



Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental
Mestrado em Engenharia Ambiental



Rafaela Maria Queiroz Silva

**EXTRAÇÃO POR PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA PARA
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE MICROCONTAMINANTES DE
PREOCUPAÇÃO EMERGENTE EM ESGOTO BRUTO TOTAL POR CG/EM**

Ouro Preto, MG

2018



Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental
Mestrado em Engenharia Ambiental



Rafaela Maria Queiroz Silva

**EXTRAÇÃO POR PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA PARA
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE MICROCONTAMINANTES DE
PREOCUPAÇÃO EMERGENTE EM ESGOTO BRUTO TOTAL POR CG/EM**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Área de Concentração: Meio Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Robson José de Cássia Franco
Afonso

Ouro Preto, MG

2018

S586a

Silva, Rafaela Maria Queiroz.

Extração por partição em baixa temperatura para determinação simultânea de microcontaminantes de preocupação emergente em esgoto bruto total por CG/EM [manuscrito] / Rafaela Maria Queiroz Silva. - 2018.

104f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Robson José de Cássia Franco Afonso.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. PROAMB. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.

Área de Concentração: Meio Ambiente.

1. Microcontaminantes de preocupação emergente. 2. Extração com partição em baixa temperatura (EPBT). 3. Esgoto bruto. 4. Cromatografia gasosa (CG). 5. Espectrometria de Massas (EM). I. Afonso, Robson José de Cássia Franco. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 502



UFOP
Universidade Federal
de Ouro Preto

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – PROAMB



EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA PARA
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE MICROCONTAMINANTES DE PREOCUPAÇÃO
EMERGENTE NO ESGOTO BRUTO TOTAL POR CG/EM

Autora: Rafaela Maria Queiroz Silva

Dissertação defendida e aprovada, em 10 de outubro de 2018, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Robson José de Cássia Franco Afonso - Orientador
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dra. Renata Pereira Lopes Moreira
Universidade Federal de Viçosa

Prof. Dr. Sérgio Francisco de Aquino
Universidade Federal de Ouro Preto

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por guiar meus passos e me sustentar nos momentos de desespero, cansaço e angústia.

Aos meus pais José Geraldo e Sônia, pelo apoio incondicional, por nunca me deixarem desistir mesmo quando o medo se instaurou, pelas palavras de incentivo, pelos puxões de orelha e pela paciência durante todo este percurso. Aos meus irmãos Sheila e Paulo, pela torcida e por nunca me deixarem desistir. Ao meu sobrinho Luís Henrique, pelos olhares e abraços que me acalmam em qualquer situação. Amo muito vocês e lhes devo essa conquista!

Ao meu noivo Charles, companheiro de horas boas e ruins, que sempre me incentiva a correr atrás dos meus sonhos, que me acompanhou no laboratório independente do dia e da hora, que me faz sorrir mesmo em dias difíceis... Obrigada por tudo! Essa vitória também é sua! Te amo!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Robson José de Cássia Franco Afonso, pela oportunidade, amizade e ensinamentos.

À Ananda Sanson, minha quase “co-orientadora”, pela paciência, ensinamentos e por ter me acompanhado e guiado durante as etapas deste trabalho. Serei eternamente grata!

Aos amigos do laboratório de Caracterização Molecular e Espectrometria de Massas: Prof. Maurício, André, Daniel, Alexandre, Daiana, Mylena, Nádia, obrigada pelo apoio nesta caminhada. Em especial à Camila, por todas as conversas, ensinamentos e palavras de apoio.

Aos meus amigos de jornada Proambers: Andressa, Éverton, Grazi, Isa, Luísa, Paulinho, Paulo Bernardo, Raquel, Ricardo e Saha, obrigada por serem a melhor turma! Em especial à Lud, por me acalmar quando necessário, por deixar meus almoços mais divertidos e por sempre me fazer acreditar que seria possível! Ao Raphael por abrir as portas da ETE Marzagão e por todo apoio e profissionalismo.

Aos meus amigos por estarem sempre na torcida! Em especial à Pri, pela irmandade, pelas ajudas no lab, pelas risadas que deixaram o caminho mais leve e pelo apoio de sempre!

Aos meus amigos da Vale, em especial ao Carlinhos e Vinícius, pela torcida!

À CAPES, a todos do ProAmb e à UFOP.

Enfim, obrigada a todos que torceram por mim e fizeram parte dessa etapa da minha vida.

“Tudo posso Naquele que me fortalece. ”

Filipenses 4:13

RESUMO

Microcontaminantes de preocupação emergente consistem em um grupo de compostos orgânicos amplamente encontrados em matrizes ambientais em níveis traços. Os possíveis efeitos adversos em humanos e na vida aquática a eles expostos, além de comprometer a qualidade dos corpos hídricos, despertou a preocupação de diversas agências internacionais. Neste grupo encontram-se diferentes classes de contaminantes, como fármacos e produtos de higiene pessoal, poluentes orgânicos persistentes, medicamentos de uso veterinário, desreguladores endócrinos e nanomateriais. A principal rota de contaminação ambiental é o lançamento de esgotos *in natura* e tratado em corpos d'água. As Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) podem não ser eficazes no tratamento e remoção desses compostos. Esse problema associado ao déficit de infraestrutura em saneamento resulta na presença destes compostos em diversas matrizes ambientais e justifica a necessidade de seu monitoramento. O presente trabalho apresenta o desenvolvimento do método de extração com partição em baixa temperatura (EPBT) para a determinação simultânea de microcontaminantes das frações sólidas e solúvel em amostras de esgoto doméstico bruto, dentre eles, os fármacos ibuprofeno, paracetamol, diclofenaco e naproxeno, os hormônios naturais e sintéticos estrona, estradiol e etinilestradiol e os fenóis bisfenol A, 4-nonilfenol e 4-octilfenol. Foram avaliadas condições de extração, por um planejamento fatorial completo com ponto central, para a razão entre volume de amostra e volume de solvente extrator e o pH da amostra, determinando-se as melhores condições para maiores recuperações para a maioria dos analitos. Assim, a extração foi realizada em amostras com pH ajustado em 2,0, usando o volume de 4 mL de amostra de esgoto, adicionando a ela três porções de 3 mL de acetonitrila utilizada como solvente extrator e resfriamento por 3 horas a -20 °C para cada extração. Os extratos foram secos em N₂ gasoso e submetidos à reação de derivatização por silição e posterior análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). O método foi validado por diversas figuras de mérito, entre elas: a linearidade, com faixas de trabalho de 2,5 a 200 µg/L, apresentando coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,97; limites de detecção e quantificação do método, variando de 0,36 a 25,07 ng/L e 1,20 a 83,56 ng/L, respectivamente; precisão, onde os coeficientes de variação variaram de 0,63 e 12,02% para os ensaios de repetibilidade e 0,95 a 19,95% para os ensaios de precisão intermediária; exatidão e efeito matriz foram avaliados a partir da amostra autêntica e *spike* de extratos. O método validado é considerado preciso e exato para os analitos ibuprofeno, 4-octilfenol, 4-nonilfenol, diclofenaco, naproxeno, bisfenol A, os quais apresentam valores médios de recuperação

variando entre 81,14 a 116,32%. O método foi considerado semi-quantitativo para os demais analitos (paracetamol, estrona, estradiol e etinilestradiol) devido às elevadas recuperações encontradas para o paracetamol e a ausência de recuperação em alguns níveis de concentração estudados para os hormônios citados. O método validado foi aplicado em amostras de esgoto submetidas ao processo de filtração a vácuo e comparadas às amostras de esgoto bruto, podendo-se observar que a afinidade dos microcontaminantes com o meio é regida por suas propriedades físico-químicas. Amostras autênticas de esgoto bruto e efluentes do reator UASB e filtro biológico percolador foram submetidas ao método proposto onde se observou a presença de todos os analitos estudados neste trabalho, exceto o etinilestradiol.

Palavras-chave: Microcontaminantes de preocupação emergente, extração com partição em baixa temperatura (EPBT), esgoto bruto, cromatografia gasosa (CG), espectrometria de massas (EM).

ABSTRACT

Microcontaminants of emerging concern consist of a group of organic compounds widely found in environmental matrices at trace levels. The possible adverse effects on humans and aquatic life exposed to them, besides compromising the quality of water bodies, has aroused the concern of several international agencies. In this group are different classes of contaminants, such as pharmaceuticals and personal care products, persistent organic pollutants, veterinary drugs, endocrine disruptors and nanomaterials. The main route for the environmental contamination is the disposal of in natura and treated sewage into water bodies. Sewage Treatment Plants (ETE) may not be effective for the treatment and removal of these compounds. This problem in association with the deficit on sanitation infrastructure results in the presence of these compounds in several environmental matrices and justifies the need for their monitoring. The present work presents the development of a low temperature partition extraction method (LTPE) for the simultaneous determination microcontaminant present on the solid and in soluble fraction of crude domestic sewage. Among them the drugs ibuprofen, paracetamol, diclofenac and naproxen. natural and synthetic hormones estrone, estradiol and ethinylestradiol and the phenols bisphenol A, 4-nonylphenol and 4-octylphenol. The extraction conditions was established by a complete factorial experimental design with central point, where the variables ratio of sample volume to extractor solvent volume and pH of the sample where evaluated for determining the best recovery for most of the analytes. Thus, the extraction was carried out on samples with adjusted pH to 2.0, using a volume of 4 mL of sewage sample, with three consecutive extractions of 3 mL of acetonitrile, used as solvent extractor and cooling time of 3 hours at -20 °C for each extraction. The extracts were dried in gaseous N₂ and subjected to derivatization by silylation reaction and further analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC / MS). The method was validated at several figures of merit, among them: linearity, with working ranges from 2.5 to 200 µg / L, with determination coefficients (R²) higher than 0.97; limits of detection and quantification of the method, varying from 0.36 to 25.07 ng / L and 1.20 to 83.56 ng / L, respectively; where the coefficients of variation range from 0.63 and 12.02% for the repeatability tests and from 0.95 to 19.95% for the intermediate precision tests; accuracy and matrix effect were assessed from the authentic sample and spike extracts. The validated method was considered accurate and precise for the analytes ibuprofen, 4-octylphenol, 4-nonylphenol, diclofenac, naproxen, bisphenol A, which have mean recovery values ranging from 81.14 to 116.32%. The method was considered semi-quantitative for the other analytes (paracetamol, estrone, estradiol and

ethinylestradiol) due to the high recoveries found for paracetamol and the absence of recovery at some concentration levels studied for the mentioned hormones. The validated method was applied in sewage samples submitted to the vacuum filtration process and compared to the raw sewage samples, and it can be observed that the affinity of the microcontaminants with the medium is governed by its physicochemical properties. Authentic samples of crude sewage and effluents from the UASB reactor and percolating biological filter were submitted to the proposed method where the presence of all analytes studied in this study was observed, except for ethinylestradiol.

Keywords: Microcontaminants emerging concern, low temperature extraction (LTPE), raw sewage, gas chromatography (GC), mass spectrometry (MS).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química do bisfenol A.	23
Figura 2 - Estrutura química do 4-nonilfenol (a) e 4-octilfenol (b).....	24
Figura 3 - Estrutura química do 17 α -etinilestradiol.	25
Figura 4 - Estrutura química do estradiol.	26
Figura 5 - Estrutura química do estrona.	27
Figura 6 - Estruturas químicas dos fármacos: ibuprofeno (a), paracetamol (acetaminofeno - b), naproxeno (c) e diclofenaco sódico (d).	30
Figura 7 - Possíveis rotas de microcontaminantes no meio ambiente.....	33
Figura 8 - Componentes de um espectrômetro de massas.....	46
Figura 9 - Mecanismo genérico da reação de derivatização, onde X varia de acordo com os diferentes agentes derivatizantes.	50
Figura 10 - Esquema da múltipla extração por partição em baixa temperatura (EPBT).....	60
Figura 11 - GCMS-QP2010 plus, Shimadzu [®]	61
Figura 12 - Fluxograma da ETE Marzagão de Itabirito, Minas Gerais.	69
Figura 13 - Comparativo das razões de área do analito pela área do padrão interno para diferentes tubos (<i>falcon</i> ou vidro) utilizados na extração.....	73
Figura 14 - Cromatograma dos íons monitorados (modo SIM) para o ibuprofeno.....	74
Figura 15 - Cromatograma dos íons monitorados (modo SIM) para o 4-octilfenol.....	75
Figura 16 - Cromatograma dos íons monitorados (modo SIM) para a estrona.	75
Figura 17 - Curva analítica para o ibuprofeno.....	101
Figura 18 - Curva analítica para o paracetamol.....	101
Figura 19 - Curva analítica para o 4-octilfenol.....	102
Figura 20 - Curva analítica para o 4-nonilfenol.	102
Figura 21 - Curva analítica para o naproxeno.	103
Figura 22 - Curva analítica para o bisfenol A.	103
Figura 23 - Curva analítica para o diclofenaco.....	104

Figura 24 - Curva analítica para a estrona.	104
Figura 25 - Curva analítica para o estradiol.	105
Figura 26 - Curva analítica para o etinilestradiol.	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Substâncias químicas classificadas como desreguladores endócrinos.	22
Tabela 2 - Intervalos de concentrações de estrona encontradas em amostras de água do rio (ng/L), sedimentos (ng/g) e efluentes de estações de tratamento de águas residuais (ng/L) em estações secas e chuvosas.	27
Tabela 3 - Intervalos de concentrações dos fármacos IBU, NPX, PCT e DCF encontradas em amostras de água do rio (ng/L), sedimentos (ng/g) e efluentes de estações de tratamento de águas residuais (ng/L) na China em estações secas e chuvosas e sua frequência de detecção (%FD).	31
Tabela 4 - Propriedades físico-químicas dos microcontaminantes de preocupação emergente estudados.	36
Tabela 5 - Dados de monitoramento de microcontaminantes em amostras ambientais.	39
Tabela 6 - Planejamento fatorial 2^2 com ponto central.	59
Tabela 7 - Parâmetros e valores utilizados para o método de determinação de microcontaminantes por CG/EM.	62
Tabela 8 - Tempos de retenção e relação m/z dos analitos derivatizados.	63
Tabela 9 - Valores dos efeitos e do parâmetro p ($\alpha = 0,05$) para cada variável estudada no planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central. Os valores em negrito são os que foram significativos de acordo com o valor de p ($p < 0,05$).	70
Tabela 10 - Melhores razões de área do analito pela área do PI para cada ensaio realizado no planejamento fatorial, onde a primeira, segunda e terceira melhor resposta está evidenciada com as cores azul, vermelho e verde, respectivamente.	72
Tabela 11 - Equação da curva e coeficiente de determinação para os analitos em estudo.	76
Tabela 12 - Valores de efeito matriz para os microcontaminantes estudados.	77

Tabela 13 - Índice de recuperação dos microcontaminantes estudados.	79
Tabela 14 - Limites de detecção e quantificação do equipamento CG/EM para cada microcontaminante estudado.	82
Tabela 15 - Limite de detecção e quantificação do método para cada microcontaminante estudado.	83
Tabela 16 - Valores de coeficiente de variação para avaliação da repetibilidade obtidos após triplicata em três níveis de concentração dos microcontaminantes em estudo.	84
Tabela 17 - Valores de coeficiente de variação para avaliação da precisão intermediária obtidos após triplicata em três níveis de concentração dos microcontaminantes em estudo. ..	86
Tabela 18 - Concentrações encontradas em amostras de esgoto bruto filtradas e não filtradas, em µg/L, e os valores de coeficiente de partição octanol/água de cada analito estudado.	88
Tabela 19 - Concentração em µg/L encontradas nas amostras autênticas pelo método desenvolvido neste trabalho.	89

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação (1).....	65
Equação (2).....	65
Equação (3).....	66
Equação (4).....	66
Equação (5).....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-NP: 4-nonilfenol	EPBT: Extração por partição em baixa temperatura
4-OP: 4-octilfenol	ESI: Ionização por eletrospray
AINEs: Anti-inflamatórios não esteroidais	ETE: Estação de tratamento de esgotos
ALT: alanina-aminotransferase	IBU: Ibuprofeno
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária	INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental
APCI: Ionização química à pressão atmosférica	K_{oc}: coeficiente de adsorção
BPA: Bisfenol A	K_{ow}: coeficiente de partição octanol/água
BSTFA: N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida	LD: Limite de detecção
CFF: Conselho Federal de Farmácia	LQ: Limite de quantificação
CG/EM: Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas	MEFS: Microextração em fase sólida
CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência	LDM: limite de detecção do método
CRM: material de referência certificado	LQM: limite de quantificação do método
CV: coeficiente de variação	MM: Massa molecular
DCF: diclofenaco sódico	NPX: naproxeno
DPR: desvio padrão relativo	PCT: paracetamol
E1: Estrona	PI: Padrão interno
E2: Estradiol	POP: Poluentes orgânicos persistentes
E3: Estriol	R²: coeficiente de determinação
EE2: 17 α -etinilestradiol	SIM: modo de monitoramento de íons específico
EFS: Extração em fase sólida	TCMS: trimetilclorosilano
ELL: Extração líquido-líquido	USEPA: Agência de Proteção Ambiental Americana

