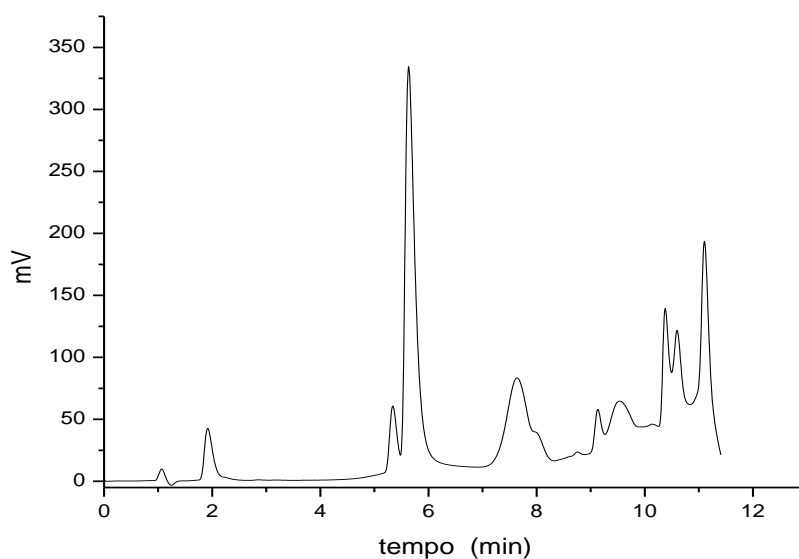


Figura 6. Cromatograma dos padrões analíticos dissolvidos em MeOH numa concentração de 200 µg L⁻¹. Método proposto por Yu *et al.* 2011. uso de água ultrapura (eluyente A) e acetonitrila (eluyente B), o gradiente de eluentes começou em 70% de B, após variou de 70% a 80% de B em 1 minuto de duração; passou-se de 80% a 85% de B em 5 minutos; então de 85% a 100% de B em 1,5 minutos, mantendo-se em 100% de B por 3 minutos; e por último, restabeleceu-se

a proporção inicial de B (70%) em 1 minuto em um tempo total de corrida de 12 minutos. A coluna foi do tipo C18 a 25°C e fluxo de 0,3 mL min⁻¹.

Com o uso de um padrão misto contendo os oito IE na concentração de 200 µg L⁻¹ (para cada analito), foram testados dois diferentes sistemas de eluentes tais como (i) metanol e água desionizada e (ii) acetonitrila e água deionizada. Nesse caso, o sistema acetonitrila e água deionizada foi o melhor e o escolhido para realizar o restante dos testes.

Após, foram testados diferentes gradientes de concentração dos eluentes. Nesse teste foram injetados os padrões individuais para a obtenção dos tempos de retenção de cada analito. A melhor separação foi conseguida no seguinte gradiente: início em 45% de B, de 45% a 90% de B em 3,5 min, mantendo em 90% de B por 0,5 min, variou de 90% a 100% de B em 0,2 min, e variando de 100% para 45% de B em 0,3 min, mantendo a mesma proporção até o final da corrida. O tempo total da corrida foi de 10 min.

Em seguida, foi testada a vazão do eluente variando-o entre 0,100 e 0,300 mL min⁻¹. O melhor resultado foi alcançado a 0,120 mL min⁻¹, durante a corrida. Entretanto, até esse momento, ainda persistia uma pequena sobreposição dos picos dos compostos 17α-etinilestradiol e a estrona que estavam eluindo entre 2,90 e 3,90 minutos. Os picos dos demais IE estavam separados adequadamente, sem ocorrência de co-eluições. Na tentativa de diminuir a co-eluição entre 17α-etinilestradiol e a estrona, testou-se efetuar um gradiente de fluxo de eluentes. Nesse teste, a vazão do eluente foi mantida em 0,120 mL min⁻¹ de 0 a 2,50 min, após, entre 2,5 e 4,0 minutos (região onde estava ocorrendo a co-eluição entre 17α-etinilestradiol e a estrona) a vazão do gradiente foi alterada (testando-se diferentes vazões de 0,030 a 0,150 mL min⁻¹), e por último, entre 4,0 e 10 minutos a vazão do eluente foi de 0,120 mL min⁻¹. A tentativa de variar a vazão do eluente entre 2,5 e 4,0 minutos era no intuito de obter um ganho / melhoria de separação para o 17α-etinilestradiol e a estrona. Entretanto, não houve nenhum ganho perceptível de separação para as duas substâncias em questão e decidiu-se em manter a vazão do gradiente constante durante toda a corrida, em 0,120 mL min⁻¹.

O próximo teste feito, também na tentativa de diminuir a co-eluição entre 17α-etinilestradiol e a estrona, foi a mudança da temperatura da coluna. Nesse momento, foram feitas corridas com solução padrão mista dos IE a 200 µg L⁻¹ variando a

temperatura da coluna entre 25 – 60 °C. Houve uma melhora relativa da co-eluição a 60 °C, apesar de não eliminar completamente a sobreposição entre os picos.

Considerando-se a estrutura química similar do 17 α -etinilestradiol e a estrona, é razoável aceitar que estes tenham comportamento similar durante a etapa de separação cromatográfica, em que provavelmente a interação destes com os sítios ativos da coluna analítica usada seja muito parecida não proporcionando a completa separação deles e, conseqüentemente, co-eluindo.

Diante de todos os testes aqui feitos, consideraram-se as melhores condições alcançadas (Figura 7) foram:

- Água desionizada foi utilizado como eluente A e acetonitrila como eluente B;
- gradiente de fase móvel: início em 45% de B, aumento de 45% para 90% de B entre 0,0 e 3,5 minutos, permanência em 90% de B por 0,5 minutos, aumento de 90% para 100% de B em 0,2 minutos, redução de 100% para 45% de B em 0,3 minutos, permanência em 45% até o final da corrida com tempo total de 10 minutos;
- vazão do eluente de 0,120 mL min⁻¹ durante toda a corrida;
- temperatura da coluna em 60°C;
- comprimento de onda de excitação em 280 nm, comprimento de onda emissão em 306 nm.

Logo, este foi o método desenvolvido e otimizado de modo univariado e utilizado nas etapas subsequentes deste trabalho.

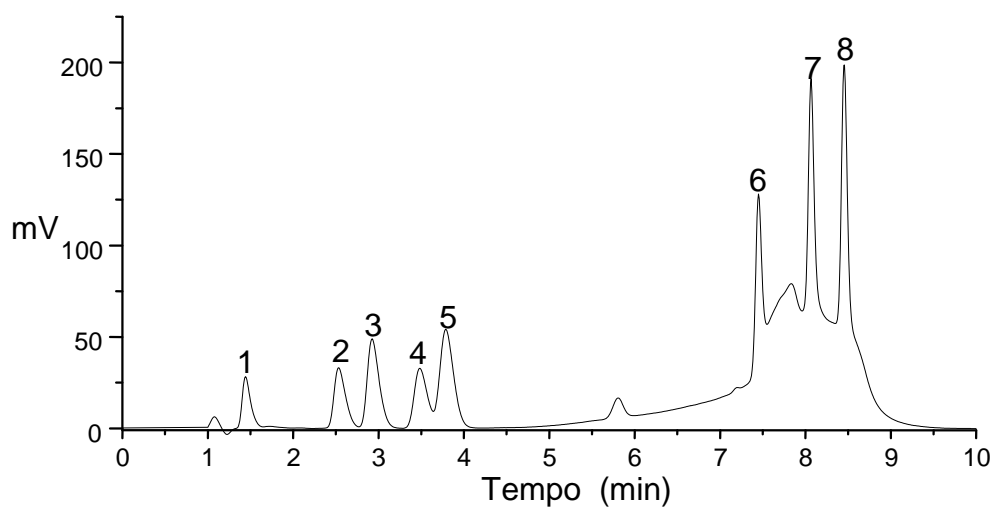


FIGURA 7: Cromatograma dos padrões analíticos dissolvidos em MeOH numa concentração de $200 \mu\text{g L}^{-1}$. Os eluentes utilizados foram água deionizada (eluyente A) e acetonitrila (eluyente B). Gradiente de fase móvel: início em 45% de B, aumento de 45% para 90% de B entre 0,0 e 3,5 minutos, permanência em 90% de B por 0,5 minutos, aumento de 90% para 100% de B em 0,2 minutos, redução de 100% para 45% de B em 0,3 minutos, permanência em 45% até o final da corrida com tempo total de 10 minutos. Fluxo do eluyente $0,120 \text{ mL min}^{-1}$ (constante durante a corrida), temperatura da coluna em 60°C , comprimento de onda de excitação em 280 nm, comprimento de onda emissão em 306 nm. Identificação dos picos: 1- Estriol (tr: 1,45 min), 2- bisfenol A (tr: 2,58 min), 3- 17β -estradiol (tr: 2,99 min), 4- 17α -etinilestradiol (tr: 3,57 min), 5- estrona (tr: 3,89 min), 6- 4t-octilfenol (tr: 7,50 min), 7- 4n-octilfenol (tr: 8,10 min), 8- 4n-nonilfenol (tr: 8,50 min).

7.2 PREPARO DE AMOSTRAS

Sistema de extração e pré-concentração

O sistema de pré-concentração foi baseado no publicado por *Sodré et al 2010*. Nesse estudo, o sistema de pré-concentração passou por adaptações que viabilizaram a sua utilização no presente estudo. O reservatório de resíduos foi modificado, a bombona plástica foi substituída por um reservatório em PVC com capacidade de 16 L adaptado para ser conectado a uma bomba de vácuo, diferentemente do sistema original que utilizava vácuo proveniente de uma tromba d'água. A tampa de *nylon* foi substituída por uma tampa de PVC com 5 orifícios, sendo 4 deles os receptores dos resíduos e 1 para ser conectado a bomba de vácuo. Na figura 12C é mostrado o sistema montado com capacidade para 4 recipientes contendo amostra de água natural. As garrafas são conectadas ao cartucho através de encaixes de *teflon* parafusados e rosqueados, o que possibilita a fácil retirada dos cartuchos após o processo. Na base dos cartuchos são encaixadas as mangueiras que levam o fluxo residual de água para o reservatório de PVC que fica posicionado abaixo do sistema (figura 12B). A vazão pode ser controlada através da torneira “abre-fecha” que interrompe o fluxo a qualquer momento se houver qualquer vazamento inesperado (figura 12A).

Método de extração e pré-concentração das amostras

Foi desenvolvido procedimento de extração e pré-concentração de amostras utilizando extração em fase sólida (SPE) com cartucho de C18. O método desenvolvido é apresentado na Figura 8.

O processo de filtração pode se tornar tedioso conforme a complexidade e conteúdo de material particulado da matriz de amostras reais. No caso das amostras estuarinas e de regiões muito impactadas, onde há uma maior quantidade de material particulado em suspensão e matéria orgânica (dissolvida e particulada), a quantidade de amostra que deve ser utilizada para análise é uma variável difícil de ser determinada. Por exemplo, se é tomada uma alíquota grande de uma amostra complexa pode ocorrer a saturação dos sítios de adsorção do cartucho de C18 (SPE) em função da natureza da amostra, especialmente se esta for muito rica em matéria orgânica e outros compostos que possam estar competindo pelos sítios ativos da fase estacionária da SPE-C18. O

tamanho de poro do filtro é outra variável importante, pois quanto menor o poro, maior será a limitação da quantidade de amostra a ser filtrada por membrana. Baseado na ausência de estudos sobre IE na região, nos níveis destes compostos encontrados na literatura e na concentração de material particulado em suspensão, foi utilizado 4 L de amostra, mesmo que o processo de filtração seja um processo lento e laborioso.

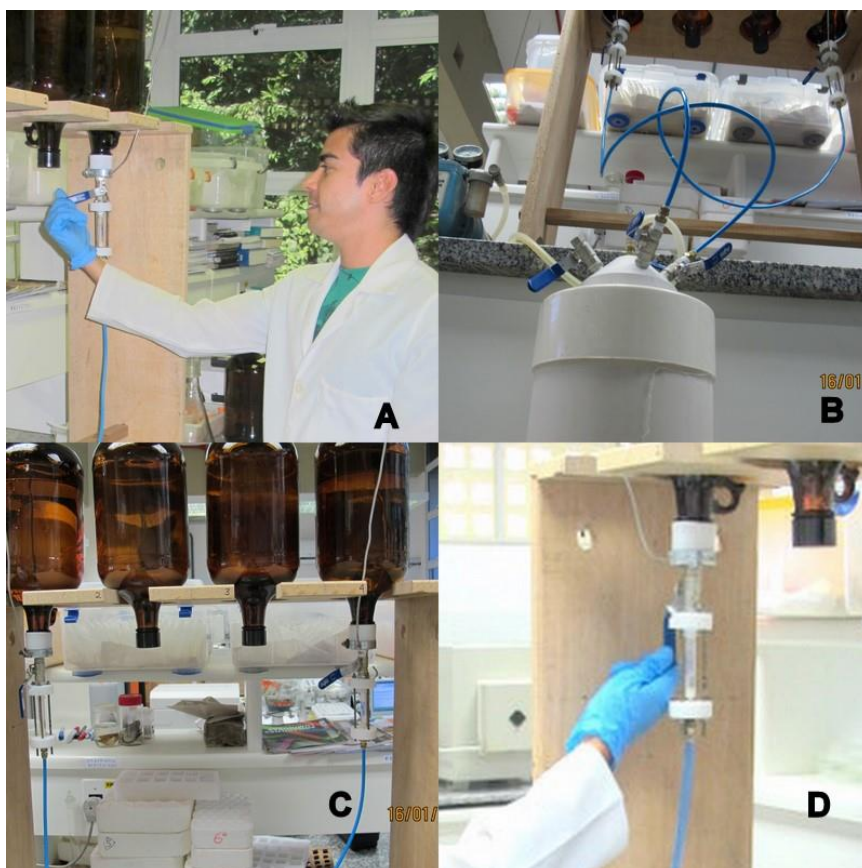


FIGURA 8- sistema de pré-concentração adaptado: A) controle de vazão; B) reservatório de coleta de resíduo; C) capacidade para 4 garrafas; D) cartucho SPE.