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	MICROCONTAMINANTES ORGÂNICOS	20
2.2.1	<i>Desreguladores endócrinos</i>	21
2.2.2	<i>Fármacos</i>	29
2.2	FONTES DE CONTAMINAÇÃO	32
2.3	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS MICROCONTAMINANTES ORGÂNICOS	34
2.4	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE MICROCONTAMINANTES	37
2.4.1	<i>Técnicas cromatográficas</i>	45
2.4.2	<i>Métodos de preparo de amostras</i>	47
2.4.3	<i>Derivatização</i>	50
2.5	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	51
2.5.1	<i>Aplicabilidade</i>	52
2.5.2	<i>Seletividade</i>	52
2.5.3	<i>Curva analítica e linearidade</i>	53
2.5.4	<i>Efeito matriz</i>	54
2.5.5	<i>Exatidão</i>	54
2.5.6	<i>Precisão</i>	55
2.5.7	<i>Limite de detecção (LDM) e de quantificação (LQM) do método</i>	55
3	OBJETIVOS	56
3.1	OBJETIVO GERAL	56
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
4	MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.1	REAGENTES, SOLVENTES, EQUIPAMENTOS E VIDRARIAS	57
4.2	COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS	58
4.3	PREPARO DE SOLUÇÕES PADRÃO	58
4.4	MÚLTIPLA EXTRAÇÃO POR PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA	58
4.5	DERIVATIZAÇÃO	60
4.6	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E DE DETECÇÃO	61
4.6.1	<i>Relação massa/carga (m/z) dos microcontaminantes</i>	63
4.7	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	64

4.7.1	<i>Seletividade</i>	64
4.7.2	<i>Curva analítica e linearidade</i>	64
4.7.3	<i>Efeito matriz</i>	64
4.7.4	<i>Exatidão</i>	65
4.7.5	<i>Limite de detecção e de quantificação do método</i>	66
4.7.6	<i>Precisão</i>	67
4.8	COMPARAÇÃO DAS ANÁLISES DE AMOSTRAS DE ESGOTO BRUTO E ESGOTO FILTRADO SUBMETIDOS AO MÉTODO VALIDADO.....	67
4.9	ANÁLISE DE AMOSTRAS AUTÊNTICAS.....	68
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	70
5.1	TRIAGEM DA EXTRAÇÃO.....	70
5.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE MICROCONTAMINANTES ORGÂNICOS EM AMOSTRAS DE ESGOTO BRUTO.....	74
5.2.1	<i>Seletividade</i>	74
5.2.2	<i>Curva analítica e linearidade</i>	75
5.2.3	<i>Efeito matriz</i>	76
5.2.4	<i>Exatidão</i>	78
5.2.5	<i>Limites de detecção e de quantificação</i>	82
5.2.6	<i>Precisão</i>	84
5.3	COMPARAÇÃO DAS ANÁLISES DE AMOSTRAS DE ESGOTO BRUTO E ESGOTO FILTRADO SUBMETIDOS AO MÉTODO VALIDADO.....	87
5.4	ANÁLISES DE AMOSTRAS AUTÊNTICAS.....	89
6	CONCLUSÕES	91
7	TRABALHOS FUTUROS	93
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
	APÊNDICE A - CURVAS ANALÍTICAS PARA OS MICROCONTAMINANTES ESTUDADOS	101

1 INTRODUÇÃO

A qualidade das águas é, atualmente, uma das questões mais relevantes na química ambiental. A frequente contaminação dos corpos d'água nos meios urbanos despertou a preocupação mundial para esse bem finito e primordial para a manutenção da vida no planeta. O crescimento demográfico demanda fontes abundantes de água, que associado à melhoria da qualidade de vida e ao aumento do uso de medicamentos, hormônios sintéticos, cosméticos e produtos de higiene pessoal resulta em uma elevada produção de efluentes contendo uma variedade de compostos orgânicos, denominados microcontaminantes de preocupação emergente (FARIA *et al.*, 2015).

Os microcontaminantes de preocupação emergente são encontrados em matrizes ambientais em níveis traços, ou seja, em concentrações na ordem de $\mu\text{g/L}$ e ng/L (BILA E DEZOTTI, 2003; LEITE *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2014). As principais rotas de contaminação ambiental por esses compostos orgânicos são a descarga inadequada de efluentes de indústrias farmacêuticas, resíduos rurais, eliminação inadequada de fármacos não utilizados e, principalmente, o lançamento de esgoto *in natura* e tratado em corpos d'água, já que em muitas localidades há um déficit de infraestrutura de saneamento (MELO *et al.*, 2009). O lançamento de esgoto *in natura* nos corpos d'água é uma realidade no país, devido à falta de investimento em saneamento básico. De acordo com o Atlas Esgotos, publicado pela Agência Nacional de Águas (ANA) e pela Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental, 55% da população nacional possui esgotamento sanitário adequado. O Norte é a região com o pior índice de esgotamento adequado no país, com um percentual de apenas 33% e a região Sul, seguida pelo Centro-Oeste, se destaca com os maiores índices de tratamento de esgoto gerado, 65% e 63%, respectivamente (ANA, 2017).

Uma das classes de microcontaminantes de preocupação emergente que está presente no meio ambiente e que vem despertando o interesse da comunidade científica e legislativa por seus possíveis efeitos adversos à saúde humana e animal, mesmo em baixíssimas concentrações, são os desreguladores do sistema endócrino (OMAR, 2016). De acordo com a Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA), desregulador endócrino é um “agente exógeno que interfere com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônio natural no corpo, que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos” (USEPA, 1997). O interesse científico a cerca dos desreguladores endócrinos surgiu em consequência de casos vinculados aos efeitos de exposição de seres humanos e animais a esses compostos, como o aparecimento

de câncer no sistema reprodutivo de filhas de mulheres que usaram dietilestilbestrol, entre os anos de 1940 e 1970 (BIRKETT & LESTER, 2003 *apud* BILA E DEZOTTI, 2007) e as anomalias no sistema reprodutivo de jacarés que habitavam um lago na Flórida contaminado pelo pesticida DDT (2,2 bis-p-clorofenil-1,1,1-tricloroetano) e seu metabólito DDE (2,2 bis-p-clorofenil-1,1-dicloroetileno). As pesquisas realizadas após esses casos constataram diversos outros efeitos causados pela exposição de animais a esses compostos como a feminização de peixes machos, problemas no sistema reprodutivo dos peixes, pássaros e mamíferos, entre outros (BILA E DEZOTTI, 2007).

Outra classe de microcontaminantes presentes em amostras ambientais são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's). Os AINE's são a classe de medicamentos mais prescritos no mundo, além de serem amplamente utilizados em decorrência de automedicação (BATLOUNI, 2010), garantindo sua presença no meio ambiente, devido à sua excreção pelo corpo humano (já que apenas uma porcentagem do medicamento é metabolizada no organismo e outra é excretada pelas fezes ou urina), além do descarte inadequado de medicamentos não utilizados ou fora do prazo de utilização. Com a contínua liberação de produtos farmacêuticos no meio ambiente, muitos deles podem se acumular em diversas matrizes ambientais como sedimentos, água, esgoto, entre outros, garantindo um perfil de persistência no ambiente.

Devido à preocupação em relação à presença dos microcontaminantes emergentes no ambiente, tem-se elevado o interesse na análise destas substâncias. Como esses compostos estão presentes em níveis traços nas matrizes ambientais, etapas de pré-concentração e limpeza dos extratos (*clean-up*) são primordiais para a sua determinação. As técnicas comumente utilizadas no preparo de amostras complexas são: extração líquido-líquido (ELL) e extração em fase sólida (EFS) (GORGA *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2018; KUMIRSKA *et al.*, 2015; MIGOWSKA *et al.*, 2012; ROBLES-MOLINA *et al.*, 2014).

Dentre as técnicas instrumentais disponíveis para a identificação e quantificação de fármacos e desreguladores endócrinos, a cromatografia, líquida ou gasosa, são as mais utilizadas. A escolha da técnica depende das propriedades físico-químicas dos compostos em estudo. A cromatografia gasosa (CG) é amplamente utilizada, mas só pode ser aplicada a substâncias voláteis e termicamente estáveis, porém, reações de derivatização podem ser realizadas em compostos não voláteis, modificando as características do analito, permitindo sua análise por CG (SKOOG *et al.*, 2006). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também é utilizada na determinação de microcontaminantes, sendo aplicada para compostos

que apresentam polaridade mais alta e volatilidade mais baixa ou ainda elevada instabilidade térmica (DA SILVA E COLLINS, 2011; SKOOG *et al.*, 2006). O acoplamento dos sistemas cromatográficos (líquido ou gasoso) ao espectrômetro de massas (EM), na função de detector, garante seletividade e alta resolução à técnica analítica.

Sob o ponto de vista analítico, o esgoto é considerado uma matriz complexa, devido à presença de uma variedade de elementos inorgânicos e orgânicos, como ácidos húmicos e fúlvicos, proteínas, lipídeos e detergentes, no qual suas concentrações são mais elevadas quando comparados com os microcontaminantes de preocupação emergente. Por isso, a análise e quantificação dos microcontaminantes nessa matriz só ocorreram após o progresso da instrumentação analítica e o desenvolvimento de técnicas de extração e concentração dos poluentes de interesse presentes nessa matriz ambiental (DA SILVA E COLLINS, 2011). Na literatura, encontram-se trabalhos de determinação dos microcontaminantes em amostras de esgoto filtradas (fração aquosa) e em lodos ativados ou sedimentos separadamente. Porém, a partir das propriedades físico-químicas dos microcontaminantes, percebe-se a sua maior afinidade por frações orgânicas. Este trabalho propõe, então, o desenvolvimento e validação da técnica de extração por partição em baixa temperatura das frações solúveis e insolúveis simultaneamente do esgoto, visando obter concentrações reais (concentração total) dos microcontaminantes presentes na matriz. A análise simultânea dos microcontaminantes foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microcontaminantes orgânicos

Os microcontaminantes orgânicos (também conhecidos como microcontaminantes de preocupação emergente e micropoluentes) são uma classe de compostos que são encontrados em amostras ambientais em níveis traços, ou seja, em concentrações na ordem de $\mu\text{g/L}$ e ng/L (BILA E DEZOTTI, 2003; GÖTZ *et al.*, 2010; LEITE *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2014). Esses compostos são indicadores de atividade antropogênica e, mesmo em baixíssimas concentrações, os microcontaminantes, seus subprodutos e metabólitos podem ter atividade biológica, causando efeitos adversos aos organismos a eles expostos e comprometendo a qualidade dos corpos hídricos (BILA E DEZOTTI, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2014; DA SILVA E COLLINS, 2011). A melhoria da qualidade de vida associado ao aumento do consumo de medicamentos culminaram no aparecimento desses compostos orgânicos em matrizes ambientais. Nesse grupo de contaminantes estão presentes diversas classes de fármacos, como por exemplo, analgésicos, antibióticos, anti-inflamatórios, reguladores lipídicos e hormônios sintéticos; substâncias utilizadas em produtos de limpeza e higiene pessoal; compostos aplicados na produção de resinas e plásticos; além de hormônios naturais e outros (AQUINO *et al.*, 2013).

Estes contaminantes não estão inseridos em legislações que regulamentam a qualidade da água, devido às incertezas e dados controversos sobre seus impactos reais e potenciais à saúde humana e ambiental após exposição por longo prazo. Diante disso, esses micropoluentes vêm despertando o crescente interesse da comunidade científica sobre sua toxicidade e efeitos potenciais, tornando-os candidatos a legislações futuras (HERNÁNDEZ *et al.*, 2007).

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA), os microcontaminantes de preocupação emergente podem ser divididos em cinco classes (EPA, 2014):

- Poluentes orgânicos persistentes (POP) tais como retardantes de chama, plastificantes e ácidos orgânicos perfluorados;
- Fármacos e produtos de higiene pessoal incluindo os fármacos de uso humano vendidos com prescrição médica ou de venda livre, fragrâncias, bactericidas e protetores solares;

- Medicamentos de uso veterinário, como os antibióticos, antifúngicos, promotores de crescimento e hormônios;
- Desreguladores endócrinos, como hormônios naturais e sintéticos, pesticidas, alquilfenóis, entre outros;
- Nanomateriais: nanotubos de carbono, dióxido de titânio particulado em nano escala, etc.

Os fármacos e desreguladores endócrinos são as classes de microcontaminantes orgânicos estudados nesse trabalho e, por isso, foi realizada uma revisão bibliográfica acerca de sua ocorrência, efeitos atrelados à sua exposição e procedimentos analíticos visando sua quantificação em amostras ambientais.

2.2.1 Desreguladores endócrinos

Os microcontaminantes orgânicos classificados como desreguladores endócrinos são substâncias ou misturas exógenas capazes de alterar a função do sistema endócrino de seres vivos causando, conseqüentemente, efeitos adversos em organismos saudáveis ou em seus descendentes ou subpopulações (BILA E DEZOTTI, 2007). Existem algumas definições acerca desses microcontaminantes, as quais são aceitas atualmente e que serão expostas a seguir. A Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) define desregulador endócrino como um “agente exógeno que interfere com a síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônio natural no corpo que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos” (USEPA, 1997). Outra definição para esses microcontaminantes foi elaborada pelo Programa Internacional de Segurança Química, juntamente com o Japão, os EUA, o Canadá e a União Europeia. Segundo eles, desreguladores endócrinos são substâncias ou misturas exógenas que podem interferir no sistema endócrino de humanos e animais, causando, conseqüentemente, efeitos adversos nos sistemas reprodutivos de organismos saudáveis, sua descendência ou (sub) populações (CEC, 1999).

Diversos compostos orgânicos são enquadrados nessa classe de substâncias. A Tabela 1 apresenta algumas substâncias classificadas ou suspeitas de serem desreguladores endócrinos e suas respectivas classes.

Tabela 1 - Substâncias químicas classificadas como desreguladores endócrinos.

Ftalatos		Pesticidas
dimetil ftalato (DMP)		Inseticidas: DDT (2,2 bis-p-clorofenil-1,1,1-tricloroetano) DDE (2,2 bis-p-clorofenil-1,1dicloroetileno deltametrin carbofurano
dietil ftalato (DEP)		
di-iso-butil ftalato (DIBP)		
di-n-butil ftalato (DBP)		
butilbenzil ftalato (BBP)		
dicroexilo ftalato (DCHP)		
di-(2-etil-exil) ftalato (DEHP)		
di-n-octil ftalato (DOP)		
di-iso-octil ftalato (DIOP)		
di-iso-nonil ftalato (DINP)		
di-iso-decil ftalato (DIDP)		Herbicidas: atrazina linuron
		Fungicidas: vinclozolina propiconazol carbendazime epoxiconazol penconazol procimidona procloraz tridemorfos
Alquilfenóis		Pesticidas organoclorados: lindane (1,2,3,4,5,6-hexacloroexano)
nonilfenol	nonilfenol etoxilado	
octilfenol	octilfenol etoxilado	Compostos orgânicos de estanho
Organoclorados		tributilestanho (TBT)
dibenzo-p-dioxina		trifenilestanho (TPT)
TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina)		Policlorados de bifenilas
TCDF (2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano)		
Bisfenol		2,4,4'-triclorobifenil
Bisfenol A		2,2',5,5'-tetraclorobifenil
		2,2',4,5,5'-pentaclorobifenil
		2,3',4,4',5-pentaclorobifenil
		2,2',3,4,4',5'-hexaclorobifenil
		2,2',4,4',5,5'-hexaclorobifenil
		2,2',3,4,4',5,5'-heptaclorobifenil
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos		Retardantes de chama bromado Polibromobifenila (PBB) 2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter (BDE 47) 2,2',4,4',5-pentabromodifenil éter (BDE 99) 2,2',4,4',6-pentabromodifenil éter (BDE 100) 2,2',4,4',5,5'-hexabromodifenil éter (BDE 153) 2,2',4,4',5,6'-hexabromodifenil éter (BDE 154) 2,2',3,4,4',5',6-heptabromodifenil éter octabromodifenil éter (BDE octa) decabromodifenil éter (BDE 209) hexabromociclododecano (HBCD) tetrabromobisfenol A (TBBA)
naftalina	benzo[a]antraceno	
acenaftileno	criseno	
fluoreno	benzo[b]fluoranteno	
fenantreno	benzo[k]fluoranteno	
antraceno	benzo[a]pireno	
fluoranteno	indeno[123-cd]pireno	
pireno	dibenzo[ah]antraceno	
Metais Pesados		
cádmio	chumbo	
mercúrio	zinco	
Agentes terapêuticos e farmacêuticos		Fitoestrogênios
dietilestilbestrol (DES)	17 α -etinilestradiol (EE2)	
Estrogênios naturais		Isoflavona: daidzeína e genisteína. Lignan: metaresinol e enterodiol
estrone (E1)	17 β -estradiol (E2)	

Fonte: BILA e DEZOTTI (2007).

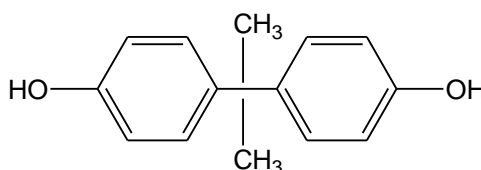
De acordo com Bila e Dezotti (2007), os desreguladores endócrinos podem ser classificados em duas classes: (i) substâncias sintéticas, denominadas xenoestrogênios - utilizadas na agricultura e seus subprodutos (pesticidas, fungicidas, entre outros); utilizadas nas indústrias e seus subprodutos (dioxinas, bifenilas policloradas, alquilfenóis, bisfenol A, estrogênios sintéticos, entre outros) e; (ii) substâncias naturais - como os fitoestrogênios (genisteína e metaresinol, por exemplo) e estrogênios naturais (17β - estradiol, estrona, estriol).

Na última década, as comunidades científicas e legislativas apresentam maior interesse nos compostos classificados como desreguladores endócrinos, tais como estrogênios, produtos de higiene pessoal e aditivos industriais, devido à sua presença generalizada em diversas matrizes ambientais e sua interferência no sistema endócrino dos seres vivos (OMAR, 2016). Bisfenol A, 4-nonilfenol, 4-octilfenol, 17α -etinilestradiol, 17β -estradiol, estriol e estrona são os desreguladores endócrinos estudados nesse trabalho.