A água do mar é uma matriz muito complexa, com a presença de matéria orgânica e substâncias inorgânicas dissolvidas, em especial os sais, que constituem grande parte dessa matriz. É esperado que os sais causem problemas nos sistemas cromatográficos, como por exemplo entupimento da coluna e/ou elevação da pressão do sistema. Dessa forma, foi necessário realizar um procedimento para eliminar os sais que potencialmente se acumulariam ao longo da passagem dos 4 L da amostra no cartucho de SPE. A eliminação dos sais dos cartuchos de SPE foi realizada através

da lavagem dos mesmos com alíquotas de água deionizada. Para se determinar o volume ideal de água a ser utilizado, foi realizado um teste adicionando-se alíquotas de 2 mL no cartucho e medindo a salinidade da água após a passagem no sistema SPE, com auxílio de um refratômetro. Como pode ser visto na figura 10, foi necessário passar 6 mL de água, alternadamente com ar, para garantir a eliminação do sal, antes de ser realizada a eluição com o solvente. Após a passagem de água, foram injetados 5 mL de ar duas vezes, para garantir que toda água fosse eliminada do sistema. Os extratos foram eluídos dos cartuchos de SPE com 2 mL de metanol e acondicionados em vials etiquetados. Os extratos foram injetados no cromatógrafo, utilizando o método otimizado.

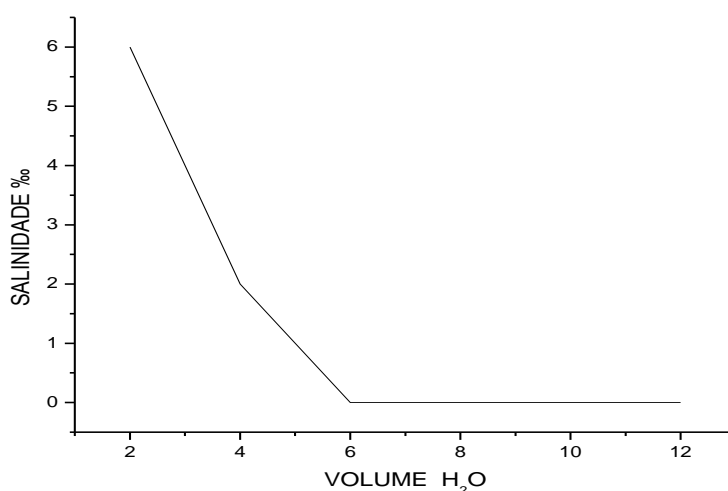


FIGURA 9 – nível de salinidade no eluído do cartucho de C18 com adição de alíquotas de água deionizada, medida com refratômetro óptico.

Portanto, o método desenvolvido consiste das seguintes etapas: filtração da amostra de água com membrana de acetato de celulose (47 mm de diâmetro e 0,45 µm de poro) para retirar o material particulado em suspensão, pré-concentração dos IE em cartucho de C18, passagem de 2 mL de água ultrapura (repete-se 3 vezes) para retirada dos sais e outros possíveis interferentes, eluição dos IE retidos no cartucho com 2 mL de metanol, filtração em unidades do tipo Millex (PTFE, 0,22 µm de poro e 4 cm de diâmetro) e a injeção em sistema UFLC-Fluorescência. No ensaio de recuperação (mostrada posteriormente) é verificado que o método aqui proposto funciona bem para a extração e pré-concentração dos IE em amostras de água do mar.

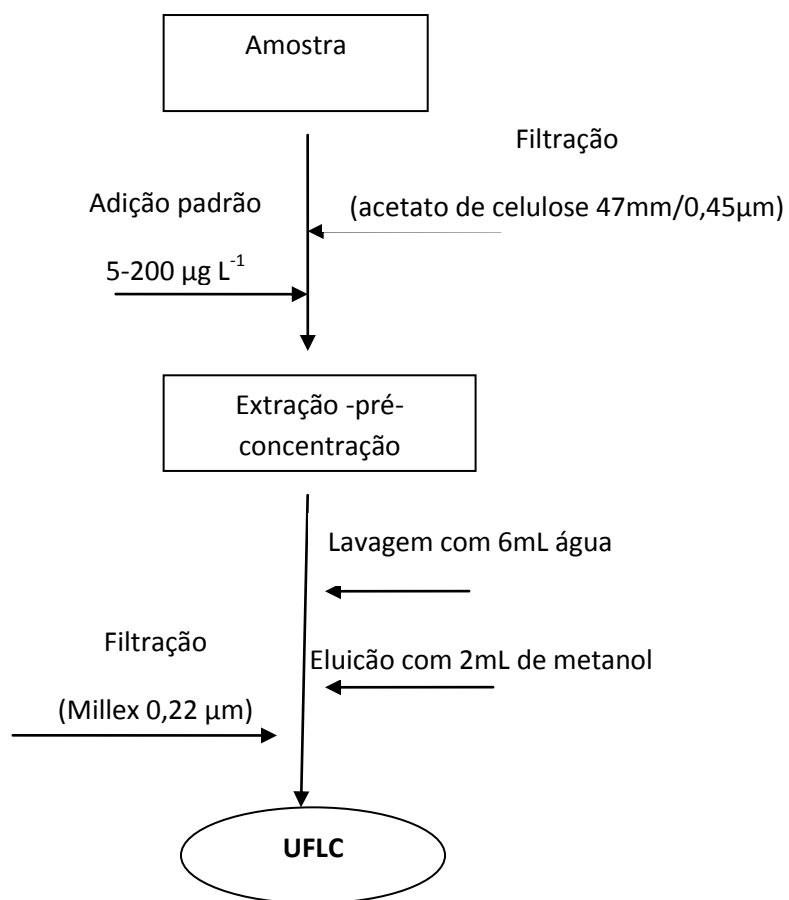


FIGURA 10 - Fluxograma do preparo da amostra (água do mar) para IE por SPE-UFLC-FLU.

7.3 VALIDAÇÃO DO SISTEMA ANALÍTICO

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) são as duas agências credenciadoras responsáveis por fiscalizar a competência dos laboratórios de ensaio no Brasil. A ANVISA criou a Resolução ANVISA RE no 899, de 29 de maio de 2003, documento com poder de lei, onde são apresentados os parâmetros de validação e seus respectivos limites que garantam confiabilidade dos resultados obtidos por determinado método para a determinação de fármacos em produtos farmacêuticos. A Resolução ANVISA RE no 475, de 19 de março de 2002 é aplicada a métodos bioanalíticos para a determinação quantitativa de fármacos e/ou seus metabólitos em matrizes biológicas. Já o INMETRO disponibiliza um documento mais abrangente, para o procedimento de validação de métodos analíticos, o INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março de 2003, o qual sugere uma conduta de validação de acordo com o método a ser utilizado. Órgãos internacionais tais como a IUPAC, a Farmacopeia americana e o ICH também publicaram diretrizes que regularizam procedimentos de validação de métodos analíticos (IUPAC 2002, USPC 1999, ICH 1995).

Validação de método se faz valer de um conjunto de testes em que qualquer suposição em que o método analítico está baseado e estabelecido e documenta as características de desempenho do método, demonstrando assim se o método está ajustado para um propósito analítico em particular. Parâmetros usuais de validação de método analítico são: seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, adição de padrão, precisão, exatidão e robustez. Falando estritamente, validação deveria se referir a um “sistema analítico” em invés de um “método analítico”. O sistema analítico inclui um protocolo analítico definido, uma faixa de concentração definida para o analito, e um tipo específico de material em teste (IUPAC 2002). Por isso, nesse estudo, a etapa de validação refere-se a etapa de extração e pré-concentração de amostras utilizando cartuchos de C-18, análise utilizando a técnica UPLC-fluorescência em amostras de água do mar, considerando-se assim como o sistema analítico para determinação de interferentes endócrinos possivelmente presentes em amostras de água coletadas em diferentes pontos da Baía de Todos os Santos.

Seletividade

A seletividade de um método analítico refere-se a quanto à resposta que ele fornece para o analito se mostra livre de interferência por outras espécies contidas na matriz da amostra (USPC, 1999). Idealmente, deveria ser investigada a seletividade considerando cada potencial interferente que provavelmente está presente que poderia à princípio, responder ao teste. Mas, na prática, considerar cada possível interferente da análise é inviável. Logo, tenta-se considerar alguns possíveis interferentes no teste de seletividade e esta deve ser bom o suficiente para que o restante dos interferentes possivelmente presentes na amostra possa ser ignorado (IUPAC 2002).

No sistema analítico deste estudo, consideram-se duas possíveis hipóteses: **(1)** como foi usado o método de extração em fase sólida (SPE) como sistema de pré-concentração dos analitos, possivelmente, nessa etapa, os IE e também quaisquer outros componentes presentes originalmente nas amostras irão ser pré-concentrados. É razoável considerar que os outros componentes da amostra possam ser possíveis interferentes analíticos na determinação cromatográfica dos IEs; **(2)** o detector utilizado no sistema de cromatografia líquida foi de fluorescência. Como este é um detector universal (e, portanto, não faz a identificação inequívoca da estrutura química dos compostos presentes nas amostras – como seria possível, por exemplo, com detector de massas), quaisquer substâncias presentes nas amostras e pré-concentradas juntamente com os IEs, que fluoresçam nos mesmos λ_{em} e de λ_{exc} e eluam próximos ao (ou exatamente nos mesmos) tempos de retenção dos analitos seriam erroneamente quantificados como sendo as espécies estudadas nesse trabalho. Na tentativa de estimar a presença de possíveis interferentes e então a seletividade do método, foi utilizada amostra de água do mar isenta de IE (Figura 11 A) e então outra alíquota da mesma amostra foi fortificada com solução-padrão contendo os IE (Figura 11B). Nas condições cromatográficas empregadas, constatou-se que as amostras não apresentaram substâncias interferentes nos tempos de retenção dos IE analisados, como pode ser observados na figura 11A da amostra de água do mar (sem adição dos compostos analisados) e da figura 11B, que corresponde a amostra fortificada com os padrões dos analisados, numa concentração de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada composto. Com base nos resultados apresentados, o sistema analítico proposto nesse estudo apresentou seletividade satisfatória para os IE em amostras de água do mar.

Efeito de Matriz

O teste de efeito de matriz tenta estimar se outros componentes das amostras podem ou não interferir na determinação dos analitos na amostra. O teste geralmente consiste na construção de curvas analíticas pelo método de calibração externa e, após, é feito, através da adição de quantidades conhecidas dos padrões dos analitos às amostras a construção da curva de calibração pelo método da adição-padrão. Para cada caso, será obtida uma equação da reta. Se, ao dividir o coeficiente angular da curva de calibração externa (a_{ext}) pelo coeficiente angular da curva de adição-padrão (a_{ad}), o resultado for aproximadamente igual a uma unidade, ou seja, $a_{ext}/a_{ad} \approx 1$, significa que não há interferência da matriz. Nesse caso, é simplificado enormemente a calibração e a posterior quantificação dos analitos na amostra, já que o método de calibração externa é suficiente (RIBANI et al. 2004, IUPAC 2002).

Para estimar o efeito de matriz, foram preparadas duas curvas analíticas de concentrações de 5 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, uma em solução de água do mar fortificada e outra utilizando a mistura de padrões em metanol. Os coeficientes angulares das curvas construídas estão apresentados na tabela 8. Dividindo-se a_{ext}/a_{ad} foram obtidos valores entre 0,9 e 1,1. As variações entre os coeficientes angulares das duas curvas foram de 0,007% para o estriol e 0,616% para o bisfenol A, havendo pouca diferença entre as inclinações da curva (coeficiente angular) obtidas pelas duas curvas, na matriz da amostra de água do mar e no metanol. Estes resultados sugerem que a matriz exerceu pouco efeito nas inclinações das retas, concluindo-se que não houve influência apreciável da matriz, fato atestado pelos valores abaixo de 2%. Logo, o método de calibração externa (que é mais simples que o método de adição-padrão) é satisfatório para ser usado na determinação dos IE em amostras reais.

Tabela 2 - Comparação entre curvas analíticas para os padrões em água do mar e metanol.

IEs	Coeficiente angular (calibração externa, a_{ext})	Coeficiente angular (adição-padrão, a_{pad})	a_{ext}/a_{pad}	Variação
Estriol	1379	1370	1,0	0,007%
Bisfenol A	1315	1497	0,9	0,4%
17 β -estradiol	2082	2143	1,0	0,1%
17 α -etinilestradiol	1656	1642	1,0	0,05%
estrona	189	171	1,1	0,6%
4t-octilfenol	2077	2057	1,0	0,1%
4n-octilfenol	3821	4170	0,9	0,2%

4n-nonilfenol	3746	4059	0,9	0,3%
---------------	------	------	-----	------

Curva analítica, linearidade e faixa linear

A linearidade pode ser mais bem definida como sendo a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em questão, em uma faixa de aplicação que é chamada de faixa linear dinâmica (RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2003). A correlação existente entre o sinal medido e a concentração da espécie a ser determinada é inicialmente desconhecida. Essa relação pode ser expressa matematicamente como uma equação de reta chamada de curva analítica que deve conter ao menos cinco pontos sem contar com o ponto zero da curva.

As curvas analíticas foram feitas utilizando o método de calibração externa, com 10 níveis diferentes de concentração (1, 5, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$) das soluções-padrão para todos os analitos, exceto para a estrona, que foi considerado 12 níveis diferentes de concentração de sua solução-padrão (1, 5, 10, 50, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$). Para cada concentração dos IEs, foram feitas injeções em triplicadas no UFLC-Flu. A partir de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$, foram encontrados sinais de todos os analitos distintos do sinal da linha de base (razão sinal/ruído > 3). As curvas analíticas estão presentes na Figura 12.