- **Bisfenol A (BPA)**

O bisfenol A (Figura 1) é amplamente utilizado como monômero na produção de polímeros do tipo policarbonato e resinas epóxi, como antioxidante em alguns plastificantes e como inibidor da polimerização do PVC e está presente em garrafas, selantes dentários, tubos, embalagens de alimentos, esmaltes, retardantes de chamas, entre outros. Sua liberação no meio ambiente ocorre através de degradação natural de plásticos e efluentes de estação de tratamento de esgoto ou esgoto *in natura*. Sua ampla utilização garante a presença desses microcontaminantes em concentrações relativamente elevadas em diversas matrizes ambientais (ACEVEDO *et al*, 2013; AQUINO *et al*, 2013; FAN *et al*, 2018).

Figura 1 - Estrutura química do bisfenol A.

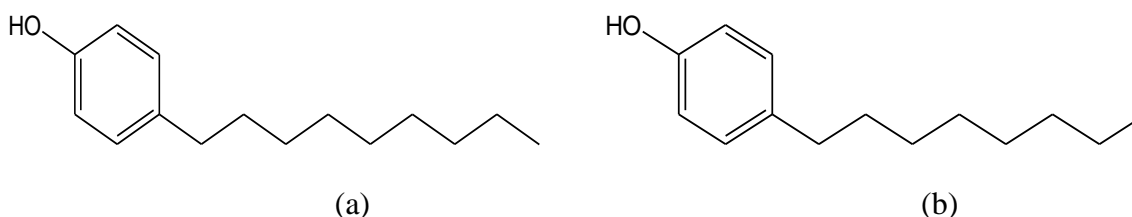


Fan *et al* (2018) avaliou as consequências de exposição ao BPA em filhotes de peixes (*Gobiocypris rarus*) nascidos de fêmeas adultas expostas ao composto, observando alguns efeitos como a má qualidade dos embriões, aumento de má formação da coluna e cauda, atraso do processo de ossificação da cartilagem craniofacial das larvas e diminuição da fertilização. O estudo sugere que o BPA é um agente tóxico à formação óssea das gerações subsequentes às fêmeas expostas.

- **4-nonilfenol (4-NP) e 4-octilfenol (4-OP)**

O 4-nonilfenol e 4-octilfenol (Figura 2) são os principais subprodutos da degradação de surfactantes não iônicos de alquilfenóis polietoxilados. São empregados como surfactante em produtos de limpeza e cosméticos, óleos lubrificantes, agentes dispersantes na produção de polpa e papel, emulsificantes nas formulações de tintas látex e pesticidas, aditivos plásticos na produção de resinas fenólicas, como agente floculante, como espermicida em aplicações contraceptivas, nas indústrias têxteis, dentre outros. Devido à sua ampla utilização doméstica e industrial, o 4-NP e 4-OP são encontrados em diversas matrizes ambientais (BILA E DEZOTTI, 2007; PUBCHEM, 2018).

Figura 2 - Estrutura química do 4-nonilfenol (a) e 4-octilfenol (b).

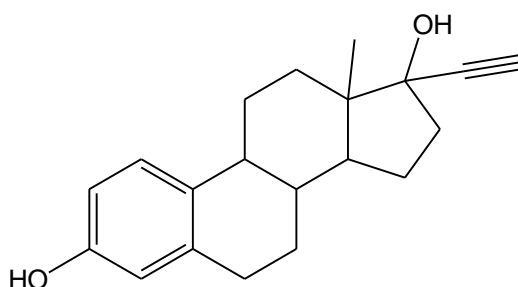


M. Gorga *et al* (2014) avaliou a presença de desreguladores endócrinos em amostras de sedimento e lodo de esgoto na Espanha. O 4-OP foi detectado em amostras de sedimentos com concentrações variando entre 9,4 a 45 ng/g e em apenas uma amostra de lodo de esgoto, com concentração de 234 ng/g. Já o 4-NP, está presente em todas as amostras de sedimentos (36 a 538 ng/g) e é o microcontaminante de maior concentração em amostras de lodo de esgoto (4183 a 29416 ng/g).

- **17 α -etinilestradiol (EE2)**

O 17 α -etinilestradiol (Figura 3) é o estrogênio sintético amplamente utilizado em contraceptivos orais (30-50 μ g/pílula) e em reposição terapêutica hormonal (BILA E DEZOTTI, 2007). É utilizado no tratamento hipogonadismo feminino, em alguns tipos de carcinomas (metastático mamário feminino e prostático avançado), síndrome de Turner e falência ovariana primária, além de ser utilizado como contraceptivo de emergência. Possui maior potencial estrogênico e resistência ao metabolismo devido à existência de um grupo etinil adicional em sua estrutura em relação ao estradiol, o que faz com que grande parte do que é consumido chega inalterado à rede de esgoto (PUBCHEM, 2018). No corpo humano, apenas 15% do EE2 é metabolizado enquanto o restante é eliminado pela urina. Com isso, sua presença em matrizes ambientais é um forte indício da contaminação através do esgoto doméstico (RAIMUNDO, 2007).

Figura 3 - Estrutura química do 17 α -etinilestradiol.

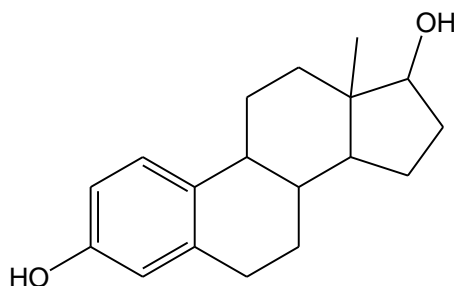


Massart *et al* (2014) avaliou a influência da exposição a baixas concentrações (0,1 a 1 μ g/L) de 17 α -etinilestradiol em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em curto prazo. Os resultados sugerem que o EE2 afeta o sistema imunológico celular e humoral, redistribui a população de leucócitos no sangue, diminui a atividade da lisozima hepática, altera a expressão gênica de alguns compostos de muco e genes envolvidos na fagocitose hepática, entre outros efeitos.

- **Estradiol (E2)**

O estradiol (Figura 4) é um hormônio sexual natural produzido diariamente pelos folículos ovarianos. É o estrogênio mais abundante e potente de ocorrência natural nos seres humanos (RAIMUNDO, 2007). É responsável pela regulação do ciclo menstrual, desenvolvimento da puberdade e características sexuais secundárias. Além disso, também é responsável pela manutenção dos tecidos do organismo, garantindo a elasticidade da pele e dos vasos sanguíneos e a reconstituição óssea, entre outras funções. É utilizado em terapias de reposição hormonal durante a menopausa devido suas inúmeras vantagens, como controle dos sintomas vasomotores, aumento da lubrificação vaginal e da libido feminina. No fígado, esse hormônio é biotransformado em estrona e estriol, sendo este último subproduto o principal eliminado na urina e fezes (GOODMAN GILMAN, 2005).

Figura 4 - Estrutura química do estradiol.



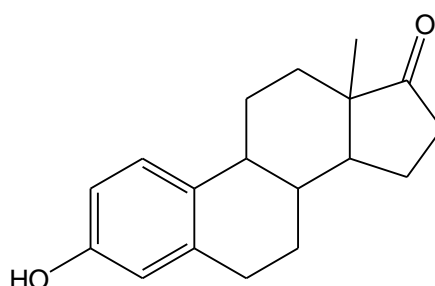
No trabalho de Praveena e colaboradores (2016), foi relatada maior presença de compostos estrogênicos, incluindo o estradiol, em amostras de sedimentos quando comparado a águas superficiais do rio Langat, na Malásia. O E2 foi encontrado em apenas 2 das 8 amostras de água analisadas, com concentração máxima de 0,004 ng/L. Já em sedimentos, esse composto foi encontrado em todas as amostras analisadas e sua concentração variou de 0,0053 a 0,0281 ng/g.

- **Estrona (E1)**

A estrona (Figura 5) é um estrogênio natural mais potente que o estriol e menos que o estradiol e um dos principais estrogênios de mamíferos. É produzido principalmente nos ovários, placenta e tecido adiposo (PUBCHEM, 2018; RAIMUNDO, 2007). É indicado na terapia de reposição hormonal para sintomas de deficiência estrogênica nos períodos pré e

pós-menopausa, além de ser indicado como prevenção da osteoporose na pós-menopausa em mulheres para as quais não são apropriados outros medicamentos. O E1 é um dos subprodutos do metabolismo do estradiol e também pode ser convertida a estriol por hidratação. Com isso, esse hormônio está presente na urina de mulheres grávidas assim como de alguns animais, além de ser encontrada na placenta humana, na urina de touros e cavalos e até em algumas plantas (GOODMAN GILMAN, 2005).

Figura 5 - Estrutura química do estrona.



He e colaboradores (2018) avaliaram a ocorrência de microcontaminantes emergentes em amostras de água e sedimentos do rio Jilin Songhua, localizado na China, bem como em efluentes da estação de tratamento de águas residuais. A avaliação de risco ecológico realizada nesse estudo mostrou que E1 apresenta risco médio ou alto e, com isso, a sua presença em amostras ambientais precisa ser controlada. As concentrações detectadas desse hormônio nas amostras estudadas são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2 - Intervalos de concentrações de estrona encontradas em amostras de água do rio (ng/L), sedimentos (ng/g) e efluentes de estações de tratamento de águas residuais (ng/L) em estações secas e chuvosas.

Amostra	Estação chuvosa	Estação seca
Água	n.d.-17,5	n.d.-37,3
Sedimentos	n.d.-246,8	n.d.-492,5
Efluentes	3,6	5,2

Fonte: Adaptado de He *et al*, 2018.

O interesse científico acerca dos desreguladores endócrinos surgiu em consequência de casos importantes que estavam vinculados aos efeitos da exposição de seres humanos e animais a esses compostos (AQUINO *et al.*, 2013). O aparecimento de câncer no sistema reprodutivo de filhas de mulheres que usaram dietilestilbestrol durante a gravidez, com o objetivo de reduzir o risco de aborto, entre os anos de 1940 e 1970 (BIRKETT & LESTER, 2003 *apud* BILA E DEZOTTI, 2007); e as anomalias no sistema reprodutivo de jacarés que habitavam o lago Apopka na Flórida, em 1995, contaminado com o pesticida DDT (2,2 bis-p-clorofenil-1,1,1-tricloroetano) e seu metabólito DDE (2,2 bis-p-clorofenil-1,1-dicloroetileno) (BILA E DEZOTTI, 2007) são exemplos destes importantes eventos que desencadearam os estudos desses microcontaminantes presentes no ambiente.

Os efeitos da presença desses microcontaminantes no ambiente são amplamente abordados pela comunidade científica. A diminuição na eclosão de ovos de pássaros, peixes e tartarugas; feminização de peixes machos; problemas no sistema reprodutivo em peixes, répteis, pássaros e mamíferos e, alterações no sistema imunológico de mamíferos marinhos, podendo ocorrer o declínio da população, são alguns efeitos já observados em animais expostos aos desreguladores endócrinos (BILA E DEZOTTI, 2007). Acevedo *et al* (2013) avaliou os efeitos de exposição do bisfenol-A em ratos durante a gestação e lactação e concluiu que essa exposição afeta o desenvolvimento de glândulas mamárias dos roedores, induzindo neoplasias nas glândulas, demonstrando que o bisfenol-A pode atuar como uma substância carcinogênica. Harzer *et al* (2015) avaliou os efeitos dos hormônios estriol e estrona, hormônios sexuais femininos amplamente usados em terapias de reposição hormonal e métodos contraceptivos, sobre a função hepática dos peixes *Rhamdia quelen* após tratamento sub-crônico de 30 dias, avaliando as atividades das enzimas alanina-aminotransferase (ALT), aspartato-aminotransferase (AST) e a fosfatase alcalina, que indicam possíveis danos hepáticos. Os resultados demonstraram que a exposição crônica aos hormônios promoveu alterações nas dosagens das enzimas hepáticas dos peixes, indicando um quadro de lesão do hepatócito. Já em humanos, alguns efeitos de exposição observados são: redução da quantidade de esperma; aumento da incidência de câncer de mama, de testículo e de próstata e a endometriose (doença caracterizada pela presença do endométrio fora da cavidade uterina) (BILA E DEZOTTI, 2007).

2.2.2 Fármacos

Na terminologia farmacêutica, fármacos são substâncias químicas conhecidas, de estrutura química definida, usados para prevenir, diagnosticar e tratar doenças (ANVISA, 2018). Fármacos são compostos químicos pouco solúveis em água, lipofílicos e biologicamente ativos que podem ser administrados oralmente, topicamente (aplicação na pele e mucosas) ou parenteralmente (injeções e infusões) (SANSON, 2012). Após a administração, essas substâncias são absorvidas, distribuídas, parcialmente metabolizadas e, então, excretadas do corpo através da urina, fezes ou esterco animal, na sua forma original, associada ou como metabólitos (BILA E DEZOTTI, 2003; BECKER, 2012). De acordo com Filho *et al* (2007), os fármacos residuais possuem uma série de agravantes: (i) muitos são persistentes no ambiente, bem como seus produtos de degradação, podendo causar exposição crônica devido a sua permanência contínua no ambiente, mesmo apresentando tempos de meia-vida curtos; (ii) eles são desenvolvidos para desencadear efeitos fisiológicos e, com isso, a biota se torna mais suscetível aos danos que estes compostos podem provocar; (iii) mesmo apresentando baixas concentrações no ambiente, a combinação destas substâncias podem provocar efeitos pronunciados devido ao mecanismo de ação sinérgica.

Nas últimas décadas, pôde-se perceber um crescente aumento no uso de medicamentos pela população mundial, principalmente relacionado ao uso de analgésicos, anti-inflamatórios, reguladores lipídicos, entre outros (QUEIROZ, 2011). Segundo dados do Conselho Federal de Farmácia (CFF), o Brasil é considerado uma potência mundial quando se trata de mercado farmacêutico, ocupando a sexta posição entre os maiores mercados consumidores de medicamentos no cenário mundial, com projeção de alcançar a quarta posição, em 2018, atrás apenas dos Estados Unidos, China e Japão (CFF, 2017).

Com a contínua liberação de produtos farmacêuticos no meio ambiente, muitos deles podem se acumular em diversas matrizes ambientais como sedimentos, água, esgoto, entre outros, podendo induzir efeitos adversos aos seres vivos expostos a eles. Kumirska *et al* (2015) identificou e quantificou seis fármacos (ácido salicílico, ibuprofeno, flurbiprofeno, naproxeno, diclofenaco e 17 α -etinilestradiol) em amostras de lodo de uma estação de tratamento de esgotos da Polônia, encontrando o ácido salicílico, ibuprofeno e 17 α -etinilestradiol em concentrações de 489 ng/g, 96 ng/g e 12,2 ng/g, respectivamente. Com isso, a preocupação da comunidade científica com a presença desses microcontaminantes no meio ambiente tem se tornado cada vez maior, uma vez que essas substâncias são biologicamente ativas, a fim de se obter informações suficientemente confiáveis sobre seus efeitos de

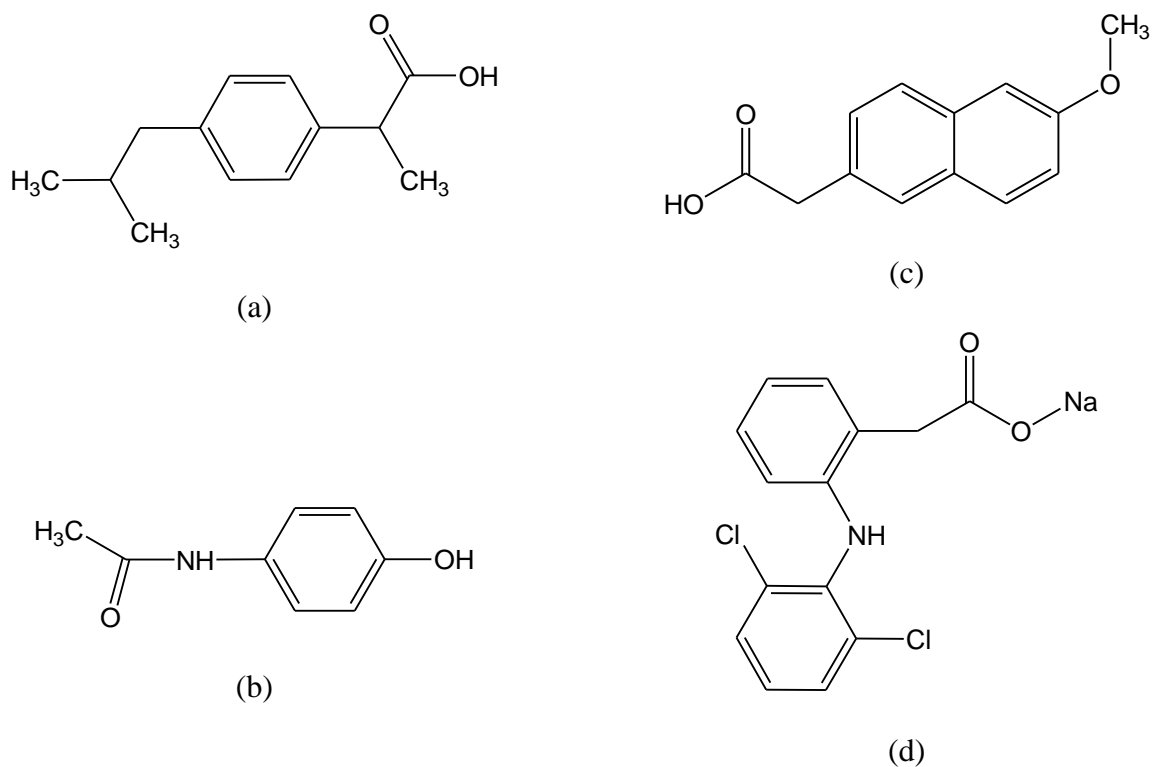
exposição em longo prazo que permitam o monitoramento e regulação dos produtos farmacêuticos.

- **Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)**

Os AINEs são uma das classes de medicamentos mais prescritas em todo mundo, além de serem amplamente utilizados em decorrência de automedicação (BATLOUNI, 2010).