A faixa linear, por inspeção das curvas de calibração (Figura 12), foi de 5 – 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ para bisfenol A, 4-n-octil-fenol, 4-terc-octil-fenol, 4-n-nonil-fenol, estriol, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol. Para a estrona a faixa linear é de 5 – 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ver também Tabela 3). Os valores de RSD (%) variaram de 1,5 (estrona) a 4,5 (4t-octilfenol e bisfenol A) sendo que todos eles estão adequados e dentro da faixa recomendada de até 20% para concentrações traços. Considerando-se o fator de concentração utilizando o método descrito aqui, a faixa linear utilizada para a construção da curva de calibração foi satisfatória para as concentrações dos IE encontrados nas amostras reais (mostrado posteriormente).

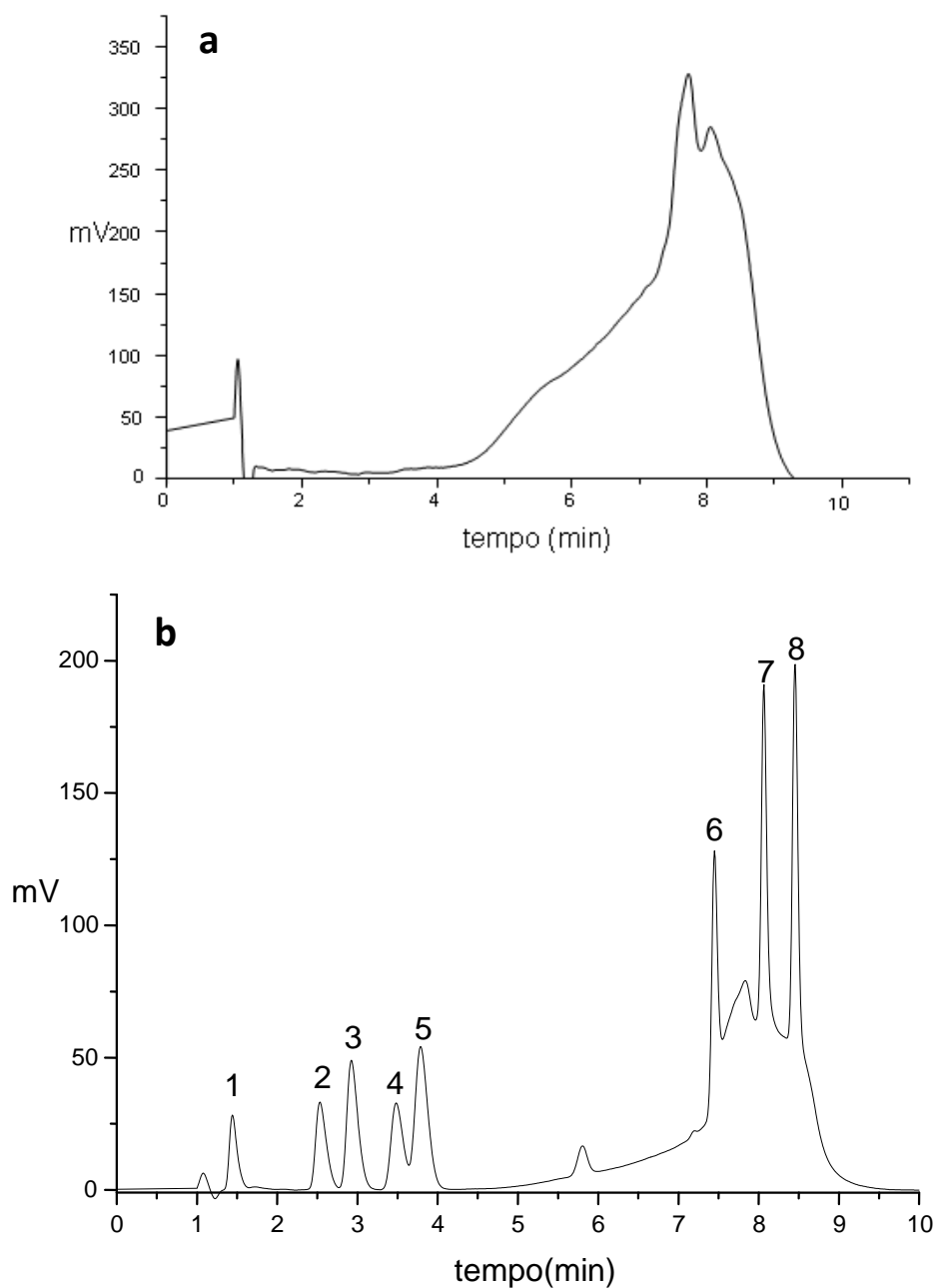


FIGURA 11: Cromatograma de (A) amostra de água do mar sem adição dos analitos (branco) e cromatograma de (B) amostra da água do mar fortificada da mistura de IEs. O gradiente de fase móvel, sendo o eluente A acetonitrila e eluente B água ultrapura, iniciou-se em 45% de B e permaneceu por 3,5 min, após variou de 45% a 90% de B em 0,5 min, no tempo 4,0 min aumentou para 100% de B e em 4,2 min, retabeleceu-se para a mesma proporção de eluentes inicial, de 45% de B, mantendo-se até final (tempo total da corrida 10,0 min). vazão: 0,120 mL/min, temperatura da coluna em 60°C, λ de excitação em 280 nm, λ emissão em 306 nm. Identificação dos picos: 1 - Estriol (1,447 min), 2- bisfenol A (2,583 min), 3 -17 β -estradiol (2,985 min), 4- 17 α -etinilestradiol (3,571 min), 5- estrona (3,888 min), 6 - 4t-octilfenol (7,504 min), 7- 4-octilfenol (8,096 min), 8 - 4n-nonilfenol (8,498 min).

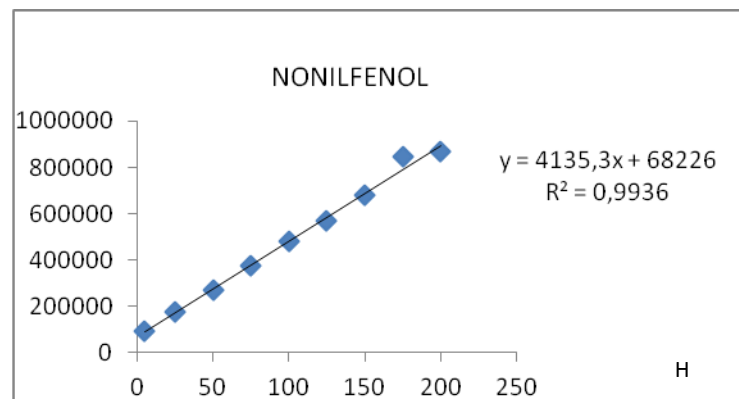
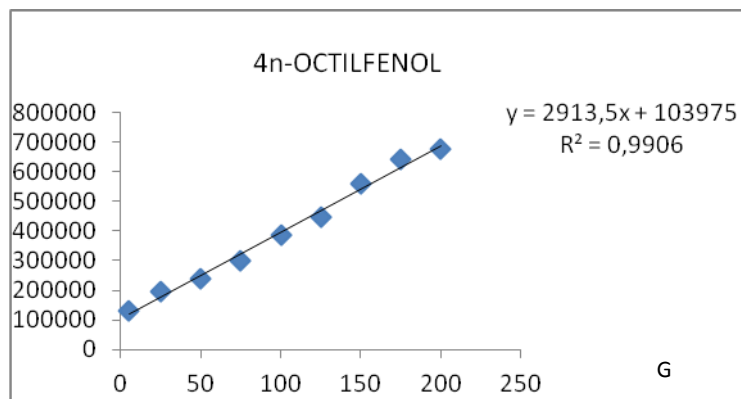
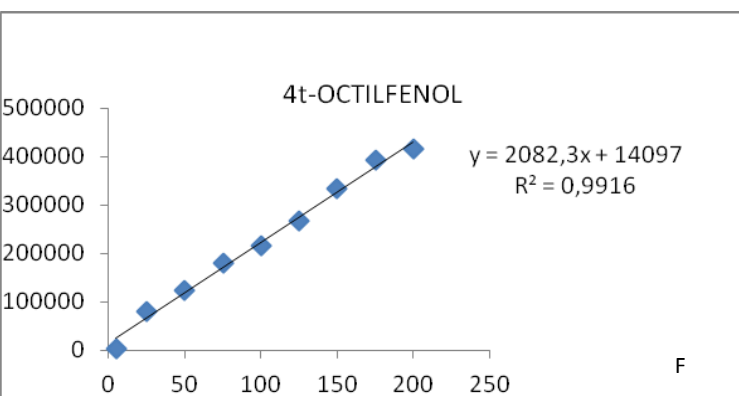
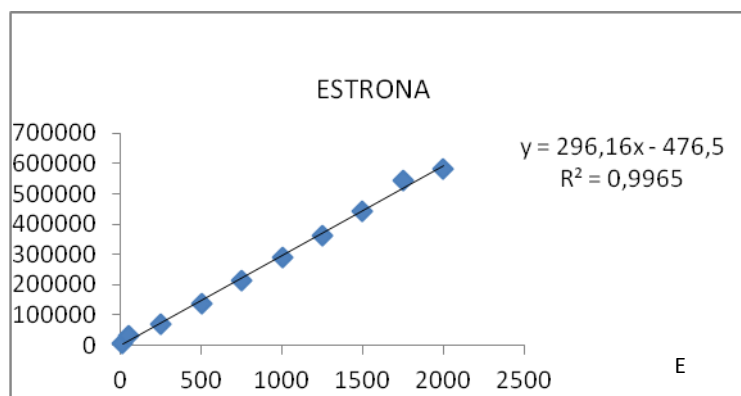
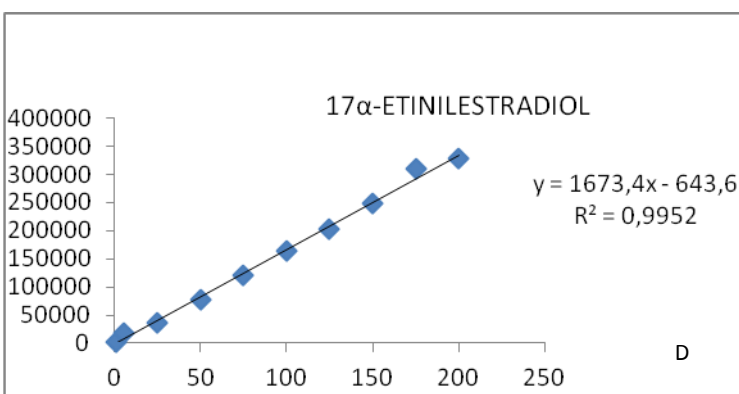
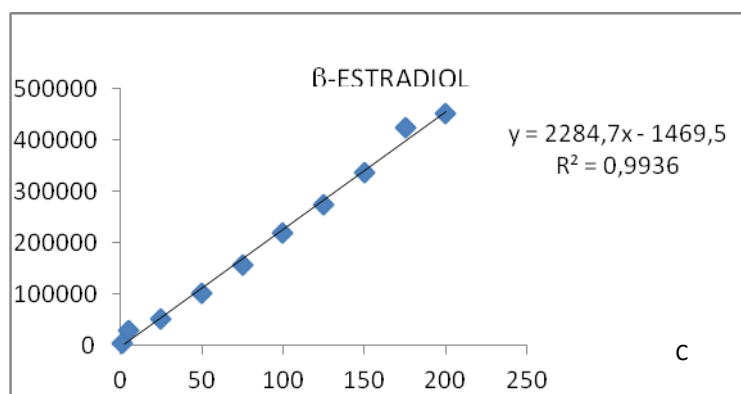
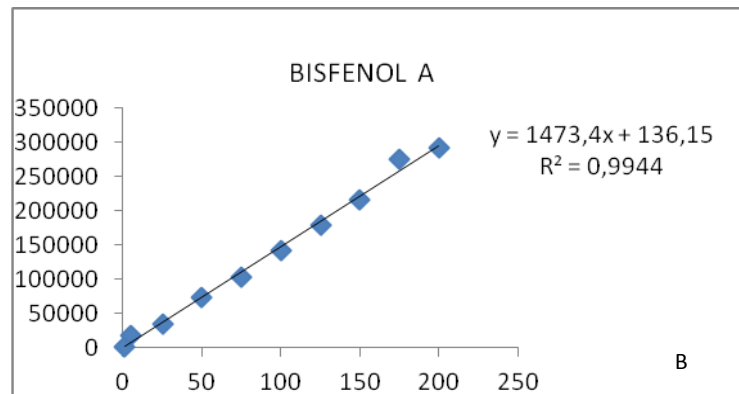
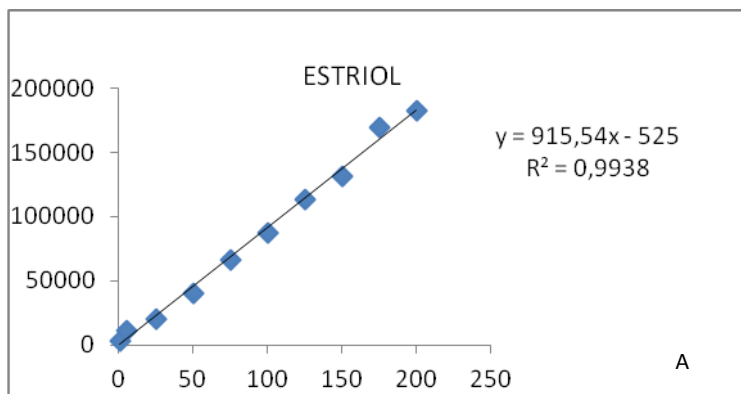


FIGURA 12 – Curvas analíticas dos IEs (A - estriol, B- bisfenol A, C- β-estradiol, D - 17α-etinilestradiol, E - estrona, F- 4t-octilfenol, G -4n-octilfenol, H- nonilfenol. Áreas dos picos versus concentrações (eixo y, eixo x).

Tabela 3 – Algumas figuras de mérito para o método otimizado

IEs	linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R ²	RSD(%)	Equação da reta
estriol	5-200	0,9938	1,6	$y = 915,54x - 525$
bisfenol A	5-200	0,9944	4,5	$y = 1473,4x + 136,15$
17 β -estradiol	5-200	0,9936	2	$y = 2284,7x - 1469,5$
17 α -etinilestradiol	5-200	0,9952	3	$y = 1673,4x - 643,6$
estrona	10- 2000	0,9965	1,5	$y = 296,16x - 476,5$
4-t-octilfenol	5-200	0,9916	4,5	$y = 2082,3x + 14097$
4-octilfenol	5-200	0,9906	2	$y = 2913,5x + 103975$
4n-nonilfenol	5-200	0,9936	1,8	$y = 4135,3x + 68226$

Limites de Detecção, Limite de Quantificação

Os limites de detecção (LD) é a menor quantidade ou concentração do analito que pode ser distinguida de zero. Limite de quantificação (LQ) é aproximadamente 3 vezes o limite de detecção. Muitas vezes o LQ é considerado como sendo um valor mais confiável que o LD, principalmente quando a precisão medida próximo ao valor de LD apresenta um RSD superior a 10% (RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2003; IUPAC 2002).

Os LD e LQ foram calculados utilizando os parâmetros da curva de calibração, como segue:

$$\mathbf{LD = 3,3 \times \frac{s}{S}} \qquad \mathbf{LQ = 10 \times \frac{s}{S}}$$

onde, **s** é o coeficiente linear da equação e **S** é o coeficiente angular da curva analítica (ANVISA 2003; RIBANI et al., 2004). Os valores de LD e LQ do sistema cromatográfico bem como seus valores correspondentes no ambiente (considerando o fator concentração de 2000 vezes para a água do mar) encontram-se na Tabela 4.

O LD do método cromatográfico variou de 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o 17 α -etinilestradiol a 56 $\mu\text{g L}^{-1}$ para estrona e os LQ variou de 19 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o estriol e o 17 β estradiol a 185 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a estrona. Considerando-se que foram considerados um volume de 4 L para cada

amostra que foram então concentrados em SPE e redissolvidos em 2 mL de MeOH, os LD no ambiente variou de 2 a 23 ng L⁻¹ para o composto EE2 e E1, respectivamente e LQ no ambiente variou de 9 a 96 ng L⁻¹ para o composto E3 e E1, respectivamente.

Tabela 4 - Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para o método cromatográfico e amostras de água do mar.

IEs	LD (µg L ⁻¹) cromatográfico	LQ (µg L ⁻¹) cromatográfico	LD (ng L ⁻¹) no ambiente	LQ (ng L ⁻¹) no ambiente
Estriol	6	19	3	9
Bisfenol A	6,5	33	3	16
17β-estradiol	6	19	3	10
17α-etinilestradiol	4	74	2	37
Estrona	56	185	23	96
4t-octilfenol	27	90	13	45
4n-octilfenol	9	30,5	4,5	15
4n-nonilfenol	9	29	4	15

Os LDs deste estudo, em geral, apresentaram-se inferiores aos valores reportados por vários autores para águas. *Matsumoto et al.* (2002) obtiveram LDs entre 600 e 650 ng L⁻¹ para estrógenos utilizando da técnica HPLC-FLU com 1L de amostra analisada, enquanto que *Lopes* (2007) obteve também por HPLC-FLU, 500 ng L⁻¹ de limite de detecção para 1L de amostra de água ambiental. *Raimundo* (2007) obteve limites de detecção para estrógenos de 16 a 45 ng L⁻¹ em 1L de amostra de água ambiental utilizando HPLC-FLU, valores próximos aos deste trabalho. Os limites de detecção obtidos para o 4n-nonilfenol foram inferiores aos obtidos por *Moura* (2009), 0,2 mg L⁻¹. O valor de LD deste trabalho para o bisfenol A foram um pouco superior ao LD obtido por *Pojana et al.*, (2007) de 3 ng L⁻¹ para o BPA, utilizando a técnica HPLC-ESI-MS em amostras de água marinha. O limite de quantificação para o estriol foi pouco superior (9 ng L⁻¹) ao obtido por *Moura* (2009) 4,5 ng L⁻¹ utilizando 1 L de amostra de água superficial pela técnica de LC/MS/MS. Entretanto, grande parte dos trabalhos comparados foram realizados em amostras de água doce ou de baixa salinidade, as quais, são geralmente menos complexas. Considerando a literatura disponível e os valores de ocorrência destes compostos no ambiente marinho, pode-se considerar que os limites obtidos são adequados para o estudo de IE em águas marinhas.

Precisão

Os testes de precisão foram feitos utilizando o teste de repetibilidade que representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método (ANVISA 2003, INMETRO 2003), efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo.

Para avaliar a repetibilidade do método cromatográfico ao longo de um mesmo dia (“precisão intra-dias”), uma mistura de padrões na concentração 200 µg L⁻¹ foi injetada dez vezes, pelo mesmo operador segundo as mesmas condições cromatográficas. A média das áreas dos picos e os valores dos desvios-padrão relativos (RSD%) encontram-se na tabela 5. Os valores de RSD% variaram de 1,4% para a estrona e 4,5% para o 4t-octilfenol, sendo que todos os valores estão abaixo do limite de 20% estabelecido para a análise de concentrações traços (RIBANI et al 2004, IUPAC 2002, INMETRO 2003, ANVISA 2003).

Tabela 5- Teste de repetibilidade, dentro de um mesmo dia, do método cromatográfico para os IEs

IEs	Média áreas	RSD%
Estriol	458313	1,6
bisfenol A	442448	4,5
β-estradiol	664958	2
17α-etinilestradiol	509595	3
Estrona	598826	1,4
4t-octilfenol	523635	4,5
4n-octilfenol	1096974	2
4n-nonilfenol	11438892	1,8

Foi também realizado um experimento para determinar a precisão entre dias diferentes (“precisão inter-dias”). Para este experimento, uma mistura de padrões de IE nas concentrações de 5, 100 e 200 µg L⁻¹ foram injetadas em 5 dias diferentes, no mesmo equipamento e pelo mesmo analista. Em cada dia, foi feita injeção em triplicata. A precisão entre dias foi expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD). A

ANVISA recomenda que os resultados não excedam 15% do RSD (exceto para o limite de quantificação, o qual não deve exceder 20% do RSD). Os valores de RSD% variaram pouco entre os cinco dias de análise, sendo que o valor mais elevado de desvio padrão relativo foi 6,1% para o BPA entre os cinco dias. Os resultados exibidos na tabela 6 estão dentro do intervalo aceitável (RIBANI et al 2004, IUPAC 2002, INMETRO 2003, ANVISA 2003).

Tabela 6- Teste de repetibilidade, entre dias diferentes, do método cromatográfico para os IEs

IEs	Média áreas (5 µg L ⁻¹)	RSD%	Média áreas (100 µg L ⁻¹)	RSD%	Média áreas (200 µg L ⁻¹)	RSD%
Estriol	5516	2,3	90352	0,6	236600	3,4
Bisfenol A	15519	2,0	143360	2,8	281975	6,1
17β-estradiol	26569	5,0	225245	2,7	451012	3,9
17α-etinilestradiol	17719	4,5	164846	5,5	340633	2,5
estrona	31833	2,3	290440	2,3	620277	3,1
4t-octilfenol	22088	5,9	208690	3,8	425645	3,2
4n-octilfenol	128916	5,4	375002	2,5	674041	2,0
4n-nonilfenol	124804	5,4	493005	2,5	905330	2,0

Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (ICH, 1995). A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança (ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão). Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços. O número de ensaios para determinar a exatidão varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características da pesquisa. A ICH (1995) estabelece que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração deve ser obedecido. Por exemplo, ensaios em triplicata para três níveis de concentração. Esta recomendação é também adotada pela ANVISA. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência certificados; comparação de métodos; ensaios de recuperação e adição padrão (RIBANI, 2004). Neste estudo, foi feito o teste de recuperação dos analitos e os resultados estão apresentados na

tabela 8. Para os compostos em estudo não existem materiais de referência certificados disponíveis no mercado.

De forma geral, a recuperação (R) é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (IUPAC 2002). Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de traços estão entre 70 e 120%, com precisão de $\pm 20\%$ (GARP, 1999). Para avaliação do nível de recuperação para os IE em amostras de água marinha, foram preparados 3 níveis de concentração: 25, 100 e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os testes foram realizados em triplicatas. Calculou-se o desvio padrão (s) e o RSD dos resultados obtidos. A tabela 7 apresenta os níveis de fortificação e recuperação obtidos para o método desenvolvido.

Tabela 7 - Recuperação média (%) das fortificações e RSD para as concentrações de 25, 100 e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ determinados por UFLC-FLU.

IEs	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Adicionada (área)	Encontrada (área)	Recuperação (%)
Estriol	25	32161	30155	94
	100	140874	148071	99
	150	205321	195300	95
Bisfenol A	25	31449	31508	100
	100	135339	130031	96
	150	208649	213505	102
17β-estradiol	25	43662	40523	93
	100	200965	190832	95
	150	306065	316023	103
17α-etinilestradiol	25	34856	31632	91
	100	167985	147802	88
	150	251616	238791	94
Estrona	250	39218	35019	89
	1000	188133	168188	89
	1500	285713	250812	88
4t-octilfenol	25	27366	28315	103
	100	185085	180002	97
	150	289260	278100	96
4n-octilfenol	25	77058	75058	97
	100	397525	337501	85
	150	583316	602101	103
4n-nonilfenol	25	59362	58521	99
	100	341972	332104	97
	150	525987	550875	104

Os valores de recuperação variaram entre 84,9% e 104%, os quais estão dentro do intervalo aceitável de recuperação para a análise de traços, especialmente tratando-se de uma matriz complexa, como água do mar.

Teste com amostras reais

Para testar a metodologia desenvolvida neste estudo com amostras reais, foram coletadas amostras de água de seis localidades do entorno da BTS. São elas: 1. Baía da Ribeira; 2. Feira de São Joaquim; 3. Santo Amaro da Purificação; 4. São Francisco do Conde; 5. Cachoeira; 6. Acupe. Em cada ponto de coleta foram coletadas três réplicas independentes em frascos âmbar (volume de 4 L), previamente descontaminado. Em campo, cada frasco foi lavado com água local três vezes antes de cada coleta. Esse procedimento foi realizado com a finalidade de se ambientar os recipientes e minimizar as possibilidades de contaminações. Após a coleta das amostras, as mesmas foram transportadas para o laboratório e então foi prontamente realizado o procedimento de pré-tratamento e *clean-up* das amostras. Logo após as amostras pré-concentradas foram analisadas em sistema UFLC – Fluorescência. O período máximo entre a coleta, transporte, *clean-up* e análise não foi superior a uma semana.

O resultado das análises das amostras de água coletadas na Baía de Todos os Santos é mostrado nas figuras 13 e 14. Nestas são mostrados os cromatogramas de uma das três réplicas coletadas para cada estação. As variações entre as réplicas independentes coletadas em campo e os respectivos valores de RSD estão apresentados na tabela 9.

As variações nas concentrações entre as réplicas das amostras coletadas foram de 0,56% para o BPA na estação de Acupe, entre 3 a 5% para o mesmo analito em São Francisco do Conde. Para o 4NOP que foi observado um RSD de 6,91% na estação Francisco do Conde. Os valores de RSD% foram, em geral baixos, e representam a variabilidade natural na ocorrência e distribuição destes contaminantes na água (tabela 8).