A diminuição da resposta inflamatória, da dor de causas inflamatórias (efeito analgésico) e da febre (efeito antipirético) são os principais efeitos dos AINEs (SANSON, 2012). São utilizados principalmente no tratamento da inflamação, dor e edema, como também nas osteoartrites, artrite reumatoide e distúrbios musculoesqueléticos (BATLOUNI, 2010). Destacam-se nesse estudo o ibuprofeno (IBU), paracetamol (acetaminofeno - PCT), naproxeno (NPX) e diclofenaco sódico (DCF) (Figura 6).

Figura 6 - Estruturas químicas dos fármacos: ibuprofeno (a), paracetamol (acetaminofeno - b), naproxeno (c) e diclofenaco sódico (d).



O paracetamol (acetaminofeno, N-acetil-p-aminofenol) é eficaz como antipirético (diminuição da febre) e analgésico (diminuição da dor de causas inflamatórias), mas é considerado um anti-inflamatório muito fraco (GOODMAN GILMAN, 2005).

A tendência em induzir ulceração gástrica ou intestinal, inibição da função plaquetária, inibição da indução do trabalho de parto, alterações da função renal e reações de hipersensibilidade são alguns efeitos indesejáveis do uso dos anti-inflamatórios não esteroidais (GOODMAN GILMAN, 2005).

Esses compostos possuem moléculas pequenas (se comparado aos antibióticos, por exemplo) e são passíveis de reações de derivatização tornando possível sua análise por cromatografia gasosa, já que a derivatização reduzirá seus pontos de ebulição.

No monitoramento de 22 microcontaminantes orgânicos, realizado por He e colaboradores (2018) em amostras de água e sedimento do rio Jilin Songhua (China) e efluentes de estações de tratamento de águas residuais, observou-se uma frequência de detecção de 100% dos fármacos ibuprofeno, naproxeno, paracetamol e diclofenaco nas amostras de sedimentos de estações chuvosas. A Tabela 3 apresenta as concentrações detectadas dos fármacos e sua frequência de detecção.

Tabela 3 - Intervalos de concentrações dos fármacos IBU, NPX, PCT e DCF encontradas em amostras de água do rio (ng/L), sedimentos (ng/g) e efluentes de estações de tratamento de águas residuais (ng/L) na China em estações secas e chuvosas e sua frequência de detecção (%FD).

	Água		Sedimentos		Efluente	
	<i>Est. chuvosa</i>	<i>Est. seca</i>	<i>Est. chuvosa</i>	<i>Est. seca</i>	<i>Est.</i>	<i>Est. seca</i>
	Intervalo -	Intervalo -	Intervalo -	Intervalo - FD	Média	Média
IBU	n.d-14,3 - 80	n.d-8,8 - 60	25,2-95 - 100	n.d-227,1 - 90	2,7	3,1
NPX	n.d-0,4 - 40	n.d-0,6 - 80	0,6-2,7 - 100	n.d-4,1 - 50	0,6	0,7
PCT	n.d-6,0 - 60	3,1-13,7 -	5-17,3 - 100	1,7-320,7 -	7,0	14,2
DCF	n.d-10,2 - 50	n.d-20,2 - 70	30,3-50,6 -	n.d-278,1 - 70	6,8	16,7

Fonte: Adaptado de He *et al*, 2018.

2.2 Fontes de contaminação

Milhares de toneladas de substâncias sintéticas e naturais são produzidos anualmente e, sendo consumidos/utilizados pela população, são inseridos no ambiente pelo lançamento de esgoto doméstico *in natura* e tratado em corpos d'água. As estações de tratamento de esgoto (ETEs) recebem uma diversidade de contaminantes das águas residuais domésticas e/ou industrial, que não são completamente eliminados durante o processo. Com isso, os efluentes das ETEs contêm uma mistura complexa de contaminantes e seus metabólitos, que ao serem despejados nos corpos hídricos, contaminam o meio. Devido à ineficiência de remoção desses microcontaminantes e seus metabólitos nas ETEs, associado ao déficit de infraestrutura em saneamento, o lançamento de esgotos domésticos *in natura* e tratado em cursos d'água é a principal fonte de contaminação de microcontaminantes no meio ambiente (BILA E DEZOTTI, 2007; HE et al., 2018; RAIMUNDO, 2007).

Quando conduzidos de maneira correta, os esgotos passarão pelas Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) com o intuito de reduzir a carga poluidora presente (matéria orgânica, nutrientes e coliformes fecais), para retornar posteriormente ao meio ambiente. Nas ETEs convencionais, o esgoto passa inicialmente por um tratamento preliminar visando a remoção de sólidos grosseiros. Em seguida, o esgoto é submetido a um tratamento primário que visa a remoção de sólidos sedimentáveis e, conseqüentemente, parte da matéria orgânica. No tratamento secundário, que envolvem mecanismos biológicos (aeróbios e/ou anaeróbios), o principal objetivo é a remoção da matéria orgânica e alguns nutrientes. Algumas ETE's podem ainda apresentar um tratamento terciário, pós-tratamento que objetiva o polimento do efluente (VON SPERLING, 2014).

No Brasil, o lançamento de esgoto *in natura* nos corpos d'água é comum, pois muitos municípios não possuem qualquer tipo de estação de tratamento. De acordo com o Atlas Esgotos, divulgado pela Agência Nacional de Águas (ANA) e pela Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental, 9,1 mil toneladas de esgoto são geradas por dia no Brasil. Apenas 43% da população possui esgoto coletado e tratado e 12% utilizam-se de fossa séptica, considerada como solução individual, ou seja, 55% da população possuem tratamento considerado adequado; 18% da população tem seu esgoto coletado e não tratado e 27% não é atendido por serviço de coleta sanitário (não há coleta, nem tratamento). Atualmente, a região Sul se destaca por apresentar maior índice de tratamento de esgoto gerado (65%) seguido da região Centro-Oeste, com um percentual de 63%. A região com o pior índice de tratamentos

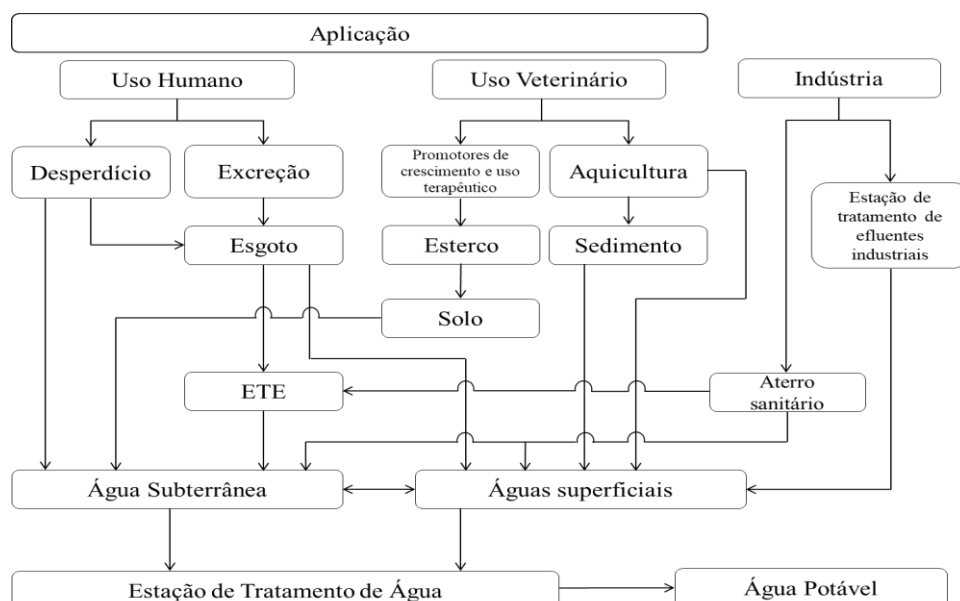
de esgotos gerados é o Norte, com apenas 33% de esgotamento sanitário adequado (ANA, 2017).

Outras rotas de contaminação ambiental conhecidas são:

- Descarga de efluentes *in natura* e tratado de indústrias farmacêuticas em corpos d'água;
- Disposição de resíduos de indústrias farmacêuticas em aterros sanitários;
- Resíduos rurais, devido ao uso de drogas promotoras de crescimento na produção de gado, produção avícola e também aditivos para alimentação de peixes na aquicultura e criação de porcos;
- Utilização de estrume e lodo digerido como fertilizantes na agricultura;
- Descarte inadequado de fármacos não utilizados ou fora do prazo de utilização (BILA E DEZOTTI, 2003; BILA E DEZOTTI, 2007; GÖTZ et al., 2010; MELO et al., 2009).

A Figura 7 representa um esquema simplificado das principais fontes de contaminação de microcontaminantes no meio ambiente.

Figura 7 - Possíveis rotas de microcontaminantes no meio ambiente.



Fonte: Adaptado de BILA e DEZOTTI, 2003.

2.3 Propriedades físico-químicas dos microcontaminantes orgânicos

Os desreguladores endócrinos e fármacos são os microcontaminantes mais comumente encontrados em matrizes ambientais. Esses compostos apresentam de pequena a moderada biodegradabilidade no meio ambiente, fator que contribui para aumentar sua prevalência ambiental e o impacto sob os organismos aquáticos (LIMA *et al.*, 2017).

Os fármacos são compostos pouco solúveis em água, lipofílicos e biologicamente ativos. Já os desreguladores, além de estarem associados aos efeitos no sistema endócrino, são considerados persistentes, lipofílicos, bioacumulativos e tem baixa pressão de vapor, o que facilita a sua dispersão e difusão no meio ambiente (BILA E DEZOTTI, 2007).

A concentração dos microcontaminantes presentes em matrizes ambientais pode ser reduzida por mecanismos naturais de remoção, tais como hidrólise (reação de natureza não redox com a água), volatilização, adsorção, absorção, oxidação ou redução e fotólise (degradação causada pela radiação solar). Com isso, o destino final dos compostos lançados nos recursos hídricos depende de suas características e propriedades físico-químicas (LIMA *et al.*, 2017). Condições tais como temperatura, pH, força iônica, existência de substâncias húmicas ou material particulado, influenciam significativamente na solubilidade e destino desses compostos, facilitando ou dificultando sua degradação no meio natural (RAIMUNDO, 2007). Alguns desses microcontaminantes sofrem biotransformação, resultando em metabólitos ou subprodutos igualmente ou até mais danosos que os compostos originais (BILA E DEZOTTI, 2007).

Após seu lançamento no ambiente, os microcontaminantes e seus metabólitos podem ser adsorvidos em sedimentos ou dissolvidos em água. A proporção de adsorção e dissolução de microcontaminantes é definida por suas propriedades; tais como solubilidade em água, coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) e coeficiente de adsorção (K_{oc}).

A solubilidade em água indica a quantidade máxima do composto que pode estar dissolvida a uma determinada temperatura. O coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) é a propriedade que estima o grau de hidrofobicidade da substância. As substâncias com $\log K_{ow}$ menor 2,5 apresentam característica hidrofílica, tendo afinidade com a água e baixa tendência em se associar à matéria orgânica presente no meio. Já as substâncias com valores de $\log K_{ow}$ acima de 4, apresentam alto potencial de sorção à matéria orgânica. Para aquelas que apresentam $\log K_{ow}$ entre 2,5 e 4, espera-se uma tendência moderada de absorção nas matrizes aquosa e orgânica (AQUINO *et al.*, 2013; ROGERS, 1996). A polaridade da substância está

inversamente relacionada à sua hidrofobicidade. Compostos com alto K_{ow} possuem grande afinidade por gorduras, podendo acumular-se no tecido gorduroso de animais, o que promove a bioacumulação na cadeia alimentar. O peso molecular também tem relação com a hidrofobicidade de uma substância, sendo que moléculas com alto peso molecular tendem a apresentar menor solubilidade em água (GHISELLI e JARDIM, 2007; LINTELMANN *et al.*, 2003). O coeficiente de adsorção (K_{oc}) descreve a adsorção de substâncias em matéria orgânica suspensa em águas superficiais, apresentando então, menor mobilidade. O valor do K_{oc} é diretamente proporcional à hidrofobicidade da substância química, ou seja, quanto maior o valor de K_{oc} , maior será a hidrofobicidade e maior a afinidade da substância pela matéria orgânica (LINTELMANN *et al.*, 2003).

A Tabela 4 apresenta as propriedades físico-químicas relevantes dos microcontaminantes estudados nesse trabalho. A partir dela, pode-se observar que os microcontaminantes estudados apresentam característica lipofílica, ou seja, preferência em ficarem adsorvidos em sedimentos ou outros materiais orgânicos. Contudo, apesar de possuírem maior tendência lipofílica, eles são constantemente encontrados em águas superficiais ou esgotos em quantidades significativas. O transporte facilitado por coloides e a formação de micelas são possíveis justificativas para esse comportamento dos microcontaminantes (CAMPBELL *et al.*, 2006). O processo de sorção em sedimentos suspensos pode ser um fator significativo na redução da concentração de microcontaminantes na fase aquosa.

Tabela 4 - Propriedades físico-químicas dos microcontaminantes de preocupação emergente estudados.

Microcontaminante	Fórmula molecular	MM (g)	Log K _{ow}	pKa	P.E (a 760 mmHg)	Solubilidade em água (mg/L)
Ibuprofeno	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206,285	3,97	4,91	319,64 °C	21
Paracetamol	C ₈ H ₉ NO ₂	151,165	0,46	9,38	387,83 °C	1,4 - 3x10 ⁴
4-Octilfenol	C ₁₄ H ₂₂ O	206,324	5,66	10,31	314,57 °C	3,1
4-Nonilfenol	C ₁₅ H ₂₄ O	220,350	5,76	4,53	330,64 °C	4,9 - 7
Naproxeno	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	230,263	3,18	4,15	403,89 °C	15,9
Bisfenol A	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	228,286	3,32	9,6	400,84 °C	120 - 300
Diclofenaco	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	296,147	4,51	4,15	411,97 °C	2,37
Estrona	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270,366	3,13	10,33	445,17 °C	6 - 13
17β-Estradiol	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272,382	4,01	10,33	445,92 °C	13
17α-etinilestradiol	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296,403	3,67	10,33	457,22 °C	11,3

Fonte: Campbell *et al.*, 2006; DrugBank; PubChem; Quaresma, 2014; Queiroz, 2011; Reaxys.

Os desreguladores endócrinos e fármacos são continuamente introduzidos no ambiente, o que lhes concede um caráter de persistência, mesmo possuindo meia-vida relativamente curta quando comparado a outros compostos orgânicos como pesticidas, por exemplo.

A presença desses contaminantes no ambiente, seu caráter de persistência e os possíveis efeitos de exposição em organismos em longo prazo impulsionou o desenvolvimento de métodos analíticos para a sua determinação em matrizes ambientais.

2.4 Métodos analíticos para determinação de microcontaminantes

Águas superficiais, sedimentos, efluentes de ETEs e esgoto bruto são exemplos de matrizes ambientais onde os microcontaminantes podem ser encontrados. A complexidade dessas amostras ambientais (devido a diversidade de moléculas orgânicas presentes), associada às baixas concentrações dos microcontaminantes, mobilizou o desenvolvimento de métodos analíticos suficientemente sensíveis para identificação e detecção desses contaminantes em diversas matrizes ambientais pela comunidade científica. O grande progresso na instrumentação analítica e técnicas eficientes de preparo de amostras e concentração dos analitos de interesse foram fatores primordiais para o desenvolvimento dos métodos analíticos utilizados para identificação e quantificação dos microcontaminantes (KOSTOPOULOU e NIKOLAOU, 2008).

O método EPA 1694 (EPA, 2007) é considerado o precursor de todas as metodologias já desenvolvidas até os dias atuais. Ele foi desenvolvido para a determinação de produtos farmacêuticos e de higiene pessoal em amostras ambientais (matriz aquosa, sólida e biossólida) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas tandem (CLAE/EM/EM). Já para a determinação de esteroides e hormônios também em amostras ambientais, desenvolveu-se o método EPA 1698 (EPA, 2007), em que a técnica analítica utilizada é cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CGAR/AT-EM). Esses métodos podem ser modificados visando o melhor desempenho analítico e, por isso, são utilizados como material base para o desenvolvimento de projetos ambientais de quantificação e identificação de produtos farmacêuticos, hormônios naturais e sintéticos e produtos de higiene pessoal.

Para a determinação de fármacos e desreguladores endócrinos, diferentes métodos de preparo de amostra e métodos analíticos são encontrados na literatura. A técnica mais

comumente utilizada para a extração e/ou pré-concentração dos microcontaminantes é a extração em fase sólida. Técnicas cromatográficas, líquida e gasosa, são as mais utilizadas para a análise desses compostos (QUEIROZ *et al.*, 2001). O acoplamento da espectrometria de massas a essas técnicas analíticas é o mais apropriado devido a sua grande seletividade e menores limites de detecção.

A Tabela 5 apresenta alguns dados de monitoramento de microcontaminantes estudados nesse trabalho em amostras ambientais encontrados na literatura.

Tabela 5 - Dados de monitoramento de microcontaminantes em amostras ambientais.

Matriz	Analitos	Preparo de amostra	Derivatização	Análise instrumental	Recuperação (%)	LD e LQ (ng/L)	Referência
Água residual	E1, E2, 4-NP, 4-OP, BPA	DLLME (200 µL clorofórmio/ 2,0 mL MeOH)	-	CG/EM (Coluna capilar HP-5MS 30 m x 250 µm x 0,25 µm; He a 1,8 mL/min)	86,5 (E1), 84,9 (E2), 91,2 (4-NP), 92,8 (4-OP), 89,7 (BPA)	LD: 0,24 (E1), 0,30 (E2), 0,16 (4-NP), 0,09 (4-OP), 0,33 (BPA) LQ: 0,80 (E1), 1,01 (E2), 0,55 (4-NP), 0,31 (4-OP), 1,10 (BPA)	CHORMEY <i>et al.</i> , 2017
Água superficial e residual	DCF, IBU, NPX, PCT, BPA, E2, E1, EE2	EFS: Oasis HLB (200 mg), 2 x 4 mL MeOH	-	CLAE -ESI-TOF/EM (Coluna Zorbax Eclipse Plus C18 50 mm x 4,6 mm x 1,8 µm; fase móvel (A) água mili-Q e (B) acetonitrila)	91,1 (DCF), 98,8 (IBU), 64,7 (NPX), 69,6 (PCT), 84,4 (E2), 53,6 (E1), 87,4 (EE2)	LQ: 19,4 (DCF), 15,2 (IBU), 23,2 (NPX), 8,6 (PCT), 592,4 (E2), 777,9 (E1), 550,4 (EE2)	ROBLES-MOLINA <i>et al.</i> , 2014
Água superficial e potável	E1, E2, EE2, BPA, 4-OP, 4-NP	EFS: Oasis HLB (500 mg), MeOH	-	CLAE-ESI/EM (Coluna Zorbax SB-C18 2,1 x 30 mm x 3,5 µm; fase móvel (A) água e (B) MeOH, ambos com NH ₄ OH 0,1%)	81 (E1), 109 (E2), 103 (EE2), 82 (BPA), 98 (4-OP), 72 (4-NP)	LD: 0,1 (E1), 1,0 (EE2), 0,2 (E2), 0,04 (4-OP, 4-NP), 0,4 (BPA), LQ: 0,3 (E1), 3,1 (EE2), 0,6 (E2), 0,1 (4-OP, 4-NP), 1,2 (BPA)	JARDIM <i>et al.</i> , 2012

Água superficial	E2, EE2, BPA, 4-NP	EFS: C18 (500 mg), acetato de etila	-	ESI-CL-IT-TOF/EM (Colunas Shimadzu C18 100,0mm x 2,1 mm x 3,0 µm; fase móvel (A) água e (B) MeOH)	94,7 (E2), 92,1 (EE2), 92,2 (BPA), 91,7 (4-NP)	LQ: 3,6 (E2), 4,7 (EE2), 2,5 (BPA), 3,9 (4-NP)	MOREIRA <i>et al.</i> , 2011
Água, sedimentos e efluentes de ETAR	E1, E2, IBU, NPX, PCT, DCF	EFS: Oasis HLB (200 e 500 mg), 6 mL MeOH	-	CL-EM/EM (Coluna Dionex C18 150 mm x 2,1 mm x 3 µm; IP fase móvel (A) MeOH e (B) 0,1% ácido fórmico; IN (A) MeOH e (B) água)	-	LD**: 1,0-2,0 (E1), 0,5-0,6 (E2), 0,5-0,6 (IBU), 0,1-0,2 (NPX), 0,5-0,6 (PCT), 0,5-0,6 (DCF) LQ**: 3,3-6,5 (E1), 1,7-2,1 (E2), 1,7-2,1 (IBU), 0,3-0,5 (NPX), 1,7-2,1 (PCT), 1,7-2,1 (DCF)	HE <i>et al.</i> , 2018
Esgoto bruto	E2, EE2, BPA, DCF	EFS: Strata SAX (500 mg), acetato de etila e Strata X (divinilbenzeno-pirrolidona), MeOH e MeOH /acetona (1:1)	-	ESI-CL-IT-TOF/EM (Coluna Shim-pack VP ODS C18 150 mm x 2 mm x 3 µm; fase móvel (A) água e (B) MeOH, ambos com 3 mM NH ₄ OH)	Strata SAX: 35,4 (E2), 23,2 (EE2), 24,9 (BPA), 26,7 (DCF) Strata X: 8,0 (E2), 6,6 (EE2), 37,6 (BPA), 19,9 (DCF)	LD: 9,3 (E2), 12,4 (EE2), 1,2-2,1 (BPA), 5,0-8,8 (DCF) LQ: 31,0 (E2), 41,3 (EE2), 4,0-7,1 (BPA), 16,5-29,3 (DCF)	QUEIROZ <i>et al.</i> , 2014

Esgoto	E1, E2, EE2, BPA, 4-NP, 4-OP, IBU, PCT, NPX, DCF	EPBT: 3 mL de acetonitrila, freezer por 3 horas (3x), pH = 2	25 µL piridina + 75 µL BSTFA + 1% TCMS (aquecimento a 80 °C por 30')	CG/EM (Coluna ZB-5HT 30 m x 0,25 mm x 0,10 µm; He a 1,46 mL/min)	55,37 (E1), 82,46 (E2), 141,08 (EE2), 135,87 (BPA), 263,64 (4-NP), 115,96 (4-OP), 82,45 (IBU), 811,86 (PCT), 1536,08 (DCF)	LD: 0,089 (E1), 0,95 (E2), 0,41 (EE2), 1,3 (BPA), 3,8 (4-NP, 4-OP), 6,4 (IBU), 3,1 (PCT), 0,53 (DCF) LQ: 0,3 (E1), 3,2 (E2), 1,4 (EE2), 4,6 (BPA), 13 (4-NP, 4-OP), 21 (IBU), 11 (PCT), 1,8 (DCF)	LIMA, 2013
Esgoto	E1, E2, EE2, IBU, PCT, NPX, DCF	EFS: HLB (200 mg), 6 mL MeOH	50 µL piridina + 50 µL BSTFA + 1% TCMS, 60°C por 30'	CG/EM (Coluna Rtx-5 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; He a 2,0 mL/min EI a 70 eV)	80,3 (E1), 68,2 (E2), 83,9 (EE2), 102,4 (IBU), 89,4 (PCT), 70,8 (NPX), 75,6 (DCF)	LD: 8,5 (E1), 10 (E2), 8,1 (EE2), 6,6 (IBU), 7,6 (PCT), 16,9 (NPX), 52,9 (DCF) LQ: 24,9 (E1), 29,3 (E2), 23,8 (EE2), 19,5 (IBU), 22,4 (PCT), 56,5 (NPX), 158,7 (DCF)	MIGOWSKA <i>et al.</i> , 2012

Esgoto	E1, E2, EE2, BPA, 4-NP, 4-OP	EFS: Sep-Pak Vac C18 (500 mg), 2 mL MeOH	-	CL/ESI/EM/EM (Coluna de fase reversa Pursuit XRs Ultra-C18 50 mm x 2 mm x 2,8 µm; fase móvel (A) água e (B) MeOH com 0,1% ácido acético e 15 mM acetato de amônio)	81 (E1), 91 (E2), 79 (EE2), 82 (BPA), 82 (4-NP), 79 (4-OP)	LD: 4,0 (E1), 3,3 (E2), 2,8 (EE2), 5,7 (BPA), 2,7 (4-NP), 5,7 (4-OP)	VEGA-MORALES <i>et al.</i> , 2010
Esgoto e efluente de ETE	BPA, 4-NP, 4-OP, E1, E2, EE2	EFS: Oasis HLB (0,2 g), 10 mL de acetato de etila	50 µL piridina + 50 µL BSTFA + 1% TCMS (aquecimento a 60-70°C por 30')	CG/EM (Coluna capilar HP-5 30 m x 0,25mm x 0,25 µm; He a 1,0 mL/min)	Efluente: 75,3 (BPA), 85,5 (4-NP), 71,2 (4-OP), 76,5 (E1), 82,7 (E2), 84,7 (EE2)	-	ZHANG <i>et al.</i> , 2006
Lodo ativado	BPA, E1, E2, EE2	EUS: 6 mL MeOH SPME: 10 mL água ultrapura, pH 3, NaCl (23% p/v)	-	CG/EM (Coluna SLB™ 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; He a 1,0 mL/min)	-	LD*: 3,9 (BPA), 1,0 (E1), 13,3 (E2), 6,1 (EE2)	VAKONDIOS <i>et al.</i> , 2016

Lodo de esgoto	IBU, PCT, NPX, DCF, E1, E2, EE2	EFS: Oasis HLB (0,2g), 6 mL MeOH	50 µL piridina + 50 µL BSTFA + 1% TCMS (aquecimento a 60°C por 30')	CG/EM (Coluna Rtx-5 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; He a 2,0 mL/min)	108,2 (IBU), 51,6 (PCT), 91,7 (NPX), 107,5 (DCF), 38,7 (E1), 82,3 (E2), 75,9 (EE2)	LD* : 0,3 (IBU), 0,6 (PCT), 0,7 (NPX), 1,9 (DCF), 0,9 (E1), 0,4 (E2), 0,4 (EE2) LQ* : 0,9 (IBU), 1,9 (PCT), 2,2 (NPX), 5,6 (DCF), 2,6 (E1), 1,2 (E2), 1,3 (EE2)	KUMIRSKA <i>et al.</i> , 2015
Lodo de esgoto	E1, E2, EE2, BPA, 4-NP, 4-OP	PLE: Água/MeOH/Acetona (1:2:1, v/v)	-	TFC-CL/EM (Coluna Hypersil GOLD 75x 2,1 mm x 3 µm, IN; Coluna Purospher STAR RP-18 125 x 2 mm x 5 µm, C18 fase reversa, IP)	103 (E1), 95 (E2), 101 (EE2), 95 (BPA), 92 (4-NP), 99 (4-OP)	LD* : 2,2 (E1), 38 (E2), 19 (EE2), 2,0 (BPA), 0,99 (4-NP), 0,20 (4-OP) LQ* : 7,4 (E1), 125 (E2), 62 (EE2), 6,8 (BPA), 3,29 (4-NP), 0,69 (4-OP)	GORGA <i>et al.</i> , 2014
Lodo de esgoto	BPA, E1, 4-NP, 4-OP, DCF, IBU, NPX, PCT	EUS: 5 mL MeOH com ácido fórmico (1%); EFS: Oasis HLB (500 mg), 4 x 1 mL MeOH; Supelclean Envi-carb (500 mg), 1 mL MeOH + 1 mL MeOH com ácido fórmico	100 µL MTBSTFA (aquecimento a 70 °C por 60')	CG/EM (Coluna HP-5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; He a 1,2 mL/min)	85 (BPA), 79 (E1), 75 (4-NP), 72 (4-OP), 84 (DCF), 94 (IBU), 99 (NPX), 70 (PCT)	LD* : 1,4 (BPA), 4,8 (E1), 2,3 (4-NP), 1,6 (4-OP), 11 (DCF), 2,0 (IBU), 2,2 (NPX), 11,0 (PCT) LQ* : 4,7 (BPA), 16,0 (E1), 7,7 (4-NP), 5,4 (4-OP), 37 (DCF), 6,7 (IBU), 7,6 (NPX), 39,0 (PCT)	YU E WU, 2012

Lodo ativado	E1, E2, EE2, BPA, 4-NP	EFS: Oasis HLB (500 mg), 10 mL diclorometano/ acetona (7:3)	50 µL piridina + 50 µL BSTFA + 1% TCMS (aquecimento a 60-70 °C por 30' em banho ultrassônico)	CG/EM (Coluna capilar HP-5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; He a 1,5 mL/min; EI)	90,3 (E1), 96,3 (E2), 110,9 (EE2), 96 (BPA), 87,2 (4-NP)	LQ* : 1,5 (E1), 1,2 (E2), 10,0 (EE2), 1,3 (BPA), 188,7 (4-NP)	NIE <i>et al.</i> , 2009
-----------------	------------------------------	--	--	---	---	--	-----------------------------

BPA: Bisfenol A

4-NP: 4-Nonilfenol

4-OP: 4-Octilfenol

E2: 17β-estradiol

EE2: 17α-etinilestradiol

E1: Estrona

EFS: Extração em fase sólida

DLLME: Microextração dispersiva líquido-líquido

EPBT: Extração com partição em baixa temperatura

MeOH: metanol

BSTFA: N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida

TCMS: trimetilclorosilano

ESI: Ionização por eletrospray

IT: *Ion Trap* (armadilha de íons)TOF: *Time of flight* (tempo de voo)

CLAE/EM: Cromatografia líquida de alta eficiência

acoplada a espectrometria de massas

CG/EM: Cromatografia gasosa acoplada a

espectrometria de massas

EI: ionização por impacto de elétrons

IP: Ionização positiva

IN: Ionização negativa

PLE: Extração líquida pressurizada

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

EUS: Extração Ultra-Sônica

MTBSTFA: N-terc-butildimetilsilil-N-

metiltrifluoroacetamida

TFC-LC/MS: Cromatografia líquida de fluxo

turbulento acoplada a espectrometria de massas

PI: Padrão interno

* ng/g

** Fase líquida (ng/L) e fase sólida (ng/g)

respectivamente

2.4.1 Técnicas cromatográficas

Nos últimos anos, vários métodos de análise de microcontaminantes de preocupação emergente presentes em amostras ambientais foram publicados. Dentre as técnicas instrumentais disponíveis para a identificação e quantificação de fármacos e desreguladores endócrinos, a cromatografia, líquida ou gasosa, é a mais utilizada. A cromatografia é uma técnica físico-química de separação, fundamentada na afinidade/interação dos compostos presentes na amostra com duas fases imiscíveis, a fase móvel e a estacionária. Essa técnica é muito vantajosa por conseguir separar constituintes de misturas complexas, como as amostras ambientais, com grande exatidão (SKOOG *et al.*, 2006; DA SILVA E COLLINS, 2011).

Na cromatografia gasosa, os componentes de uma amostra vaporizada são separados em consequência de sua partição entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida contida dentro da coluna. Ao realizar-se uma separação por cromatografia gasosa a amostra é vaporizada e injetada na coluna cromatográfica. A eluição é feita por um fluxo de fase móvel gasosa inerte que, em contraste com muitos outros tipos de cromatografia, não interage com as moléculas do analito; sendo sua única função transportar o analito através da coluna. A cromatografia gasosa é aplicada às substâncias voláteis e termicamente estáveis (SKOOG *et al.*, 2006). No entanto, reações de derivatização podem ser realizadas em compostos não voláteis permitindo, com isso, a análise desses compostos por cromatografia gasosa.

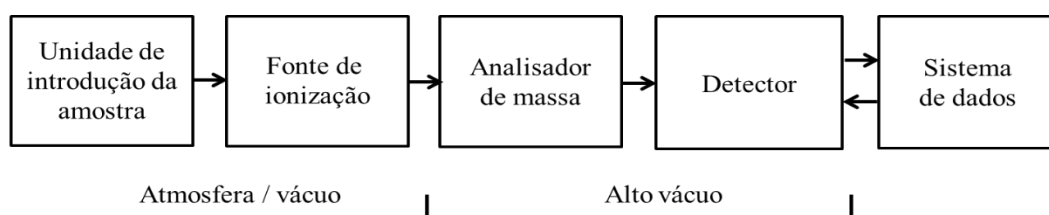
A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o tipo mais versátil e mais amplamente empregado de cromatografia por eluição. Essa técnica é utilizada para separar e determinar espécies em uma grande variedade de materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos. Na cromatografia líquida, a fase móvel é um solvente líquido, o qual contém a amostra na forma de uma mistura de solutos (SKOOG *et al.*, 2006). Esse método é adequado e aplicado para uma variedade de compostos orgânicos que apresentam polaridade mais alta e volatilidade mais baixa ou ainda elevada instabilidade térmica (DA SILVA E COLLINS, 2011). A principal vantagem da cromatografia líquida em relação à gasosa é a análise de compostos termolábeis e a não necessidade de derivatização.

A cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção, tratando-se de uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho. O acoplamento de um cromatógrafo com um espectrômetro de massas combina a alta seletividade e eficiência de separação da cromatografia com a obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento

adicional da seletividade decorrentes da técnica de espectrometria de massas (VÉKEY, 2001). As técnicas mais comumente acopladas à espectrometria de massas são a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Com o acoplamento da espectrometria de massas, as técnicas de cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência serão a unidade de introdução da amostra no espectrômetro (detector). A unidade de introdução de amostra leva os analitos até a fonte de ionização, onde as moléculas da amostra são transformadas em íons na fase gasosa. Em seguida, os íons gasosos da amostra serão separados no analisador de massas com base em sua razão massa/carga (m/z). Os íons são, então, contados pelo detector, e o sinal é registrado e processado pelo sistema de dados. O espectro de massa é o produto do sistema de dados - um gráfico do número de íons detectados em função de sua razão m/z (PAVIA *et al.*, 2015). A Figura 8 mostra os componentes de um espectrômetro de massas.

Figura 8 - Componentes de um espectrômetro de massas.



Fonte: Adaptado de Gross, 2004, *apud* PAVIA *et al.*, 2015.

Na cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas, as principais fontes de ionização empregadas são: ionização por eletronebulização (*electrospray ionization*, ESI), utilizada para compostos polares; e ionização química à pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI), usada para análise de compostos de baixa e média polaridade. No entanto, tais métodos de ionização são suscetíveis a efeitos de matriz, principalmente quando se trata de matrizes complexas como as ambientais, levando aos efeitos de supressão ou aumento do sinal analítico e comprometendo os limites de detecção e a exatidão dos métodos (HERNÁNDEZ *et al.*, 2007). Portanto, a análise de microcontaminantes orgânicos em matrizes ambientais exige um tratamento prévio das amostras, devido à sua complexidade e ao fato dos microcontaminantes estarem presentes em concentrações de níveis traço, tendo como objetivo separar e pré-concentrar os compostos alvo.

2.4.2 Métodos de preparo de amostras

A preparação da amostra, também conhecida como tratamento da amostra, extração e concentração dos analitos, limpeza dos extratos (*clean-up*), é primordial para a quantificação de microcontaminantes em amostras ambientais. Esse tratamento inicial tem como objetivos isolar e concentrar os analitos de interesse e eliminar ou minimizar a interferência de outros componentes da matriz, ou seja, deseja-se obter uma sub-fração da amostra original enriquecida com os analitos de interesse, visando uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise. O preparo de amostras deve apresentar recuperações razoáveis, boa exatidão e precisão (QUEIROZ *et al.*, 2001). A escolha da técnica adequada para a etapa de preparo da amostra depende estritamente das propriedades do analito, tais como: a volatilidade, a polaridade, a estabilidade e as solubilidades em água e em solvente orgânico (BARROS, 2014).