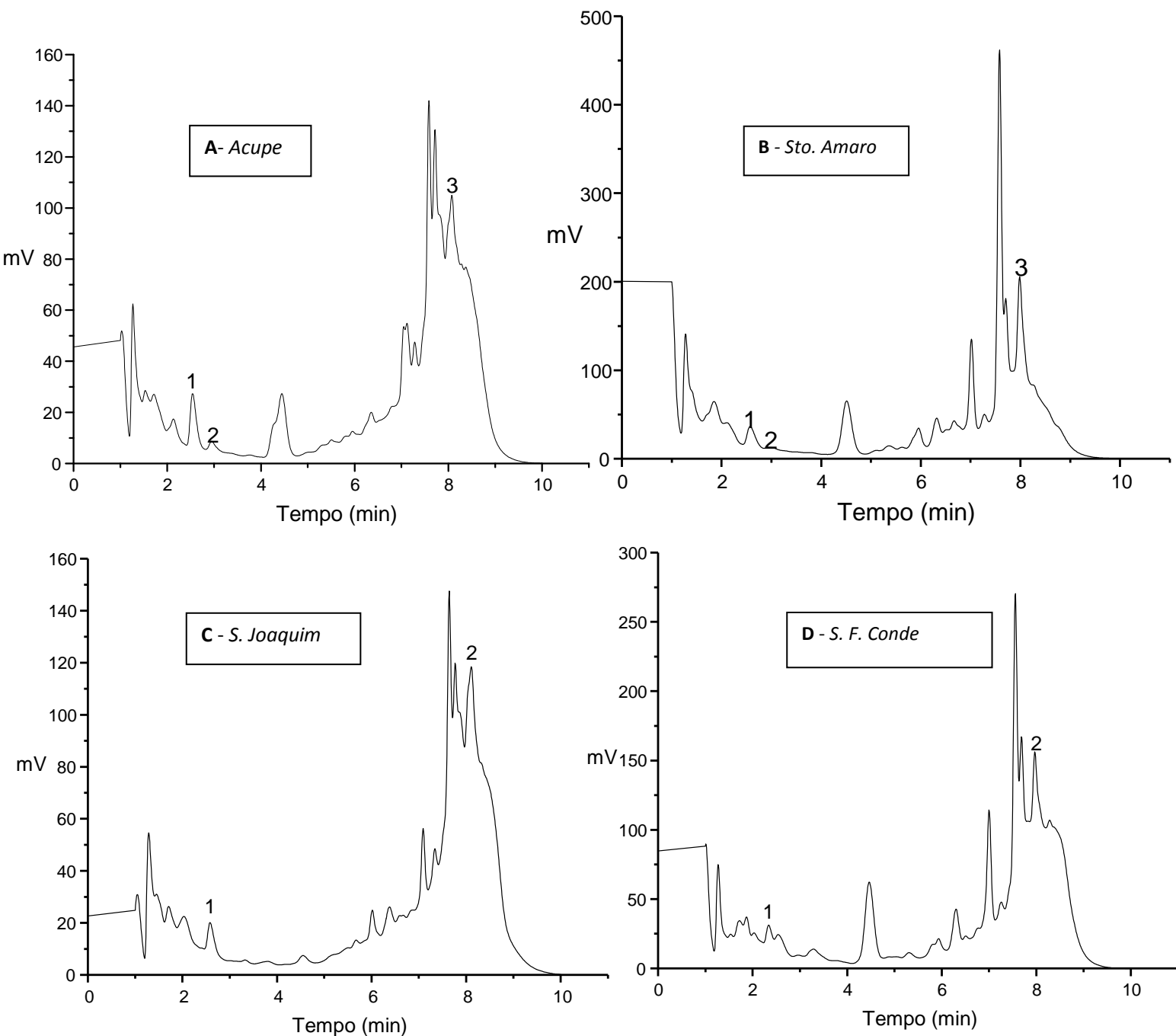


FIGURA 13: Cromatogramas das amostras coletadas na BTS. **A-** *Acupe*. Identificação dos picos: 1- bisfenol A (2,580 min), 2- 17 β -estradiol (2,989 min), 3- 4-octilfenol (8,095 min). **B-** *Sto. Amaro*. Identificação dos picos: 1- bisfenol A (2,580 min), 2- 17 β -estradiol (2,988 min), 3- 4-octilfenol (8,099 min). **C-** *S. Joaquim*. Identificação dos picos: 1- bisfenol A (2,580 min), 2- 4-octilfenol (8,087 min). **D-** *S.F. Conde*. Identificação dos picos: 1- bisfenol A (2,580 min), 2- 4-octilfenol (8,085 min). O gradiente de fase móvel, sendo o eluente A acetonitrila e eluente B água ultrapura, iniciou-se em 45% de B e permaneceu por 3,5 min, após variou de 45% a 90% de B em 0,5 min, no tempo 4,0 min aumentou para 100% de B e em 4,2 min, restabeleceu-se para a mesma proporção de eluentes inicial, de 45% de B, mantendo-se até final (tempo total da corrida 10,0 min). Fluxo: 0,120 mL/min, temperatura da coluna em 60°C, λ de excitação em 280 nm, λ emissão em 306 nm.

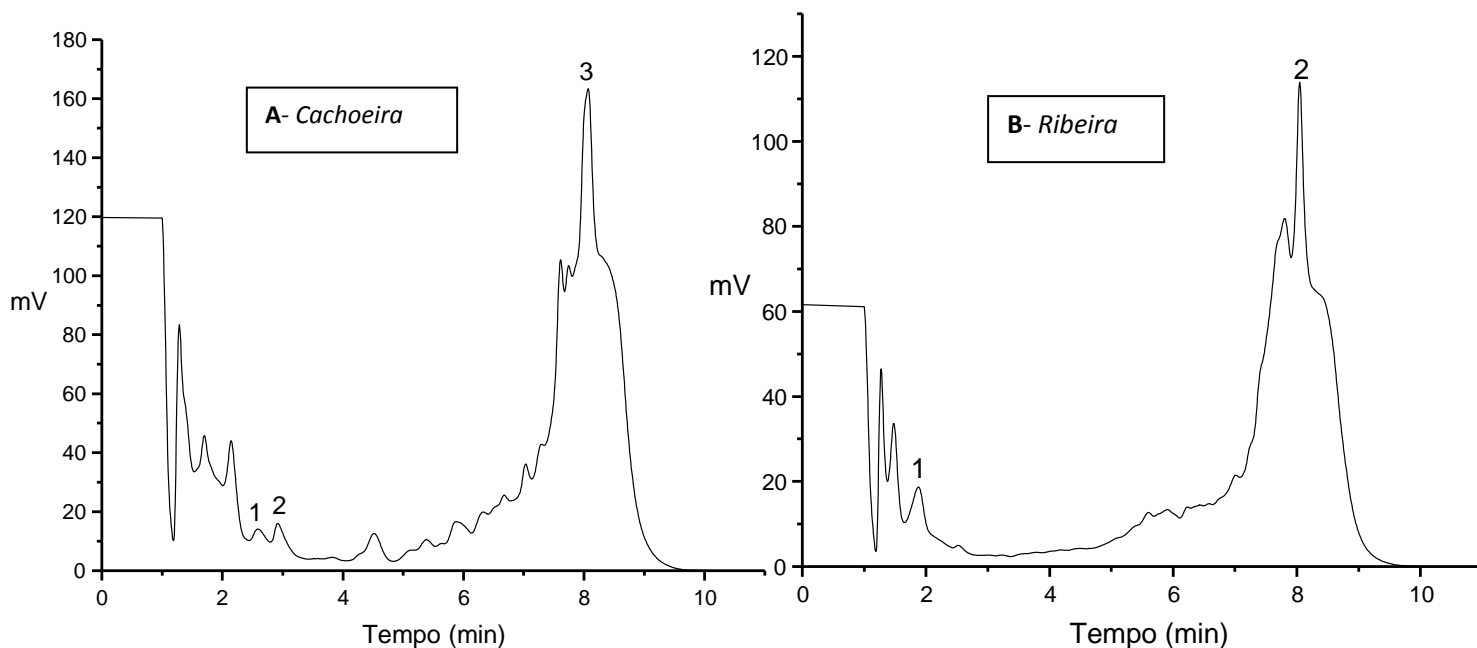


FIGURA 14: Cromatogramas – Amostras coletadas na BTS. **A- Cachoeira.** Identificação dos picos: 1- bisfenol A (2,597 min), 2- 17 β -estradiol (2,978 min), 3- 4-octilfenol (8,098 min). **B- Ribeira.** Identificação dos picos: 1- bisfenol A (2,580 min), 2- 4-octilfenol (8,097 min). O gradiente de fase móvel, sendo o eluente A acetonitrila e eluente B água ultrapura, iniciou-se em 45% de B e permaneceu por 3,5 min, após variou de 45% a 90% de B em 0,5 min, no tempo 4,0 min aumentou para 100% de B e em 4,2 min, restabeleceu-se para a mesma proporção de eluentes inicial, de 45% de B, mantendo-se até final (tempo total da corrida 10,0 min). Fluxo: 0,120 mL/min, temperatura da coluna em 60°C, λ de excitação em 280 nm, λ emissão em 306 nm.

TABELA 8: Estudo de variabilidade entre triplicatas de amostras independentes coletadas na Baía de Todos os Santos.

	RSD		RSD		RSD	S.F CONDE 1	RSD		RSD		RSD
S JOAQUIM 1	(%)	ACUPE 1	(%)	CACHOEIRA 1	(%)		(%)	RIBEIRA 1	(%)	S AMARO 1	(%)
BPA	1,11	BPA	0,89	BPA	1,63	BPA	5,02	E3	0,77	BPA	3,44
4NOP	1,48	E2	2,11	E2	0,71	4NOP	2,70	4NOP	3,08	E2	4,87
		4NOP	1,70	4NOP	1,81					4NOP	3,40
S JOAQUIM 2		ACUPE 2		CACHOEIRA 2		S.F CONDE 2		RIBEIRA 2		S AMARO 2	
BPA	1,57	BPA	0,28	BPA	2,49	BPA	4,34	E3	4,23	BPA	1,71
4NOP	2,30	E2	0,63	E2	0,99	4NOP	6,91	4NOP	4,49	E2	2,56
		4NOP	1,52	4NOP	1,69					4NOP	1,86
S JOAQUIM 3		ACUPE 3		CACHOEIRA 3		S.F CONDE 3		RIBEIRA 3		S AMARO 3	
BPA	1,62	BPA	0,56	BPA	1,44	BPA	3,18	E3	1,33	BPA	3,73
4NOP	2,16	E2	2,41	E2	0,99	4NOP	2,31	4NOP	4,17	E2	3,73
		4NOP	3,23	4NOP	1,27					4NOP	1,01

Dentre os compostos estudados apenas alguns ocorreram em valores acima dos limites de detecção. Bisfenol A (BPA), β -estradiol (E2), estriol (E3) e 4n-octilfenol (4nOP) ocorreram em concentrações que variaram de 5 ng L⁻¹ em Santo Amaro a 18,3 ng L⁻¹ em Cachoeira para o hormônio E2, de 20 ng L⁻¹ do alquilfenol 4nOP na Ribeira a 135 ng L⁻¹ no estuário do rio Subaé (Santo Amaro), sendo este contaminante onipresente em todas as amostras analisadas. A concentração de 38 ng L⁻¹ de E3 foi encontrada apenas nas amostras da Ribeira. A presença de BPA foi detectada em todas as amostras exceto na Ribeira, em níveis que oscilaram entre 13 ng L⁻¹ no estuário do rio Paraguaçu em Cachoeira e aproximadamente 77 ng L⁻¹ no estuário do rio Subaé. De forma análoga, BPA e 17 β -estradiol foram detectados também em altas concentrações em amostras da nascente do rio na cidade de Campinas (Sodré et al, 2007). Esses resultados indicam que fontes associadas a descartes de esgotos são as maiores contribuições para a presença destes compostos nos corpos d'água.

Altas concentrações de BPA em águas superficiais foram previamente publicadas por *Jin* e colaboradores no estuário do rio Haihe, na China (JIN et al., 2004). Os autores encontraram uma concentração de 8 μ g L⁻¹, que foi atribuída a uma fonte pontual de poluição próxima a área da coleta. Comparativamente, essa concentração é cerca de mil vezes maior que a concentração encontrada em no estuário do Paraguaçu, em Cachoeira 13 ng L⁻¹. *McQuillan* et al. (2002) encontraram concentrações de BPA acima de 1,5 μ g L⁻¹ em amostras do rio Rio Grande, nos Estados Unidos. A maior concentração de BPA encontrada neste estudo foi no estuário do Subaé, em Santo Amaro, 77 ng L⁻¹, que pode ser atribuída a diferentes fontes de contaminação, uma vez que esta região é fortemente impactada por descargas de esgoto não tratado, resíduos sólidos, entre outros (Tabela 9).

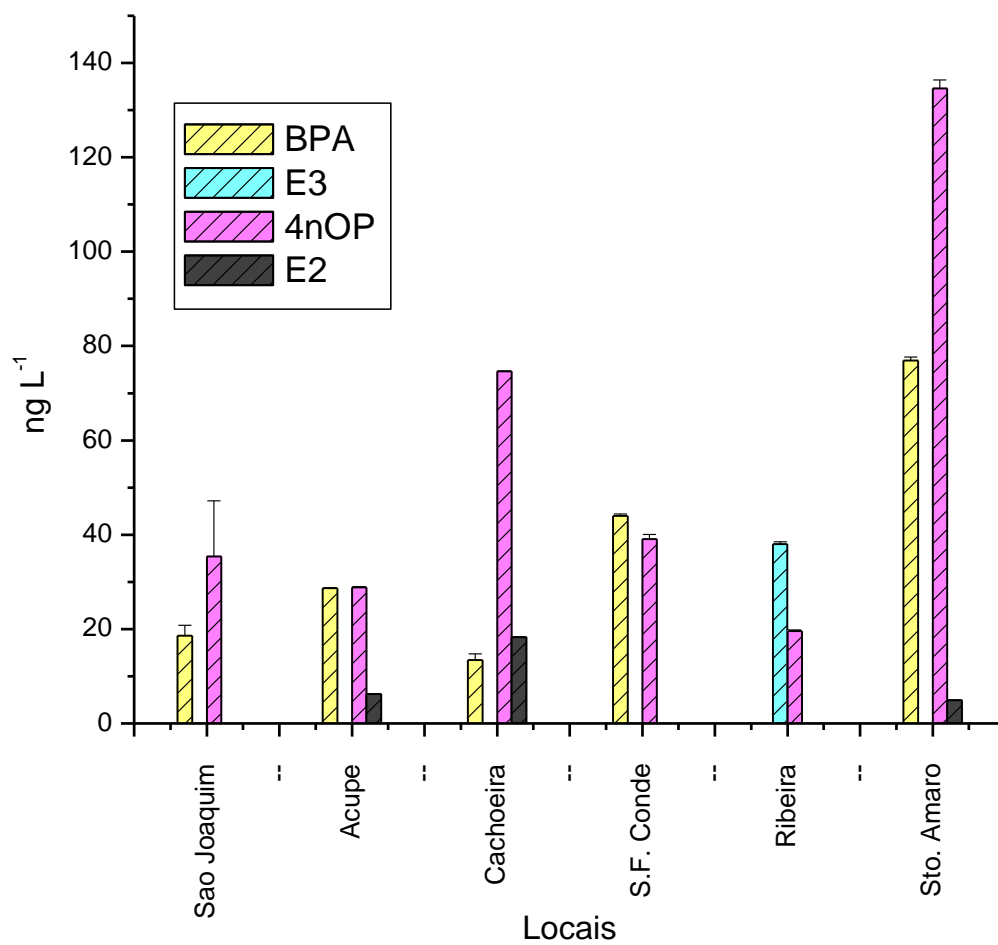


FIGURA 15 - Concentrações de IE em ng L⁻¹, detectadas em diferentes regiões do entorno da Baía de Todos os Santos. E2 em São Joaquim, Ribeira e S. F. Conde apresenta-se abaixo do LD.