Existem diversas técnicas comumente utilizadas no preparo de amostras complexas como extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*, ELL), microextração em fase sólida (*solid phase microextraction*, MEFS) e extração em fase sólida (*solid phase extraction*, EFS). Estas técnicas podem ser subdivididas em dois modos: “off-line” e “on-line”. No “off-line”, a etapa de extração e/ou concentração do analito é realizada separadamente do sistema cromatográfico. No sistema “on-line”, a etapa de extração e/ou concentração do analito é realizada no próprio sistema cromatográfico, onde são inseridos alguns acessórios (QUEIROZ *et al.*, 2001).

A extração em fase sólida (EFS) funciona como uma separação cromatográfica, onde ocorre a separação dos analitos de interesse pela afinidade de polaridade entre as fases envolvidas. A amostra é colocada em um cartucho preenchido por um extrator em fase sólida (conhecido como sorvente e que possui caráter apolar) e aplica-se pressão ao sistema. As moléculas orgânicas são extraídas da amostra e concentradas na fase sólida extratora e são posteriormente eluídas por um solvente (SKOOG *et al.*, 2006). Uma grande variedade de sorventes está disponível comercialmente, porém os mais frequentemente utilizados no preparo de amostras contendo medicamentos e desreguladores endócrinos são os de C18, que consiste em cadeia alifática de 18 carbonos em suporte de sílica, e HLB Oasis[®] que consiste em um copolímero poroso, o poli (divinil-benzeno-co-N-vinilpirrolidona), com uma capacidade de adsorção de compostos hidrofílicos e lipofílicos simultaneamente (DA SILVA E COLLINS, 2011). Em geral, os procedimentos de EFS contêm 5 etapas: i) ativação do sorvente para deixar os sítios ativos disponíveis; ii) condicionamento do sorvente com

solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra; iii) introdução da amostra, etapa em que ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes; iv) limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito; v) eluição e coleta do analito (QUEIROZ *et al.*, 2001).

O princípio da extração líquido-líquido (ELL) baseia-se no mecanismo de partição dos componentes da amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa). A eficiência da extração, portanto, depende da afinidade do soluto pelo solvente extrator, da razão entre as duas fases e do número de extrações. Essa técnica possui muitas desvantagens, tais como: volumes relativamente grandes de amostras e de solventes são requeridos, gerando problemas de descartes; os analitos com alta afinidade pela água são parcialmente extraídos pelo solvente orgânico, resultando em perdas do analito; impurezas do solvente são concentradas junto com a amostra, implicando no uso de solventes ultrapuros; pode ocorrer formação de emulsões, o que dificulta o processo de extração e aumento no tempo (QUEIROZ *et al.*, 2001).

A extração por partição em baixa temperatura (EPBT) é variação da ELL convencional e foi desenvolvida utilizando baixas temperaturas para facilitar a partição de fases com polaridades próximas. A EPBT foi utilizada nesse projeto como técnica de preparo de amostras para análises de esgoto bruto por CG/EM.

A EPBT consiste na adição de uma pequena quantidade de um solvente orgânico às matrizes, tais como água (GOULART *et al.*, 2010), urina (GOMES *et al.*, 2017), esgotos (LIMA, 2013), leite (REGO *et al.*, 2015), entre outras, formando inicialmente uma mistura completamente miscível. A solução é refrigerada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante aproximadamente 3 horas. Com isso, a fase aquosa solidifica-se, enquanto o sobrenadante orgânico permanece líquido, consistindo principalmente do solvente orgânico e analito (s) solubilizado (s), podendo ser prontamente isolado (s) e posteriormente analisado (s). Por ser um método simples, devido ao seu número reduzido de etapas, pode ser amplamente utilizado como etapa de preparo de amostras. Um pequeno volume de amostra e de solvente orgânico são necessários para se obter um extrato relativamente limpo (GOULART *et al.*, 2010).

Essa técnica foi abordada por Gomes *et al.* (2017) na determinação do ácido S-fenilmercaptúrico presente em amostras de urina. As amostras foram acidificadas com ácido clorídrico e submetidas à agitação. O solvente extrator (acetonitrila) foi adicionado às amostras durante a agitação, em uma relação volumétrica 1:1 (acetonitrila/urina). As amostras foram deixadas em um congelador a cerca de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas, com a finalidade de ocorrer a separação de fases. Após o congelamento da fração aquosa, a fase orgânica foi

cuidadosamente removida e analisada por UHPLC-MS/MS. Os limites de detecção e quantificação do método foram de 0,02 e 0,084 µg/L, respectivamente. A técnica de extração mostrou-se de baixo custo e eficaz na extração do analito de interesse, com recuperação de 96,1%.

Goulart *et al* (2010) validou e otimizou a extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura para análise de três carbamatos (aldicarb, carbofurano e carbaryl) em amostras de água por cromatografia líquida de alta performance com detecção ultravioleta (HPLC-UV).

Já Lima (2013) utilizou a técnica de extração para a determinação de fármacos, hormônios naturais e sintéticos e fenóis em amostras de esgoto doméstico. Esse estudo avaliou diversas condições de extração como volume de solvente extrator, força iônica e pH da amostra através de um planejamento fatorial completo com ponto central. As melhores condições de extração, ou seja, as condições que garantiram maior recuperação dos analitos de interesse, foram o ajuste do pH da amostra para 2, utilização de 4 mL de amostra de esgoto, adicionar a ela 3 porções de 3 mL de acetonitrila como solvente extrator e resfriamento por 3 horas para cada extração. Após a extração, a amostra foi derivatizada e submetida à análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).

Rego *et al* (2015) validou um novo método de determinação do antibiótico cloranfenicol (CAP) em amostras de leite utilizando a técnica EPBT, com acetonitrila como solvente extrator, no preparo de amostras e cromatografia líquida de diluição isotópica acoplada a espectrometria de massas em tandem (ID-LC-MS/MS). Foi o primeiro trabalho a utilizar a técnica EPBT como preparo de amostras de leite cru e semidesnatado para a determinação de CAP.

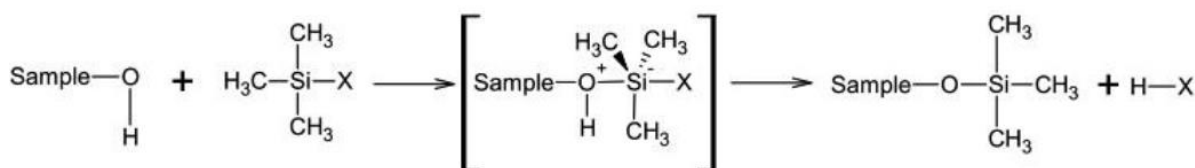
A EPBT destaca-se por ser uma técnica simples, de menor custo, por usar pequenos volumes de solvente e de amostras, de fácil execução, quando comparada a técnicas usualmente utilizadas para extração de microcontaminantes, além de ser eficiente para a extração de compostos polares e apolares de amostras aquosas e proporcionar elevado grau de concentração do analito após a evaporação do solvente extrator. Além disso, trabalhos recentes vêm mostrando a versatilidade e a eficiência da aplicação da técnica, dando respaldo para a utilização da mesma na determinação de analitos com diferentes polaridades, como é o alvo deste estudo. O uso da técnica EPBT em esgoto bruto, ou seja, extração dos analitos presentes nas frações aquosa (solúveis) e sólida de esgotos, simultaneamente, não é relatada na bibliografia.

2.4.3 Derivatização

A cromatografia gasosa, juntamente à cromatografia líquida, são os principais métodos para análise de microcontaminantes em amostras ambientais. No entanto, algumas características dos analitos de interesse podem inviabilizar a análise por CG, tais como baixa volatilidade, instabilidade térmica e presença de grupos funcionais polares (que resulta em compostos com elevada temperatura de ebulição) (FANG *et al.*, 2010). Para tornar possível a análise por CG, esses compostos precisam sofrer alterações (como o aumento de sua massa molecular e redução de sua polaridade) para que tenham o ponto de ebulição condizente com a temperatura usada na coluna (SANSON, 2012). Para tanto, necessitam passar pelo processo de derivatização que consiste em uma modificação dos grupos funcionais da molécula, aprimorando seu perfil cromatográfico pela redução da polaridade, aumento da volatilidade e estabilidade térmica. A derivatização também é empregada para evitar a perda do analito por adsorção à coluna ou por decomposição térmica (HALKET E ZAIKIN, 2003; HUANG *et al.*, 2011; SANSON, 2012).

Compostos que contém grupos funcionais como por exemplo carbonila (-COOH), hidroxila (-OH), tiol (-SH), amino (-NH₂) e imino (=NH) não apresentam volatilidade suficiente para serem analisados por CG além da possibilidade de interações com os grupos silanóis remanescentes da fase estacionária ou até mesmo impurezas do sistema cromatográfico, resultando em pior resolução bem como menor detecção. A reação de derivatização irá substituir os hidrogênios livres ativos presentes das funções citadas por grupamentos mais apolares que não apresentem a característica de formação de ligações de hidrogênio, alterando a estrutura química do analito, possibilitando a análise pela técnica, como pode ser visto na Figura 9 (BECKER, 2012).

Figura 9 - Mecanismo genérico da reação de derivatização, onde X varia de acordo com os diferentes agentes derivatizantes.



Fonte: Adaptado de Becker, 2012.

O reagente derivatizante utilizado neste trabalho é o bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), adicionado de uma pequena quantidade (1%) do catalisador trimetilclorosilano (TCMS), que visa aumentar a eficiência da reação, é um dos mais utilizados para análise de microcontaminantes em amostras ambientais.

2.5 Validação do método analítico

O desenvolvimento ou adaptação de um método analítico ou a implementação de um método conhecido depende de dois parâmetros importantes: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos em seu processamento. É necessário garantir que o método analítico desenvolvido obtenha informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra e, para isso, o método deve sofrer uma avaliação denominada validação, onde se estabelece os limites dos parâmetros do método por meio de estimativa das figuras de mérito. Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) “a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (RIBANI *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2008).

Conclusões infundadas, super ou subestimação de efeitos e falsas interpretações podem ocorrer caso a confiabilidade dos dados seja questionável. Quando não contestados oficialmente por especialistas da área, esses erros podem se propagar pela comunidade científica, tornando-se parte do conhecimento geral aceito em determinada área de pesquisa (BARROS, 2014).

Dentro do âmbito geral de validação de métodos é possível distinguir dois tipos: validação em laboratório (*in house validation*) e validação completa (*full validation*). A validação em laboratório consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório visando comprovar a confiabilidade de um método em desenvolvimento ou avaliar se o método utilizado em outras fontes foi bem aplicado. Já a validação completa, avalia todas as características de desempenho e realiza um estudo interlaboratorial, com o intuito de verificar o comportamento da metodologia em diversos laboratórios, estabelecendo com isso a reprodutibilidade e a incerteza expandida, associadas à metodologia como um todo (RIBANI *et al.*, 2004).

Várias agências reguladoras possuem diretrizes para a validação de metodologias analíticas, ficando a critério do analista selecionar os parâmetros a serem otimizados (RIBANI *et al.*, 2004; SANSON, 2012). No Brasil, os dois órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos são o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Os critérios de validação adotados neste trabalho tiveram como principais referências os documentos: Guia de orientação sobre validação de métodos analíticos (DOQ-CGCRE-008) do INMETRO (2018) e Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA (2003).

A seguir, os parâmetros de validação utilizados neste estudo são descritos detalhadamente.

2.5.1 Aplicabilidade

A identificação dos analitos a serem estudados pelo método, a faixa de concentração e o tipo de matriz devem ser definidos. É necessário especificar um protocolo com as descrições de todas as etapas do processo de validação, incluindo reagentes, equipamentos, condições de armazenamento de amostras e qualquer precaução implicada à análise, assim como os dados de precisão do método (BARROS, 2014).

2.5.2 Seletividade

A seletividade é a capacidade de quantificar os analitos de interesse inequivocamente na presença de interferentes, como metabólitos, produtos de degradação, entre outros. Como princípio geral, a seletividade deve ser suficientemente boa para que qualquer interferência seja ignorada. Caso a seletividade não seja assegurada, haverá comprometimento da linearidade, exatidão e precisão (RIBANI *et al.*, 2004). No entanto, como o método em estudo utiliza como detector o espectrômetro de massas, este garante a seletividade necessária, através da seleção dos tempos de retenção e razão m/z adequados.

2.5.3 Curva analítica e linearidade

O modelo matemático que correlaciona as áreas dos picos cromatográficos dos analitos de interesse com as concentrações crescentes conhecidas dos mesmos é denominado curva analítica de calibração. A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância estudadas, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI *et al.*, 2004). Porém, a qualidade do ajuste não é indicada apenas pelo coeficiente de correlação. Pode-se avaliar a linearidade também por meio da distribuição do ruído (que é o valor do erro entre o valor estimado e o medido). Se a distribuição deste ruído for homogênea, afirma-se que o método tem homocedasticidade, ou seja, que a distribuição dos seus erros é homogênea. Caso a distribuição seja heterogênea, afirma-se que os dados de calibração são heterocedásticos e, portanto, devem ser analisados por uma regressão ponderada para garantir uma redução do erro na faixa baixa de concentração (BARROS, 2014).

Para as construções da curva analítica são necessários:

- Seis ou mais níveis de calibração;
- Os níveis de calibração devem estar uniformemente espaçados na faixa de concentração;
- A faixa de concentração deve ser de 0 a 150% ou de 50 a 150% do valor de concentração esperado em amostras reais, e;
- Os níveis de calibração devem ser analisados em, no mínimo, duplicatas e preferencialmente em triplicatas ou mais números de repetição.

A quantificação do composto de interesse em validação pode ser obtida através de padronização externa; padronização interna; superposição de matriz e adição de padrão. Neste trabalho foi utilizado o método de padronização interna que consiste na adição de uma quantidade conhecida de padrão interno (PI) em amostras contendo soluções padrões de concentrações conhecidas dos analitos de interesse. A substância usada como padrão interno não deve estar presente na amostra (já que sua concentração precisa ser conhecida), deve ser similar à substância a ser quantificada, ter tempo de retenção próximo a essa substância e não reagir com a substância ou com outro componente da matriz (RIBANI *et al.*, 2004). O PI

também é primordial em análises por cromatografia gasosa, já que através de sua presença é possível monitorar a etapa de derivatização (SANSON, 2012).

A curva analítica é então confeccionada utilizando a razão da área entre o analito e o padrão interno que tem concentração constante.

2.5.4 Efeito matriz

Adicionam-se os compostos de interesse em uma matriz, de preferência ausente destes compostos, e analisa-a para verificar o comportamento das respostas dos analitos na mesma em relação aos padrões em solvente.

2.5.5 Exatidão

A exatidão verifica se o método é capaz de quantificar a concentração real presente na amostra (INMETRO, 2018). Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são:

- Análise de material de referência certificado (MRC), o qual possui valor definido de concentração dos analitos de interesse, onde se compara a resposta obtida pelo método de validação com os valores certificados deste material;
- Comparação de métodos, onde uma amostra pode ser analisada pelo método em processo de validação e seu resultado comparado com a análise da mesma amostra por outro método de referência, e;
- Adição e recuperação, utilizado quando não há disponibilidade de material certificado ou método de referência. A exatidão é mensurada adicionando-se uma concentração conhecida em uma amostra e verificando a capacidade do método de retornar o valor esperado adicionado previamente. A resposta obtida para o analito adicionado na matriz e extraído é comparada com a resposta obtida para o analito em amostras preparadas em solvente e, conseqüentemente, não extraídas, ou com adição do analito após a extração as quais representam 100% (BARROS, 2014; GOMES, 2016; RIBANI *et al.*, 2004).

2.5.6 Precisão

A precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes (repetições) na mesma amostra. O valor que indica uma maior ou menor precisão é o desvio padrão ou o desvio padrão relativo também conhecido como coeficiente de variação (CV). A precisão pode ser avaliada em três níveis: Repetibilidade (precisão intra-dia ou precisão intra-corrída); precisão intermediária (precisão inter-dias ou precisão inter-corrídas) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) (ANVISA, 2003; GOMES, 2016; RIBANI *et al.*, 2004).

2.5.7 Limite de detecção (LDM) e de quantificação (LQM) do método

O limite de detecção do equipamento (*limit of detection* - LD) representa a menor concentração do analito que pode ser distinguida confiavelmente do zero (ou do branco). Já o limite de quantificação do equipamento (*limit of quantification* - LQ) indica a menor concentração que pode ser analisada com uma precisão e exatidão dentro dos limites aceitáveis.

Estes limites podem ser calculados por três maneiras:

- Método visual: soluções padrão diluídas são injetadas e visualmente observa-se e constata-se como LD a menor concentração que pode ser detectada e que difere do sinal analítico do ruído, e o LQ como a menor concentração quantificável;
- Método da relação sinal-ruído: é aplicado a partir do ruído da linha de base. Admite-se o LD como sendo a concentração correspondente a uma relação sinal-ruído de 3:1 ou 2:1, e o LQ a concentração para a relação sinal-ruído de 10:1, e;
- Método baseado em parâmetros da curva analítica: neste caso o LD será 3,3 vezes o desvio padrão do branco analítico dividido pelo coeficiente angular da curva analítica, enquanto o LQ será 10 vezes essa relação.