Tabela 9 - Concentrações de IE encontradas nas amostras de água da Baía de Todos os Santos e em outras regiões do mundo.

Região \ IEs	BPA	E2	4nOP	E3	referência
São Joaquim	19 ± 2,2 ng L ⁻¹	<LQ	35 ± 11,8 ng L ⁻¹	<LQ	Este estudo
Acupe	29 ± 0,09 ng L ⁻¹	6 ± 0,06 ng L ⁻¹	29 ± 0,2 ng L ⁻¹	<LQ	Este estudo
Ribeira	<LQ	<LQ	20 ± 0,21 ng L ⁻¹	38 ± 0,52 ng L ⁻¹	Este estudo
S. F. Conde	44 ± 0,43 ng L ⁻¹	<LQ	39 ± 0,99 ng L ⁻¹	<LQ	Este estudo
S. Amaro	77 ± 0,80 ng L ⁻¹	5 ± 0,04 ng L ⁻¹	134 ± 1,81 ng L ⁻¹	<LQ	Este estudo
Cachoeira	13 ± 1,33 ng L ⁻¹	18 ± 0,03 ng L ⁻¹	75 ± 0,1 ng L ⁻¹	<LQ	Este estudo
Rio Haihe, China	8 µg L ⁻¹				Jin et al., 2004
Rio Grande, EUA	1,5 µg L ⁻¹				McQuillan et al., 2002
Baía de Tóquio		19 ng L ⁻¹			ministry of Enviroment, 1999
Rio Achziv , Israel			1,5 µg L ⁻¹		Zoller e Hushan 2000
Rio Gaaton, Israel			3 µg L ⁻¹		Zoller e Hushan 2000
Rio Naaman, Israel			1 µg L ⁻¹		Zoller e Hushan 2000
Rio Nagara, Japão	0,33 µg L ⁻¹				Funakoshi et al. 2009

No Brasil poucos dados existem acerca de contaminação por IE em águas costeiras, marinhas. Os dados existentes sobre IE são em sua maioria de água doce. *Sodré et al.*, (2010) investigaram a presença de IE em águas de torneira na cidade de

Campinas, estado de São Paulo. A técnica utilizada foi SPE-CG-MS para onze contaminantes emergentes, sendo seis deles (estigmasterol, colesterol, bisfenol A, cafeína, estrona, e 17β -estradiol) encontrados nas amostras. Estigmasterol apresentou uma concentração elevada, $0,34 \pm 0,13 \mu\text{g L}^{-1}$, seguido do colesterol $0,27 \pm 0,07 \mu\text{g L}^{-1}$ e BPA em $0,16 \pm 0,03 \mu\text{g L}^{-1}$. Estrona foi detectada apenas na estação seca em duas amostras a uma concentração de $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$. Nas amostras coletadas na BTS, no presente estudo não foi detectada a presença de estrona, pois esta encontra-se em níveis abaixo do limite de quantificação do método proposto.

8. CONCLUSÕES

Este trabalho contribuiu para o entendimento de um tema pouco estudado no país, que apresenta os primeiros resultados sobre IE em águas marinhas na tentativa de contribuir para o melhor entendimento da contribuição antrópica dos principais estuários da BTS em termos de alguns compostos considerados interferentes endócrinos. Os dados aqui apresentados podem ser utilizados como base norteadora para elaboração de uma legislação que contemple a presença desses novos compostos no meio aquático marinho, embora estudos adicionais sejam necessários a fim de que se conheçam os riscos referentes a exposição crônica causados pelos IEs, principalmente ao ser humano.

Os métodos cromatográfico e de extração/pré-concentração propostos para a determinação bisfenol A, 4-n-octifenol, 4-terc-octilfenol, 4-n-nonilfenol, estrona, estriol, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol em amostras de água do mar por cromatografia líquida de ultra velocidade com detector de fluorescência (UFLC- FLU) foram validados e mostraram-se eficientes para a determinação dos mesmos em amostras de água marinha, com limites de detecção e de quantificação compatíveis com os níveis de concentração dos IE no ambiente, relatados em literatura. Os parâmetros de validação verificados para o procedimento proposto com base em normas da IUPAC, ANVISA, INMETRO, Farmacopéia dos Estados Unidos e do ICH aumentaram a confiabilidade dos resultados apresentados, uma vez que ainda não se tem um método estabelecido para a determinação simultânea desses compostos em amostras de água do mar. Foram quantificados BPA, estrógenos e alquilfenóis em concentrações na ordem de nanogramas por litro (ng L⁻¹) de 17 β -estradiol (E2), estriol (E3), bisfenol A (BPA) e 4n-octilfenol (4nOP) em estuários da BTS, indicando que estes estão sendo emitidos para os corpos d'água da Baía de Todos os Santos (BTS) e que estes podem, provavelmente, estar participando/alterando o ciclo biogeoquímico de substâncias que ocorrem naturalmente no ambiente. Entretanto, considerando o número de amostras utilizadas nesse estudo, ainda é necessário estudos mais aprofundados, com maior número de amostras e considerando diferentes tipo de matrizes/amostras (tais como água do mar, material particulado em suspensão, biota e sedimento) da BTS para se tentar inferir com mais segurança quais podem ser os possíveis efeitos ambientais e de saúde de microrganismos marinhos e humana, acarretados pela presença dos IE no ambiente.

9. REFERÊNCIAS

ADAMS, N.R.: Natural and anthropogenic environmental estrogens: The scientific basis for risk assessment. Clover phyto-estrogens in sheep in Western Australia. **Pure Appl. Chem.** 70, 1855–1862, 1998.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE no 899, 2003.

AHEL M, GIGER W, KOCH M.: Behavior of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environments: IR Occurrence and transformation in sewage treatment. **Water Res;** 28(5):1131– 42, 1994.

AHERNE, G.W., ENGLISH, J., and MARKS, V.: The role of immunoassay in the analysis of microcontaminants in water samples. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 9, 79–83, 1985.

AHLBORG, U.G., LIPWORTH, L., TITUS-ERNUSTOFF, L., HSIEH, C.-C., HANBERG, A., BARON, J., TRICHOPOULOS, D., e ADAMI, H.O.: Organochlorine compounds in relation to breast cancer, endometrial cancer, and endometriosis: An assessment of the biological and epidemiological evidence. **Crit. Rev. Toxicol.** 25, 463–531. 1997.

ARCAND-HOY, L.D., NIMROD, A.C., and BENSON, W.H.: Endocrine-modulating substances in the environment: Estrogenic effects of pharmaceutical products. **Int. J. Toxicol.** 17, 139–158, 1998.

ASHBY, J.: A hierarchical approach to the evaluation of chemicals for estrogenic and other endocrine-disrupting properties. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 3, 87–90, 1997.

BARBER ED, TEETSEL NM, KOLBERG KF, & GUEST D.: A comparative study of the rates of in vitro percutaneous absorption of eight chemicals using rat and human skin. **Fundamental and Applied Toxicology**, 19:493-497. 1992

BENJAMIN L.L. TAN, DARRYL W. HAWKER, JOCHEN F. MÜLLER, FRÉDÉRIC D.L. LEUSCH, LOUIS A. TREMBLAY, HEATHER F. CHAPMANA.: Modelling of the fate of selected endocrine disruptors in a municipal wastewater treatment plant in South East Queensland, Australia. **Chemosphere** Vol 69, Issue 4, Pages 644–654, 2007.

BENJAMIN L.L. TAN, DARRYL W. HAWKERA, JOCHEN F. MÜLLER, FRÉDÉRIC D.L. LEUSCH, LOUIS A. TREMBLAY, HEATHER F. CHAPMAN.: Comprehensive study of endocrine disrupting compounds using grab and passive sampling at selected wastewater treatment plants in South East Queensland, Australia. **Environment International** Vol 33, Issue 5, Pages 654–669, 2007.

BEVANS, H.E., GOODBRED, S.L., MIESNER, J.F., WATKINS, S.A., GROSS, T.S., DENSLOW, N.D., AND SCHOEB, T.: Synthetic organic compounds and carp endocrinology and histology in Las Vegas Wash and Las Vegas and Callville Bays of Lake Mead, Nevada, 1992 and 1995: U.S. Geological Survey, **Water-Resources Investigations Report** 96–4266, 12 p. 1996.

BICCHI C., SCHILIRÒ T., PIGNATA C., FEA E., CORDERO C., CANALE F., GILLI G.: Analysis of environmental endocrine disrupting chemicals using the E-screen method and stir bar sorptive extraction in wastewater treatment plant effluents. **Science of The Total Environment**, Vol 407, Issue 6, Pages 1842–1851; 2009.

BILA D. M., DEZOTTI M.: Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 3, 651-666, 2007

BILES J. E., MCNEAL T. P., BEGLEY T. H., HOLLIFIELD H. C., Determination of Bisphenol-A in Reusable Polycarbonate Food-Contact Plastics and Migration to Food-Simulating Liquids. **J. Agric. Food Chem.**, 45 (9), pp 3541–3544, 1997.

BITMAN J., CECIL H.C, AND HARRIS S.J.: Biological Effects of Polychlorinated Biphenyls in Rats and Quail. **Environ Health Perspect.** 1: 145–149. 1972.

BOITSOV S., MJØS S. A, MÉIER S.: Identification of estrogen-like alkylphenols in produced water from offshore oil installations. **Chemosphere**, Volume 70, Issue 5, January 2008, Pages 858–864, 2008.

BORTONE, S.A., CODY, R.P.: Morphological masculinization in poeciliid females from a paper mill effluent receiving tributary of the St. Johns River, Florida, USA. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 63, 150–156, 1999.

BOSSIO J. P., HARRY J., KINNEY C. A.: Application of ultrasonic assisted extraction of chemically diverse organic compounds from soils and sediments, **Chemosphere.** (5):858-64. Epub 2007.

BOWMAN JC, XHOU JL, READMAN JW. Sediment–water interactions of natural estrogens under estuarine conditions. **Mar Chem** 2002;77:263–76

BRAUN P., MOEDER M., SCHRADER ST., POPP P., KUSCHK P., ENGEWALD W.: Trace analysis of technical nonylphenol, bisphenol A and 17 α -ethinylestradiol in wastewater using solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Marine Environmental Research**. Volume 64, Issue 5, Pages 651–665; 2007.

BROOKBANKS, E.O., WELCH, R.A.H., and COUP, M.R.: Estrogens in pasture and a possible relation with mastitis. **NZ Vet. J.** 17, 159–160, 1969.

CARLSEN, E., GIWERCMAN, A., KEIDING, N., and SKAKKEBAEK, N.E.: Declining sperm quality and increasing incidence of testicular cancer: Is there a common cause? **Environ. Health Perspect.** 130, 137–139, 1995.

CARWILE, ERIN; WAGNER, AMY K.; CRAGO, ELIZABETH; ALEXANDER, SHEILA A. ESTROGEN AND STROKE: *A Review of the Current Literature*, **Journal of Neuroscience Nursing** - Volume 41 - Issue 1 - pp 18-2, 2009.

CIRANO M., LESSA G.C.: oceanographic characteristics of baia de todos os santos, brazil, **Revista Brasileira de Geofísica** 25(4): 363-387. 2007.

COLBORN, T., DUMANOSKI, D., and MYERS, J.P.: *Our Stolen Future*. New York: **Plume Publishing**, 1997.

COUCEIRO, S. R. M., HAMADA, N., LUZ, S. L. B., FORSBERG, B. R., & PIMENTEL, T. P. Deforestation and sewage effects on aquatic macroinvertebrates in urban streams in Manaus, Amazonas, Brazil. **Hydrobiologia**, 575(1), 271–284. doi:10.1007/s10750-006-0373-z, 2007.

DARGNAT C., TEIL M.J., CHEVREUIL M., BLANCHARD M.: Phthalate removal throughout wastewater treatment plant: Case study of Marne Aval station (France). **Science of The Total Environment**, Vol 407, Issue 4, Pg 1235–1244, 2009.

DAUGHTON AND T.L. JONES-LEPP, EDS., *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues*. Washington, DC: **American Chemical Society**, pp. 116–140. 2001a.

DAUGHTON, C.G., and TERNES, T.A.: Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? **Environ. Health Perspect.** 107, 907–938, 1999.

DESBROW, C., ROUTLEDGE, E.J., BRIGHTY, G.C., SUMPTER, J.P., and WALDOCK, M. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. **Environ. Sci. Technol.** 32, 1549–1558, 1998.

EKELUND R., BERGMAN A., GRANMO A. AND BERGGREN M.: Bioaccumulation of 4-nonylphenol in marine animals are-evaluation. **Environ Pollut.** 64, 107–120, 1990.

EPA.,: Special report on environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis. Washington, DC: **Office of Research and Development.** EPA/630/R- 96/012, 1997.

EUROPEAN COMMISSION REPORT. IDENTIFICATION OF PRIORITY HAZARDOUS SUBSTANCES. Stockholm Convention 2001. Brussels, Adonis n. 901019; 2001;

FALCONER, I. R.: Are Endocrine Disrupting Compounds a Health Risk in Drinking Water?. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, 3(2), 180-184; 2006.

FERGUSON PL, IDEN CR, BROWNAWELL B J.: Distribution and fate of neutral alkylphenol metabolites in a sewage-impacted urban estuary. **Environ Sci Technol**; 35:2428–35, 2001.