Para definir os limites de detecção do método (LDM) e quantificação do método (LQM) é necessário considerar, os limites de detecção e quantificação do equipamento e os fatores de concentração do procedimento de extração e o índice de recuperação da etapa de extração, e o efeito matriz.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo principal do trabalho foi avaliar a eficácia da técnica de extração por partição a baixa temperatura (EPBT) em amostras de esgoto bruto não filtrado visando a quantificação de microcontaminantes orgânicos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). Os compostos orgânicos estudados foram: produtos farmacêuticos (diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno e paracetamol), hormônios naturais e sintéticos (17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol e estrona) e fenóis (bisfenol A, 4-nonilfenol e 4-octilfenol).

3.2 Objetivos específicos

- Validar a técnica de extração por partição em baixa temperatura para amostras de esgoto bruto (amostra não filtrada);
- Avaliar a recuperação da técnica EPBT em amostras de esgoto bruto comparativamente a outras técnicas de extração, comprovando ou não a aplicabilidade e eficiência da extração simultânea dos microcontaminantes orgânicos presentes nas frações solúveis e sólidas do esgoto;
- Aplicar a técnica validada em amostras autênticas de esgoto bruto da Estação de Tratamento de Esgotos da cidade de Itabirito, Minas Gerais, avaliando a ocorrência dos microcontaminantes estudados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Procedimentos fundamentados no uso de técnicas com baixos índices de contaminação foram empregados em todas as etapas do desenvolvimento analítico deste trabalho, como, por exemplo, o manuseio de materiais com luvas vinílicas. Todas as vidrarias foram previamente lavadas com detergente não iônico Extran[®] 12,5% com auxílio de uma escova, enxaguadas exaustivamente com água corrente e, em seguida, enxaguadas com quantidade suficiente de água ultrapura para retirar os vestígios de água de torneira. Após a lavagem, todas as vidrarias foram mantidas imersas, durante 24 horas, em solução de ácido nítrico 10% e, em seguida, enxaguadas exaustivamente com água ultrapura. As vidrarias não volumétricas foram levadas à estufa para secagem e as volumétricas secaram naturalmente em uma bancada limpa.

4.1 Reagentes, solventes, equipamentos e vidrarias

- Padrões analíticos: 4-nonilfenol, 4-octilfenol, bisfenol A, 17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol, estrona, estriol, ibuprofeno, paracetamol, diclofenaco, naproxeno; todos Sigma[®] ou Fluka[®]. Padrão interno: 4-nonilfenol deuterado (4-nnonylphenol-2,3,5,6-d₄, OD) CDN isotopes[®];
- Reagentes (grau HPLC): acetonitrila (J. T. Backer[®]), diclorometano (J. T. Backer[®]), ácido clorídrico (Vetec[®]), acetato de etila (J. T. Backer[®]), hidróxido de amônio (J. T. Backer[®]), bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida com 1% de trimetilclorosilano (BSTFA: 1% TMCS, Sigma[®]), piridina (Merck[®]);
- Frascos de vidro âmbar de 10 mL e 1000 mL com tampa e batoque de teflon;
- Agitador vórtex (VELP Scientifica[®]);
- Banho de ultrassom (UNIQUE[®]);
- Centrífuga (FANEM[®] modelo 206);
- Sistema para filtração à vácuo (funil de vidro, base suporte em vidro esmerilhado, conexão para vácuo, grampo em alumínio e erlenmeyer (2000 mL)), Phox[®];
- Filtros de membrana de celulose (25 μ m e 8 μ m), Unifil[®];
- Filtros de fibra de vidro (1,2 μ m), Sartorius[®];
- Micropipetas de volumes variados (1000 μ L, 100 μ L e 10 μ L);
- Béqueres, balões volumétricos, provetas e tubos tipo *falcon*;
- pHmetro digital (HANNA[®]);

- *Vials e inserts;*
- Coluna cromatográfica Zebron ZB-5MSi (30,0m × 0,25mm × 0,25 µm);
- Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas – CG/EM- Shimadzu QP2010S – Plus (Shimadzu®).

4.2 Coleta e armazenamento de amostras

A coleta de amostras foi realizada na ETE Marzagão, da cidade de Itabirito, Minas Gerais. Amostras de esgoto bruto foram coletadas na entrada da estação de tratamento por amostragem simples. Efluentes do reator UASB e do filtro biológico percolador também foram coletados por amostragem simples, respeitando o tempo de detenção hidráulica teórico da estação de tratamento. As amostras foram armazenadas em frascos de vidro âmbar de 1 L. A fim de evitar a degradação microbiológica dos analitos de interesse, foi adicionado 10 mL de metanol a cada 1 L de amostra coletada, preservando-a. Posteriormente à adição de metanol, as amostras foram armazenadas na geladeira até o momento da extração.

4.3 Preparo de soluções padrão

Para a realização das análises e construção das curvas analíticas foram preparadas soluções dos padrões de microcontaminantes orgânicos estudados em metanol e armazenadas em freezer para evitar degradação, sendo a concentração da solução de estoque de 1 mg/L e, a partir desta, foram realizadas diluições para concentrações menores.

O 4-nonilfenol deuterado, usado como padrão interno, foi preparado em piridina uma vez que esse foi o solvente escolhido para ressuspender o extrato da amostra para posterior derivatização e análise.

4.4 Múltipla extração por partição em baixa temperatura

Na etapa de triagem, foi realizado um planejamento fatorial 2^2 com ponto central (Tabela 6) com o objetivo de avaliar a influência de algumas variáveis consideradas importantes para o procedimento de extração, bem como suas interações. As variáveis

estudadas foram: razão entre volume de solvente extrator e volume de amostra (V1) e pH da amostra (V2).

Alguns parâmetros de extração foram definidos a partir de outros trabalhos (GOMES *et al.*, 2017; LIMA, 2013) envolvendo a técnica de EPBT, como a escolha da acetonitrila como solvente extrator, o tempo de congelamento de 3 horas e a adaptação da técnica para múltipla extração, realizando 3 extrações consecutivas, cada uma delas após o congelamento da fração aquosa.

Tabela 6 - Planejamento fatorial 2^2 com ponto central.

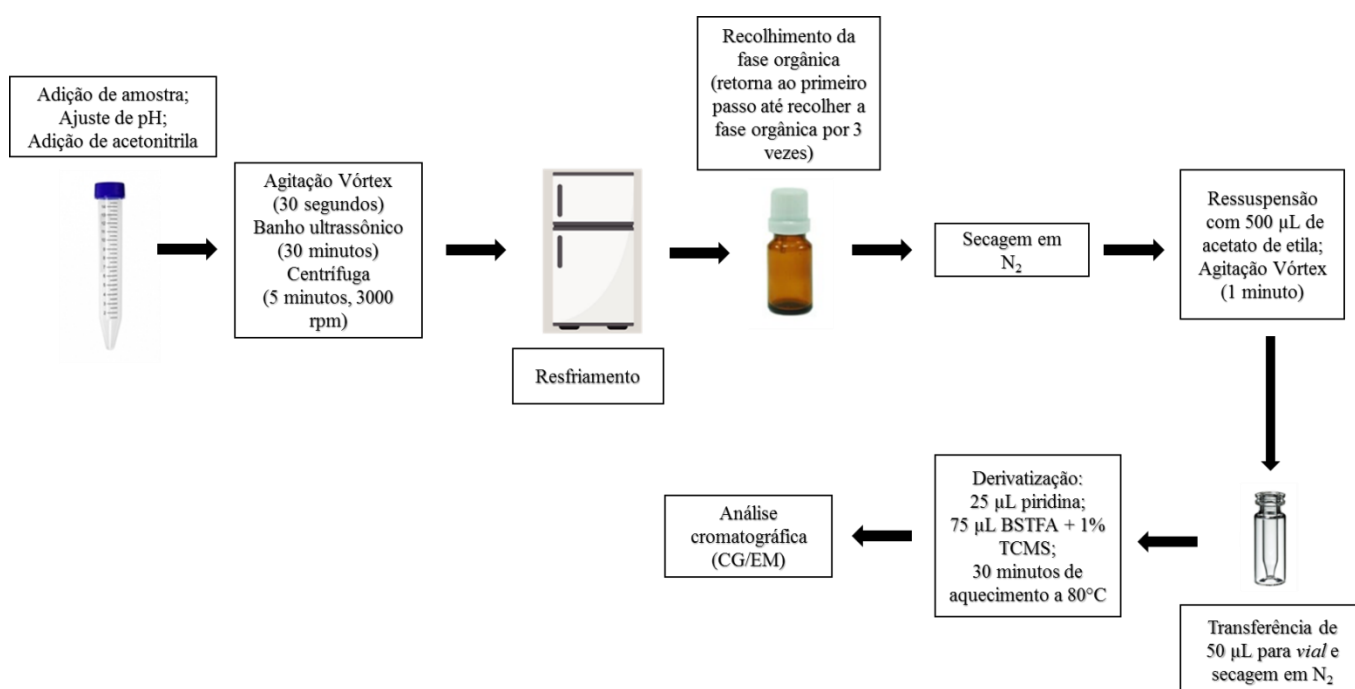
Ensaio	Razão entre volume de solvente e volume de amostra	pH
1	- (0,75)	- (2)
2	+ (1,5)	- (2)
3	- (0,75)	+ (9)
4	+ (1,5)	+ (9)
5	0 (1,125)	0 (5,5)
6	0 (1,125)	0 (5,5)
7	0 (1,125)	0 (5,5)

Fonte: Do autor, 2018.

A Figura 10 é um esquema representativo da técnica EPBT. Primeiramente, ajustou-se o pH da amostra em 2, 5,5 e 9, com auxílio de soluções de ácido clorídrico 30% e hidróxido de amônio concentrado. O volume de amostra foi fixado em 4 mL e, com isso, os volumes adicionados de acetonitrila foram 3, 4,5 e 6 mL, correspondendo aos níveis -, 0 e + respectivamente do planejamento fatorial. A mistura amostra/solvente contida em um tubo *falcon* foi agitada em vórtex por 30 segundos, permaneceu em banho ultrassônico por 30 minutos, seguido de centrifugação a cerca de 3000 rpm por 5 minutos, sendo posteriormente levada ao freezer por 3 horas. Após o resfriamento, a fase orgânica foi recolhida e adicionada a um frasco âmbar. Todo processo foi realizado novamente até 3 frações orgânicas serem extraídas. Após o recolhimento total da fase orgânica, a mesma foi seca sob fluxo de

nitrogênio (N_2). Ao frasco seco foram adicionados 500 μ L de acetato de etila e agitado por 1 minuto em vórtex com o intuito de ressuspender o extrato seco. A solução ressuspensa foi transferida de 50 em 50 μ L para um *vial* contendo um *insert*, onde foi seca novamente sob fluxo de nitrogênio, visando a concentração dos analitos de interesse. Após o *insert* ser totalmente seco, o extrato seguiu para a derivatização.

Figura 10 - Esquema da múltipla extração por partição em baixa temperatura (EPBT).



Fonte: Do autor, 2018.

4.5 Derivatização

As condições de derivatização utilizadas nesse trabalho foram otimizadas previamente por Sanson (2012). Ao *vial* contendo o extrato seco foram adicionados 75 μ L de reagente derivatizante BSTFA + 1% TCMS e 25 μ L de piridina, solvente utilizado nessa reação, contendo 4-nonilfenol deuterado, utilizado como padrão interno. Posteriormente, o sistema foi submetido a aquecimento em estufa por 30 minutos à temperatura de 80 °C. A concentração final do padrão interno no sistema (volume final de 100 μ L) foi 50 μ g/L.

4.6 Condições cromatográficas e de detecção

A análise dos microcontaminantes orgânicos foi realizada por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG/EM) utilizando o equipamento GCMS-QP2010 plus, Shimadzu[®] (Figura 11). A Tabela 7 apresenta as condições cromatográficas e de detecção do método para separação e determinação dos microcontaminantes estudados.

Figura 11 - GCMS-QP2010 plus, Shimadzu[®].



Fonte: Do autor, 2018.

Tabela 7 - Parâmetros e valores utilizados para o método de determinação de microcontaminantes por CG/EM.

Parâmetro	Valor
Cromatógrafo a gás	
<i>Injetor</i>	
Temperatura do injetor	280°C
Modo de injeção	<i>Splitless</i>
Tempo de <i>splitless</i>	0,5 min
<i>Forno da Coluna</i>	
Coluna	Zebtron ZB-5MSi (30,0m × 0,25mm × 0,25 µm)
Rampa de temperatura	60°C (1 min), aumento para 100°C a 25°C/min; aumento para 360°C a 15°C/min
<i>Fase móvel</i>	
Gás de arraste	Hélio
Modo de controle de vazão	Velocidade linear
Pressão	~94,5 kPa
Vazão total	37,0 mL/min
Vazão da coluna	1,52 mL/min
Velocidade linear	45,0 cm/s
Razão de divisão	20,0
Espectrômetro de massas	
Impacto de elétrons	250°C
Interface	280°C
Tempo de corte do solvente	8,5 min
Voltagem do detector	1,45 kV
Tempo total de análise	21,93 min

Fonte: Do autor, 2018.

4.6.1 Relação massa/carga (m/z) dos microcontaminantes

Para identificação e quantificação dos microcontaminantes em estudo foram selecionados os valores de razão massa carga (m/z) de cada composto, para a análise no modo de monitoramento de íons específico, *SIM*, bem como os tempos de retenção. Essas informações estão contidas na Tabela 8, sendo os íons de quantificação aqueles que apresentam maior intensidade e os íons de identificação os que auxiliam na identificação do composto. Os íons monitorados foram selecionados através do *software* da Shimadzu e a biblioteca do *National Institute of Standards and Technology* (NIST[®]).

Tabela 8 - Tempos de retenção e relação m/z dos analitos derivatizados.

Analito	Tempo de retenção (min)	m/z para quantificação	m/z para identificação
Ibuprofeno	9,56	160	263; 234
Paracetamol	9,65	206	280; 116
4-Octilfenol	11,02	179	180; 278
4-Nonilfenol	11,71	179	292; 180
Naproxeno	12,84	185	287; 243
Bisfenol A	13,62	357	372; 207
Diclofenaco	14,19	214	244; 242
Estrona	16,08	342	244; 218
Estradiol	16,29	416	285; 326
Etinilestradiol	16,87	425	300; 285
4-NP deuterado	11,70	183	281; 296

Fonte: Do autor, 2018.

4.7 Validação do método analítico

Para estabelecer a confiabilidade do método de extração dos microcontaminantes orgânicos em amostras de esgoto foi realizada a validação do método. A seguir são apresentadas as figuras de mérito avaliadas.

4.7.1 Seletividade

A seletividade do método é garantida pelo uso da espectrometria de massas. A mesma foi obtida a partir da comparação dos tempos de retenção e dos cromatogramas dos três íons selecionados para monitoramento.

4.7.2 Curva analítica e linearidade

A curva analítica foi estabelecida a partir de três injeções de padrões dos analitos e padrão interno derivatizados, na faixa de concentração de 2,5 a 150 µg/L (analitos) e 50 µg/L (PI).

A linearidade foi obtida plotando-se os valores médios das triplicatas de injeções de cada ponto e a qualidade do ajuste foi realizada pelo coeficiente de determinação (R^2).

4.7.3 Efeito matriz

Para avaliar o efeito matriz foi realizado um *spike* no extrato da amostra, ou seja, a amostra foi reanalisada com a adição de uma concentração conhecida de padrão. Soluções padrões foram adicionadas a 500 µL de extrato da amostra, que após ser seco sob fluxo de nitrogênio, foi ressuspensionado para o volume de 100 µL, obtendo concentrações finais dos *spikes* de 10, 75 e 150 µg/L somada à concentração dos analitos já presentes na amostra.

O efeito matriz sobre o analito foi calculado a partir do fator de correção do efeito matriz (F_{EM}). As Equações (1) e (2) mostram como os cálculos foram realizados. Os valores de concentração do *spike* e da amostra foram calculados a partir das curvas analíticas já estabelecidas.

$$F_{EM} = \frac{C_{spike} - C_{amostra}}{C_{solução\ padrão}} \quad \text{Equação (1)}$$

$$\text{Efeito matriz (\%)} = (F_{EM} - 1) \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Em que,

C_{spike} = Concentração do composto de interesse no extrato da amostra fortificada após todo o processo de extração;

$C_{amostra}$ = Concentração do composto de interesse no extrato da amostra (branco);

$C_{solução\ padrão}$ = Concentração teórica adicionada ao extrato da amostra (concentração teórica do *spike*);

F_{EM} = Fator de correção do efeito matriz.

O efeito matriz é considerado aumentativo sobre o sinal do analito, quando o valor do efeito obtido através da Equação (2) for maior que zero. Caso esse valor seja menor que zero, há efeito supressivo causado pela matriz no sinal analítico.

4.7.4 Exatidão

A exatidão do método foi verificada por adição e recuperação da extração em três níveis de concentração (10, 75 e 150 $\mu\text{g/L}$) e em triplicata. Para a análise do branco da matriz esgoto bruto, realizou-se o procedimento de extração da amostra sem adição de soluções padrão. Para avaliar a recuperação, descontou-se o valor de área obtido para as amostras fortificadas do valor de área do branco. Isso se faz necessário devido à indisponibilidade de um branco da matriz estudada isenta dos compostos de interesse deste trabalho. As respostas cromatográficas obtidas foram corrigidas pelo fator de correção do efeito matriz, a fim de obter as concentrações reais encontradas. A Equação 3 expressa a fórmula utilizada para o cálculo de recuperação.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(C_1 - C_{\text{branco}})}{C_3 \times F_{EM}} \times 100 \quad \text{Equação (3)}$$

Em que,

C_1 = Concentração determinada na amostra fortificada;

C_{branco} = Concentração determinada na amostra não fortificada (branco);

C_3 = Concentração adicionada;

F_{EM} = Fator de correção do efeito matriz.