STUART J.D, CAPULONG C. P, LAUNER K. D, PAN X.: Analyses of phenolic endocrine disrupting chemicals in marine samples by both gas and liquid chromatography– mass spectrometry. **J Chromatogr A** 2005;1079:136–45

FIAMEGOS Y. C, NANOS C.G., VERVOORT J., STALIKAS C. D.: Analytical procedure for the in-vial derivatization—extraction of phenolic acids and flavonoids in methanolic and aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective detection. **Journal of Chromatography A**, Vol 1041, Issues 1–2, Pages 11–18; 2004

FINE D. D., BREIDENBACH G.P., PRICE T. L., HUTCHINS S. R.: Quantitation of estrogens in ground water and swine lagoon samples using solid-phase extraction,

pentafluorobenzyl/trimethylsilyl derivatizations and gas chromatography–negative ion chemical ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** Vol 1017, Issues 1–2, Pages 167–185; 2003.

FISHER, A.L., KEASLING, H.H., and SCHUELER, F.W.: Estrogenic action of some DDT analogs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 81, 439–441; 1952.

FOLMAR, L.C., DENSLOW, N.D., RAO, V., CHOW, M., CRAIN, D.A., ENBLUM, J., MARCINO, J., and GUILLETTE L.J., JR.: Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. **Environ. Health Perspect.** 104,1096–1101. 1996.

FRY DM TOONE CK SPEICH SM.: Sex ratio skew and breeding patterns of gulls: demographic and toxilogical considerations. **Stud Avian Biol.**:10:26-43. 1987.

FRY DM, TOONE CK.: *DDT*-induced feminization of gull embryos. **Science**:213:922-924. 1981.

GARRISON, A.W., POPE, J.D., and ALLEN, F.R.: GC/MS analysis of organic compounds in domestic wastewaters. **Chem. Congr. North Am. Cont.**, pp. 517–556, 1975.

GARRITANO S., PINTO B., CALDERISI M., CIRILLO T., AMODIO-COCCHIERI R., REALI D.: Estrogen-like activity of seafood related to environmental chemical contaminants. **Environmental Health: A Global Access Science Source**, 5:9 2006.

GÄRTNER, S.; BALSKEY, M.; KOCH, M.; NEHLS, I.: Analysis and Migration of Phthalates in Infant Food Packed in Recycled Paperboard. **J. Agric. Food Chem.**, 57, 10675–10681, 2009.

GATIDOU G., THOMAIDIS N. S., STASINAKIS A. S., LEKKAS T. D.: Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** Vol 1138, Issues 1–2, Pages 32–4; 2007.

GHISELLI G., JARDIM W. F.: Interferentes endócrinos no ambiente. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 3, 695-706, 2007.

GILL, W.B., SCHUMACHER, F.B., BIBBO, M., STRAUS, F.H., and SCHOENBERG, H.W.: Association of diethylstilbestrol exposure in utero with cryptorchidism, testicular hypoplasia and semen abnormalities. **J. Urol.** 122, 36–39, 1979.

GILLESBY, B.E., e ZACHAREWSKI, T.R.: Exoestrogens: mechanisms of action and strategies for identification and assessment. **Environ. Toxicol. Chem.** 17, 3–14, 1998.

GRAY LE JR, KELCE WR, WIESE T, TYL R, GAIDO K, COOK J, KLINEFELTER G, DESAULNIERS D, WILSON E, ZACHAREWSKI T, WALLER C, FOSTER P, LASKEY J, REEL J, GIESY J, LAWS S, MCLACHLAN J, BRESLIN W, COOPER R, DI GIULIO R, JOHNSON R, PURDY R, MIHAICH E, SAFE S, SONNENSCHIN C, WELSHONS W, MILLER R, MCMASTER S, COLBORN T.: Endocrine Screening Methods Workshop report: Detection of estrogenic and androgenic hormonal and antihormonal activity for chemicals that act via receptor or steroidogenic enzyme mechanisms. **Reprod Toxicol** 11:719-750. 1997.

GUILLETTE LJ(JR), GROSS TS, MASSON GR, MATTER JM, FRANKLIN PERCIVAL H, WOODWARD AR.: Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. **Environ Health Perspect.**;102:680-688.1994.

GUO Z., FENG R.: Ultrasonic irradiation-induced degradation of low-concentration bisphenol A in aqueous solution. **Journal of Hazardous Materials** Vol 163, 2–3, Pages 855–860; 2009.

HALDEN ROLF U. AND PAULL DANIEL H.: Analysis of Triclocarban in Aquatic Samples by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry, **Environ. Sci. Technol.**, 38 (18), pp 4849–4855; 2004.

HALLING, SORENSEN, B., NIELSEN, S.N., LANZKY, P.F., INGERSLEV, F., LUTZHOFT, H.C.H., and JORGENSEN, S.E.: Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—A review. **Chemosphere** 36, 357–393. 1998.

HARRIES JE, SHEAHAN DA, JOBLING S, MATTHIESSEN P, NEALL P, SUMPTER JP, TYLOR T, ZAMAN N.: Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. **Environ Toxicol Chem** 16:534–542, (1997);

HARRIS C A, HENTTU P, PARKER M G, AND SUMPTER J P.: The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. **Journal of Chromatography A**, Volume 988, Issue 1, Pages 41–51; 2003.

HASHIMOTO Y., KAWAGUCHI M., MIYAZAKI, NAKAMURA.: Estrogenic activity of tissue conditioners in vitro. **Environ Health Perspect**; 105(8): 802–811. 1997.

HAYES TB, COLLINS A, LEE M.: Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. **P Natl Acad Sci. USA** 99: 5476–80. 2002a.

HERBST, A.L., ULFELDER, H., POSKANZER, D.C.: Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbesterol therapy with tumor appearance in Young women. **N. Engl. J. Med.** 284, 878–881, 1971.

HIGNITE, C., e AZARNOFF, D.L.: Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. **Life Sci.** 20, 337–341, 1977.

HORN O., NALLI S., COOPER D., NICELL J.: Plasticizer metabolites in the environment. **Water Research**, Vol 38, Issue 17, Pages 3693–3698; 2004.

HUANG, C.-H., and SEDLAK, D.L.: Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. **Environ. Toxicol. Chem.** 20, 133–139, 2001.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - *Atlas de saneamento 2011* – **Min. do Planejamento, Orçamento e Gestão**, ISBN 978-85-240-4202-7

IBGE.(2002). Pesquisa Nacional de Saneamento Básico - 2000. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <http://www.>

ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoodevida/ pnsb/pnsb.pdf. Acessado em 20/11/2010.

ICH - International Conference on Harmonisation, Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology, Q2A (CPMP/ICH/381/95), 1995.

IMAI, SHOKO. KOYAMA, JIRO. FUJII, KAZUNORI.: Effects os 17 β -estradiol on the reproduction of Java-medaka (*Oryzias javanicus*), a new test fish species. **Marine Pollution Bulletin**, 51 708-714, 2005.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, **DOQ-CGCRE-008**, 2003.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, **DOQ-CGCRE-008**, 2007.

ISIDORI M., LAVORGNA M., NARDELLI A., PARRELLA A.: Toxicity on crustaceans and endocrine disrupting activity on *Saccharomyces cerevisiae* of eight alkylphenols. **Chemosphere**, Vol 64, Issue 1, Pages 135–143; 2006.

IUPAC Technical Report, Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis, Prepared for publication by Michael Thompson, Stephen L. R. Ellison, Roger Wood, **Pure Appl. Chem.**, Vol. 74, No. 5, pp. 835–855, 2002.

JEANNOT M. A., CANTWELL F.F.: Mass Transfer Characteristics of Solvent Extraction into a Single Drop at the Tip of a Syringe Needle. **Anal. Chem.**, 1997, 69 (2), pp 235–239; 1997.

JENKINS, R., ANGUS, R.A., MCNATT, H., HOWELL, W.M., KEMPPAINEN, J.A., KIRK, M., and WILSON, E.M.: Identification of androstenedione in a river containing paper mill effluent. **Environ. Toxicol. Chem.** 20, 1325–1331, 2001.

JOBLING, S., NOLAN, M., TYLER, C. R., BRIGHTY, G. AND SUMPTER, J. P.: Widespread sexual disruption in wild fish. **Environ. Sci. Technol.** 32: 2498-2506. 1998.

JOHNSON A. C., SUMPTER J. P.: Removal of Endocrine-Disrupting Chemicals in Activated Sludge Treatment Works. **Environ. Sci. Technol.**, 35 (24), pp 4697–4703; 2001.

KAUFMANN A., BUTCHER P.: Segmented post-column analyte addition; a concept for continuous response control of liquid chromatography/mass spectrometry peaks affected by signal suppression/enhancement. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Vol 19, Issue 5, pages 611–617, 15 March 2005.

KAWAGUCHI M., ITO R., ENDO N., OKANOUCI N., SAKUI N., SAITO K., NAKAZAWA H.: Liquid phase microextraction with in situ derivatization for measurement of bisphenol A in river water sample by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Vol 1110, Issues 1–2, Pages 1–5, 2006.

KEITH, T.L., S.A. SNYDER, C.G. NAYLOR, C.A. STAPLES, C. SUMMER, K. KANNAN AND J.P. GIESY.: Identification and quantitation of nonylphenol ethoxylates and nonylphenol in fish tissues from Michigan. **Environ. Sci. Technol.** 35:10-13, 2001.

KOMAREK K., SAFARIKOVA M., HUBKA T., SAFARIK I., KANDELOVA M., KUJALOVA H.: Extraction of Alkylphenols and Nonylphenol Mono- and Diethoxylates from Water Using Magnetically Modified Adsorbents. **CHROMATOGRAPHIA**, Vol 69, Numbers 1-2, 133-137;

KÖRNER W., HANF V., SCHULLER W., KEMPTER C., METZGER J., HAGENMAIER H. Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents. **Science of The Total Environment**, Vol 225, Issues 1–2, Pages 33–48; 1999.

KRISHNAN, V., e SAFE, S.: Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), and dibenzofurans (PCDFs) as antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells: Quantitative structure–activity relationships. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 120, 55–61, 1993.

KUCH H. M., BALLSCHMITER K.: Determination of endogenous and exogenous estrogens in effluents from sewage treatment plants at the ng/L-level, **fresenius' journal of analytical chemistry**, Volume 366, Number 4, 392-395; 2000.

LARSEN S. T., LUND R. M., NIELSEN G. D., THYGESEN P., POULSEN O. M.: Adjuvant Effect of di-n-Butyl-, di-n-Octyl-, di-iso-Nonyl- and di-iso-Decyl Phthalate in a Subcutaneous Injection Model Using BALB/c Mice. **Pharmacology & Toxicology**, Vol 91, Issue 5, pages 264–272, 2002.

LARSSON, D.G.J., HALLMAN, H., and FORLIN, L.:(2000) More male fish near a pulp mill. **Environ. Toxicol. Chem.** 19, 2911–2917, 2000.

LEE P. C., LEE W.: In Vivo Estrogenic Action of Nonylphenol in Immature Female Rats. **bulletin of environmental contamination and toxicology**, Vol 57, Number 3, 341-348; 1996.

LEE, H.-B., and PEART, T.E.: Determination of 17-beta-estradiol and its metabolites in sewage effluent by solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. **J. AOAC Int.** 81, 1209–1216, 1998.

LEVIN, E., BURNS, J.F., and COLLINS, V.K.: Estrogenic, androgenic, and gonadotropic activity in wheat-germoil. **Endocrinology** 49, 289–301,1951.

LEVINSON M. I.: *Handbook of Detergents, Part F, Chapter 1. Surfactant Production Present Realities and Future Perspectives*, 2008.

LI R., CHEN G-Z., TAM N. F. Y., LUAN T-G., SHIN P. K.S., CHEUNG S.G., LIU Y.: Toxicity of bisphenol A and its bioaccumulation and removal by a marine microalga *Stephanodiscus hantzschii*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Volume 72, Issue 2, Pages 321–328, 2009.

LINTELMANN J, A. KATAYAMA, N. KURIHARA, L. SHORE, e A. WENZEL.: endocrine disruptors in the environment (IUPAC technical report). **Pure Appl. Chem.**, Vol 75, n. 5, 631-681; 2003.

LOPES L. G., MARCHI M. R. R., SOUZA J. B. G., MOURA J. A., LORENZON C. S., CRUZ C., AMARAL L. A.: estrogênios em águas naturais e tratadas da região de jaboticabal – são paulo. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 3, 639-643, 2010.

MALDANER L., JARDIM I. C. S. F.: O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 1, 214-222, 2009

MARAGOU N. C., LAMPI E., THOMAIDIS N.S., KOUPPARIS M. A.: Determination of bisphenol A in milk by solid phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1129 , 165–173, 2006.

MARKEY (2001) **The Handbook of Environmental Chemistry**, Vol. 3, Part L, Endocrine Disruptors, Part I, Chapter 7;

MARTINS, C. C., FERREIRA, J. A., TANIGUCHI, S., MAHIQUES, M. M., BÍCEGO, M. C., & MONTONE, R. C. Spatial distribution of sedimentary linear alkylbenzenes and faecal steroids of Santos Bay and adjoining continental shelf, SW Atlantic, Brazil: origin and fate of sewage contamination in the shallow coastal environment. **Marine Pollution Bulletin**, 56(7), 1359–1363. 2008.

METZLER E PFEIFFER.: **The Handbook of Environmental Chemistry** Vol. 3, Part L, Endocrine Disruptors, Part I, Chapter 4; 2001.

METZLER, M., PFEIFFER, E.: Effects of estrogens on microtubule polymerization in vitro: Correlation with estrogenicity. **Environ. Health Perspect.** 103, 21–22. 1995.

MILLER W.: *Androgen synthesis in adrenarche reviews in endocrine & metabolic disorders*, Volume 10, Number 1, 2009.

MILLINGTON, A.J., FRANCIS, C.M., and MCKEOWN, N.R.: *Wether* bioassay of annual pasture legumes. II. The estrogenic activity of nine strains of *Trifolium subterraneum* L. Aust. **J. Agr. Res.** 15, 527–536, 1964.

Ministry of Environment, 1999. **Survey of EDCs in the environment**, p. 83.

MUELLER, G. C. AND KIM.: U.-H. Displacement of estradiol from estrogen receptors by simple alkyl phenols. **Endocrin.** 102: 1429-1435, 1978.

MÜLLER S., MÖDER M., SCHRADER S., POPP P.: Semi-automated hollow-fibre membrane extraction, a novel enrichment technique for the determination of biologically active compounds in water samples. 25th International Symposium on Capillary Chromatography. **Journal of Chromatography A**, Vol 985, Issues 1–2, Pages 99–106 2003.

MUNKITTRICK, K.R., SERVOS, M.R., CAREY, J.H., and VAN DER KRAAK, G.J.: Environmental impacts of pulp and paper wastewater: Evidence for a reduction in environmental effects at North American pulp mills since 1992. **Water Sci. Technol.** 35, 329–338, 1997.

NAKAJIMA N., TERAMOTO T., KASAI F., SANO T., TAMAOKI M., AONO M., KUBO A., KAMADA H., AZUMI Y., SAJI H.: Glycosylation of bisphenol A by freshwater microalgae. **Chemosphere**, Vol 69, Issue 6, October 2007, Pages 934–941; 2007.

NALLI S., COOPER D. G., NICELL J. A.: Biodegradation of plasticizers by *Rhodococcus rhodochrous*, **Biodegradation**, Vol 13, Number 5, 343-352;

NETO, B. B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica – Parte 1. Fundamentos e calibração com um componente (Calibração Univariada), **Química Nova**, 25, 5, 856-865, 2002.

NIMROD A. C., BENSON W. H.: ENVIRONMENTAL ESTROGENIC EFFECTS OF ALKYLPHENOL ETHOXYLATES, **Critical Reviews in Toxicology**, Vol. 26, No. 3, Pages 335-364, 1996.

NORDIC COUNCIL OF MINISTERS. Chemicals with Estrogen-like Effects. Store Strandstraede 18, DK-1255 Copenhagen K., 580T (1996);

NUTI F., HILDENBRAND S., CHELLI M., WODARZ R., PAPINI A. M.: Synthesis of DEHP metabolites as biomarkers for GC–MS evaluation of phthalates as endocrine disrupters, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Volume 13, Issue 10., Pages 3461–3465, 2005.

OUELLET M, BONIN J, RODRIGUE J.: Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free living anurans from agricultural habitats. **J Wildlife Dis** 33: 95–104. 1997.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S.; REYES, F. G. R.: Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, **Quim. Nova**, 31 (5) (2008) 1190.

PATROLECCO L., CAPRI S., DE ANGELIS S., POLESELLO S., VALSECCH S.: Determination of endocrine disrupting chemicals in environmental solid matrices by

extraction with a non-ionic surfactant (Tween 80), **Journal of Chromatography A**, Volume 1022, Issues 1–2, Pages 1–7, 2004.

PETER PAULOS P., RUNNALLS T. J., NALLANI G., LA POINT T., SCOTT A. P., SUMPTER J. P., HUGGETT D. B.: Reproductive responses in fathead minnow and Japanese medaka following exposure to a synthetic progestin, Norethindrone. **Aquatic Toxicology**, Volume 99, Issue 2, Pages 256–262, 2010

PFEIFER T., TUERK J., BESTER K., SPITELLER M.: Determination of selected sulfonamide antibiotics and trimethoprim in manure by electrospray and atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry, **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Volume 16, Issue 7, pages 663–669, 2002.

PICARD K., LHUGUENOT J-C., CANIVENC M-C. L., CHAGNON M-C.: Estrogenic Activity and Metabolism of N-Butyl Benzyl Phthalatein Vitro: Identification of the Active Molecule(s), **Toxicology and Applied Pharmacology**, Volume 172, Issue 2, Pages 108–118, 2001

POJANA G, BUSETTI F, COLLARIN A, BONFÀ A, MARCOMINI A.: Determination of natural and synthetic estrogenic compounds in coastal lagoon waters by HPLC–electrospray-mass spectrometry. **Int J Environ Anal Chem** 2004a;84:717–27.

PORTE C., JANER G., LORUSSO L.C., ORTIZ-ZARRAGOITIA M., CAJARAVILLE M.P., FOSSI M.C., CANESI L.: Comparative Biochemistry and Physiology Part C: **Toxicology & Pharmacology**, vol 143, Issue 3, Pages 303–315, 2006

POSTIGO. **The Handbook of Environmental Chemistry**, 18; 2009.

PURDOM, C. E., HARDIMAN, P. A., BYE, V. J., ENO, N. C., TYLER, C. R. AND SUMPTER, J. P.: Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. **Chem. Ecol.** 8: 275-285. 1994.

QUEDNOW K., PÜTTMANN W.: Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives, **Environmental Science and Pollution Research**. Vol 16, Number 6,

RIBANI M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F, MELO, L. F. C., validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, **Química Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2004

RICCIARDI F., MATOZZO V., MARIN M.G.: Effects of 4-nonylphenol exposure in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and crabs (*Carcinus aestuarii*) with particular emphasis on vitellogenin induction, **Marine Pollution Bulletin**, Volume 57, Issues 6–12, Pages 365–372, 2008.

RIPPEN (1998) Ecobase Media Explorer (**ECOMED**); 1998.

RODRIGUEZ-MOZAZ S, LOPEZ DE ALDA MJ, BARCELÓ D.: Picogram per liter level determination of estrogens in natural waters and waterworks by a fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method. **Anal Chem.**;76(23):6998-7006, 2004.

RUMSEY, T.S., e HAMMOND, A.C.: Effects of intake level on metabolic response to estrogenic growth promoters in beef steers. **J. Anim. Sci.** 68, 4310–4318. 1990.

SAFE, S.H., GAIDO, K.: Phytoestrogens and anthropogenic estrogenic compounds. **Environ. Toxicol. Chem.** 17, 119–126. 1998.

SCHLÜSENER M. P.: Steroid hormones and Macrocyclic antibiotics - the reasons for the feminization of fish, seminar, determination of degradation balances of substances from personal care products, and hormones in sewage treatment plants, University of Duisburg-Essen, Germany, 18.10.2005.

SCOTT R, DUGARD P, RAMSEY J, & RHODES C.: In Vitro absorption of some o-phthalate diesters through human and rat skin. **Environ. Health Perspect.** 74: 223-227 Plus Errata. 1987.

SETCHELL, K.D.R., GOSSELIN, S.J., WELSH, M.B., JOHNSTON, J.O., BALISTRERI, W.F., KRAMER, L.W., DRESSER, B.L., and TARR, M.J.: Dietary estrogens—A probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs. **Gastroenterology** 93, 225–233, 1987.

SHARPE, R.M., and SKAKKEBAEK, N.E. (1993). Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? **Lancet** 341, 1392–1395, 1993.

SHIMADA K, MITAMURA K, HIGASHI T.: Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids. **Journal of Chromatography A**. Vol: 935, Issue: 1-2, Publisher: Elsevier, Pages: 141-172, 2001.

SNYDER S.A.; KEITH T.L.; PIERENS S.L.; SNYDER E.M.; GIESY J.P.: Bioconcentration of nonylphenol in fathead minnows (*Pimephales promelas*) **Chemosphere**, Vol 44, Number 8, pp. 1697-1702(6), 2001.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. Practical HPLC method development. 2. ed. New York: **J. Wiley**, 1997. p. 694-697.

SNYDER, S.A., KEITH, T.L., VERBRUGGE, D.A., SNYDER, E.M., GROSS, T.S., KANNAN, K., and GIESY, J.P.: Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. **Environ. Sci.Technol.** 33, 2814–2820, 1999.

SNYDER, S.A., KELLY, K.L., GRANGE, A.H., SOVOCOL, G.W., SNYDER, E.M., and GIESY, J.P.: Pharmaceuticals and personal care products in the waters of Lake Mead, Nevada. In C.G. **Environ. Health Perspect** 2001a.

SNYDER, S.A., VILLENEUVE, D.L., SNYDER, E.M., AND GIESY, J.P.: Identification and quantification of estrogen receptor agonists in wastewater effluents: **Environmental Science and Technology**, v. 35, p. 3620–3625. 2001.

SODRÉ (2007) Interferentes endócrinos e o meio ambiente. **Caderno Temático da Soc. Bras. de Química**, volume 6;

SODRÉ F. F., LOCATELLI M. A. F., E JARDIM, W. F.: Sistema limpo em linha para extração em fase sólida de contaminantes emergentes em águas naturais. **Quim. Nova**: Vol. 33, No. 1, 216-219, 2010

SODRÉ, F. F., & GRASSI, M. T.: Changes in copper speciation and geochemical fate in freshwaters following sewage discharges. **Water, Air, and Soil Pollution**, 178(1– 4), 103–112, 2007.

SOTO, A. M., JUSTICIA, H., WRAY, J. W. AND SONNENSCHNEIN, C.: p-Nonylphenol, an estrogenic xenobiotic released from 'modified' polystyrene. **Environ. Health Persp.** 92: 167-173, 1991.

SOWER, S.A., SCHRECK, C.B., and EVENSON, M.: Effects of steroids and steroid antagonists on growth, gonadal development, and RNA/DNA ratios in juvenile steelhead trout. **Aquaculture** 32, 243–254, 1983.

SPARLING DW, PENSACOLA FL, LINDER G, AND BISHOP CA.: Ecotoxicology of amphibians and reptiles.: **Society of Environmental Toxicology & Chemistry**, 2000.

SPOONER, N., P. GIBBS, G. BRYAN, L. GOAD.: The effect of tributyltin upon steroid titers in the female dog whelk, *Nucella lapillus*, and the development of imposex Mar. **Environ. Research.** 32 37-49 p Year.1991.

STONE, R.: Environmental estrogens stir debate. **Science** 265, 308–310. 1994

STRECK G.: Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Volume 28, Issue 6, Pages 635–652, 2009.

STUMM-ZOLLINGER, E., e FAIR, G.M.: Biodegradation of steroid hormones. **J. Water Pollut. Cont. Fed.** 37, 1506–1510, 1965.

SUMPTER J. P.: Xenoendocrine disrupters — environmental impacts. **Toxicology Letters Volumes** 102–103, Pages 337–342, 1998.

SUMPTER J.P.: Xenoendocrine disrupters — environmental impacts, **Toxicology Letters**, Volumes 102–103, Pages 337–342, 28 December 1998.

SUMPTER, J.P., AND JOHNSON, A.C.: Lessons from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment: **Environmental Science and Technology**, v. 39, p. 4321–4332. 2005.

SWARTZ, M. E.; Ultra performance liquid chromatography (UPLC): An introduction, **LCGC North Am. Suppl.**, S (2005).

TABAK, H.H., and BUNCH, R.L.: Steroid hormones as water pollutants. I. Metabolism of natural and synthetic ovulation-inhibiting hormones by microorganisms of activated sludge and primary settled sewage. **Dev. Ind. Microbiol.** 11, 367–376. 1970.

TABAK, H.H., BLOOMHUFF, R.N., and BUNCH, R.L.: Steroid hormones as water pollutants II. Studies on the persistence and stability of natural urinary and synthetic ovulation-inhibiting hormones in untreated and treated wastewaters. **Dev. Ind. Microbiol.** 22, 497–519, 1981.

TERNES T.A , STUMPF M. , MUELLER J., HABERER K., WILKEN R.-D, SERVOS M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants — I. Investigations in Germany, Canada and Brazil, **Science of The Total Environment**, Volume 225, Issues 1–2, Pages 81–90; 1999.

TOZE, S.: Reuse of effluent water-benefits and risks. **Agric Water Manage** 80, 147-159; 2006.

UNITED STATES CONSUMER PRODUCT SAFETY COMMISSION (CPSC). Test Method: Standard Operating Procedure for Determination of Phthalates. 2009. CPSC **CHC1001-09.1**

UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION; US Pharmacopeia 24, Validation of Compendial Methods, 1225, **Rockville**, 1999.

VESSMAN, J; STEFAN, R.I; STADEN, J.F.V et al. Selectivity in analytical chemistry (IUPAC recommendation). **Pure and applied chemistry**, v 73, n:8, p 1381-1386, 2001.

WALKER, B. S. AND J. C. JANNEY. Estrogenic substances II. An analysis of plant sources. **Endocr.** 14:389. 1930.

WHITE, R., JOBLING, S., HOARE, S. A., SUMPTER, J. P. AND PARKER, M. G.: Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. **Endocrin.** 135: 175-182. 1994.

WRENN, T.R., WOOD, J.R., FRIES, G.F., and BITMAN, J.: Tests of estrogenicity in rats fed low levels of o,p'DDT. Bull. **Environ. Contam. Toxicol.** 5, 61–66; 1970.

XU J., WANG P., GUO W., DONG J., WANG L., DAI S.: Seasonal and spatial distribution of nonylphenol in Lanzhou Reach of Yellow River in China. **Chemosphere** Volume 65, Issue 9, Pages 1445–1451, 2006.

YAMAGISHI T, HASHIMOTO S, KANAI M, OTSUKI A (1997) Identification and determination of polyoxyethylene nonionic surfactants by HPLC/atmospheric pressure chemical ionization-MS, and its application to river water samples. **Bunseki Kagaku** 46:537–547 (in Japanese).

YING G-G, KOOKANA RS, RU Y-J.: Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. **Environment International** 28: 545-551, 2002.

YING G-G, TOZE S, HANNA J, YU X-Y, DILLON PJ, KOOKANA RS.: Decay of endocrine-disrupting chemicals in aerobic and anoxic groundwater. **Water Research** 42: 1133-1141, 2008.

YU Y., HUANG Q., CUI J., ZHANG K, TANG C., PENG X. Determination of pharmaceuticals, steroid hormones, and endocrine-disrupting personal care products in sewage sludge by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry** Volume 399, Number 2, 891-902. 2011.