4.7.5 Limite de detecção e de quantificação do método

Para estabelecer os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) do equipamento injetaram-se várias diluições da solução padrão de microcontaminantes contendo o padrão interno. Para a determinação de LD, utilizou-se o método da relação sinal ruído pelo *software* CG-EM *solutions* em que se consideraram os valores de concentração cujo sinal analítico fosse três vezes o nível do ruído. Já o LQ foi definido como a menor concentração cujo sinal analítico fosse 10 vezes o nível do ruído.

Para determinar os limites de detecção e quantificação do método (LDM e LQM, respectivamente) considerou-se o fator de concentração, o índice de recuperação do procedimento de extração e o efeito matriz. Os LD e LQ foram tomados como valores de referência assim como os índices de recuperação do menor nível de concentração estudado. A Equação 4 apresenta o cálculo do LDM e LQM (representados por LM).

$$LM = \frac{L \times 100}{FC \times \%R} \quad \text{Equação (4)}$$

Em que,

L = Limite de detecção ou limite de quantificação do equipamento;

FC = Fator de concentração do procedimento de extração (FC = 40);

%R = Índice de recuperação do menor nível de concentração estudado.

4.7.6 Precisão

A precisão do método foi avaliada em dois níveis: repetibilidade (precisão intra-dia ou precisão intracorrída) e precisão intermediária (precisão inter-dias ou precisão intercorrídas).

A repetibilidade é a concordância entre os resultados obtidos dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. Ela foi verificada por triplicatas em três níveis de concentração (10, 75 e 150 µg/L). Já a precisão intermediária, avalia a concordância entre os resultados obtidos em dias diferentes, seguindo os mesmos critérios de níveis de concentração e número de replicatas da repetibilidade (ANVISA, 2003).

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV, usualmente expresso em %) das replicatas avaliadas, segundo a Equação 5.

$$CV = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação (5)}$$

Onde,

DP = desvio-padrão;

CMD = concentração média determinada.

4.8 Comparação das análises de amostras de esgoto bruto e esgoto filtrado submetidos ao método validado

O método validado foi aplicado a amostras de esgoto bruto e amostras de esgoto submetidas ao processo de filtração.

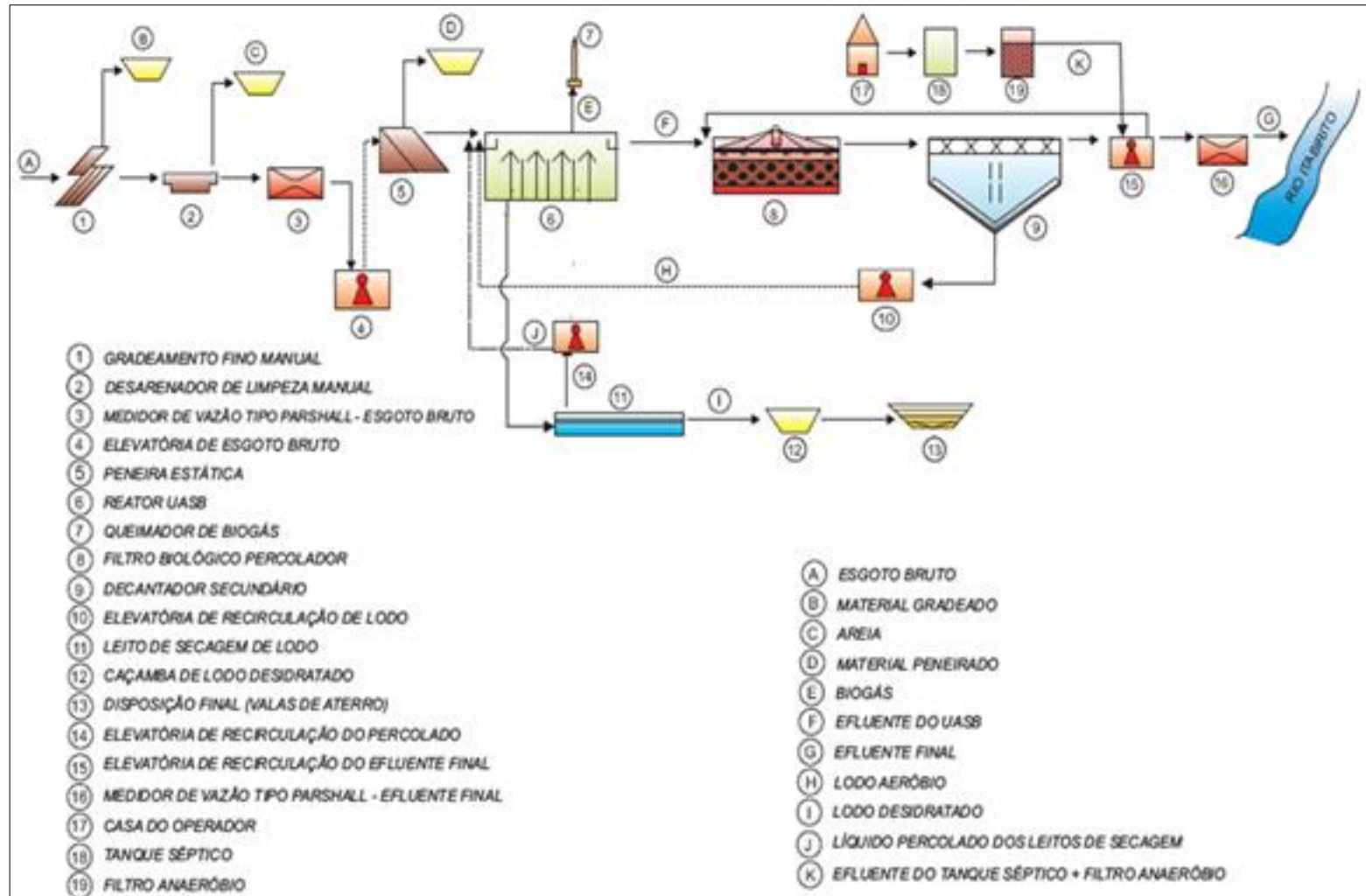
Ajustou-se o pH em 2 de cerca de 500 mL de amostra de esgoto bruto, reservou-se 250 mL de amostra e realizou-se a EPBT conforme descrito no item 4.4. Aos 250 mL restantes, realizou-se a filtração em um sistema à vácuo em papéis de filtro de celulose de 25 µm seguidos dos de 8 µm e, por último, filtro de fibra de vidro de 1,2 µm. Aplicou-se o procedimento de extração por partição em baixa temperatura na amostra filtrada, excluindo a etapa de centrifugação. Foram realizadas 5 replicatas das extrações da amostra filtrada e não filtrada.

4.9 Análise de amostras autênticas

Após a validação do método de extração dos microcontaminantes, este foi aplicado em amostras de esgoto reais coletadas na estação de tratamento de esgotos Marzagão da cidade de Itabirito, Minas Gerais. A Figura 12 representa o fluxograma da ETE da cidade de Itabirito. As amostras foram coletadas na entrada do reator UASB, na entrada do filtro biológico percolador e ao final do processo (após medidor de vazão tipo *Parshall*) e armazenadas em frascos de vidro contendo metanol em geladeira até o momento da extração. Foi feita apenas uma coleta para verificar a eficiência do método validado bem como avaliar a eficiência de remoção de microcontaminantes na estação de tratamento.

As amostras foram coletadas, extraídas pelo método validado, derivatizadas e analisadas por CG/EM.

Figura 12 - Fluxograma da ETE Marzagão de Itabirito, Minas Gerais.



Fonte: SAAE Itabirito-MG.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Triagem da Extração

Realizou-se um planejamento fatorial 2^2 com ponto central visando avaliar as variáveis e suas interações consideradas importantes para o procedimento de extração. Alguns parâmetros foram fixados com base em trabalhos produzidos e desenvolvidos no Laboratório de Caracterização Molecular e Espectrometria de Massas no Departamento de Química da Universidade Federal de Ouro Preto e trabalhos encontrados na literatura que abordam a mesma técnica de extração. Entre eles, a acetonitrila foi escolhida como solvente extrator por ser utilizada em diversos trabalhos, apresentando boas recuperações (GOMES *et al.*, 2017; GOULART *et al.*, 2010; LIMA, 2013; REGO *et al.*, 2015) e também por suas propriedades físico-químicas, como solubilidade em água em quaisquer proporções, temperatura de congelamento adequado à técnica ($-46\text{ }^{\circ}\text{C}$) e polaridade capaz de favorecer a extração de diversos compostos ($\log K_{ow} = -0,34$) (BARROS, 2014; PUBCHEM, 2018). As amostras de esgoto bruto foram dopadas com solução de padrões dos analitos de interesse obtendo uma concentração final de $50\text{ }\mu\text{g/L}$. A Tabela 9 apresenta os valores dos efeitos das variáveis estudadas. O paracetamol e bisfenol A não se encontram na Tabela 9 devido à falta de resposta cromatográfica quando as análises foram realizadas. Posteriormente, suas análises foram possíveis.

Tabela 9 - Valores dos efeitos e do parâmetro p ($\alpha = 0,05$) para cada variável estudada no planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central. Os valores em negrito são os que foram significativos de acordo com o valor de p ($p < 0,05$).

Analito	Média	p	V1	p	V2	p	V12	p
			($V_{\text{solvente}}/$ V_{amostra})		(pH)			
IBU	0,462	0	0,104	0,34	0,175	0,17	0,312	0,07
4-OP	0,781	0,01	-0,062	0,71	0,068	0,69	0,172	0,36
4-NP	0,709	0	-0,037	0,5	0,147	0,08	0,138	0,09

Tabela 9 - Valores dos efeitos e do parâmetro p ($\alpha = 0,05$) para cada variável estudada no planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central. Os valores em negrito são os que foram significativos de acordo com o valor de p ($p < 0,05$) (continuação).

Analito	Média	p	V1 ($V_{\text{solvente}}/$ V_{amostra})		V2 (pH)		V12	p
				p		p		
<i>NPX</i>	0,202	0,04	-0,092	0,46	0,212	0,18	-0,101	0,43
<i>DCF</i>	0,029	0	0,004	0,5	-0,019	0,06	0,019	0,06
<i>E1</i>	0,09	0	-0,024	0,18	-0,052	0,05	0,004	0,77
<i>E2</i>	0,083	0,01	-0,039	0,19	-0,033	0,23	-0,019	0,43
<i>EE2</i>	0,032	0,01	-0,012	0,33	-0,049	0,03	-0,008	0,46

Fonte: Adaptado de TEÓFILO e FERREIRA, 2005.

A relação entre volume de solvente e volume de amostra é uma variável importante na extração líquido-líquido. Pressupõe-se que quanto maior o volume de solvente extrator, maior será a recuperação da técnica, ou seja, maior o teor do analito extraído da matriz. Porém, a partir da Tabela 9, percebe-se que essa variável não apresenta efeito significativo sobre o sistema, ou seja, independente do volume de solvente e amostra utilizados, a força motriz que rege a transferência dos analitos de interesse da amostra para o solvente extrator é a mesma. Volumes altos de acetonitrila implicariam em maior gasto de solvente e custo da técnica, o tempo de congelamento descrito no procedimento não seria suficiente para a total separação das fases, além de aumentar consideravelmente o tempo de secagem do extrato (já que o mesmo é seco sob fluxo de nitrogênio). O pH, segunda variável estudada, apresentou efeito significativo apenas para dois analitos, estrona e etinilestradiol, no nível negativo (pH ácido). Já a média foi significativa para todos os analitos avaliados. A falta de uma tendência ou um padrão na significância das variáveis já era esperada por se tratar de uma determinação simultânea de substâncias com propriedades físico-químicas distintas.

A Tabela 10 contém os valores das razões das áreas dos analitos pela área do padrão interno para cada ensaio realizado no planejamento fatorial. Visando definir um ensaio que

apresentasse eficiência de extração para a maioria dos analitos estudados, compararam-se os valores e pode-se perceber quais analitos tiveram a primeira, segunda e terceira maior resposta, para cada um dos ensaios testados. As condições avaliadas em cada ensaio são:

- **Ensaio 1** - Razão do volume de amostra / volume de solvente 0,75 e pH 2;
- **Ensaio 2** - Razão do volume de amostra / volume de solvente 1,5 e pH 2;
- **Ensaio 3** - Razão do volume de amostra / volume de solvente 0,75 e pH 9;
- **Ensaio 4** - Razão do volume de amostra / volume de solvente 1,5 e pH 9;
- **Média PC** - Razão do volume de amostra / volume de solvente 1,125 e pH 5,5; sendo o volume de amostra fixado em 4 mL.

Tabela 10 - Melhores razões de área do analito pela área do PI para cada ensaio realizado no planejamento fatorial, onde a primeira, segunda e terceira melhor resposta está evidenciada com as cores azul, vermelho e verde, respectivamente.

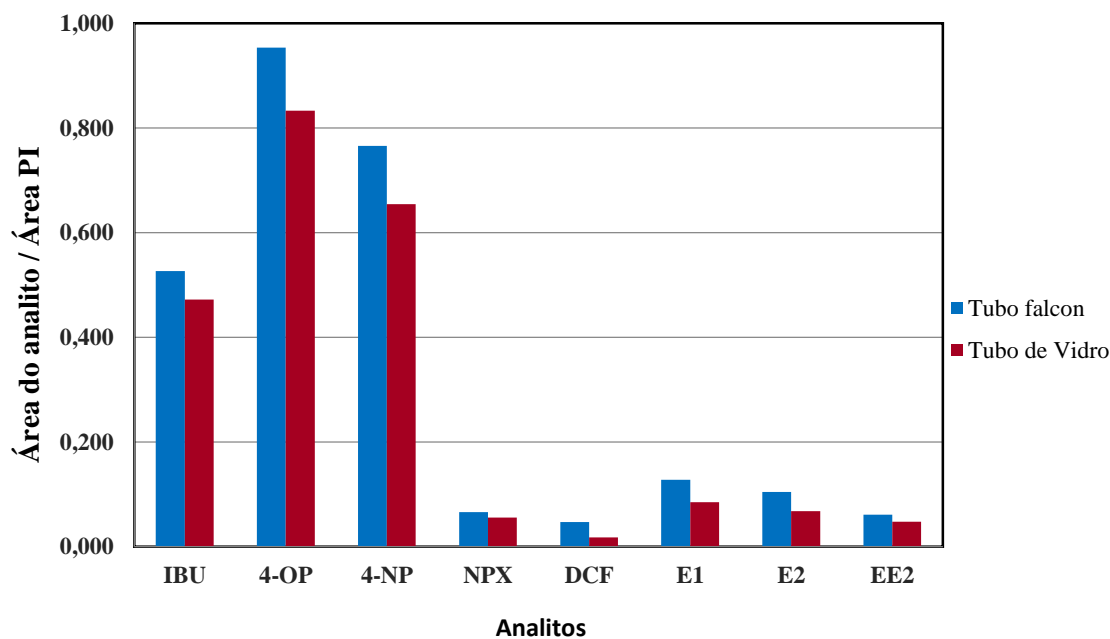
Analitos	Área amostra / Área PI				Média PC
	1	2	3	4	
Ibuprofeno	0,5262	0,3181	0,3888	0,8050	0,3986
4-Octilfenol	0,9535	0,7191	0,8497	0,9597	0,6614
4-Nonilfenol	0,7654	0,5901	0,7744	0,8755	0,6516
Naproxeno	0,0658	0,0743	0,3782	0,1852	0,2359
Diclofenaco	0,0465	0,0314	0,0090	0,0318	0,0286
Estrona	0,1278	0,1004	0,0718	0,0520	0,0938
Estradiol	0,1043	0,0844	0,0903	0,0324	0,0894
Etinilestradiol	0,0609	0,0575	0,0202	0	0,0274

Fonte: Do autor, 2018.

A partir da Tabela 10, pode-se deduzir que o ensaio 1 proporcionou maiores valores de área para um maior número de analitos estudados, quando comparado aos demais ensaios. Pode-se observar que, para esse ensaio, quatro analitos apresentaram a melhor resposta, dois a segunda melhor e um a terceira. Este ensaio apresenta as variáveis estudadas em níveis negativos, ou seja, pH ácido (pH = 2) e menor volume de solvente extrator (3 mL).

Para avaliar possíveis perdas por adsorção em tubos *falcon* de plástico utilizados para o procedimento de extração, o ensaio 1 também foi realizado em tubos de vidro. As razões da área do analito pela área do padrão interno foram comparadas graficamente, como pode ser observado na Figura 13. Para todos os analitos estudados, percebem-se melhores resultados para a extração realizada em tubos *falcon*. Suspeitava-se de uma possível perda dos analitos de interesse devido à adsorção no material do tubo *falcon* utilizado, porém, os analitos apresentam preferência de adsorção com a acetonitrila, solvente extrator utilizado, indicando que a utilização de tubos plásticos não prejudica a extração, podendo ser utilizado neste trabalho.

Figura 13 - Comparativo das razões de área do analito pela área do padrão interno para diferentes tubos (*falcon* ou vidro) utilizados na extração.



Fonte: Do autor, 2018.

Diante dessa avaliação, decidiu-se por utilizar as condições do ensaio 1, a saber, 4 mL de amostra de esgoto bruto com pH 2, três porções de 3 mL de acetonitrila e tubos *falcon*, para validação e posterior aplicação em amostras autênticas da ETE Marzagão, Itabirito/MG.

5.2 Validação do método de determinação de microcontaminantes orgânicos em amostras de esgoto bruto

A validação do método desenvolvido para a determinação de microcontaminantes orgânicos em amostras de esgoto bruto foi realizada visando estabelecer a confiabilidade do método de extração. As figuras de mérito avaliadas são apresentadas a seguir.

5.2.1 Seletividade

Em decorrência do uso de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas para a determinação dos microcontaminantes, a seletividade do método foi atribuída aos tempos de retenção e à relação entre os íons selecionados para monitoramento descritos na Tabela 8.

Nas Figuras 14, 15 e 16 pode-se observar a identificação realizada para os microcontaminantes ibuprofeno, 4-octilfenol e estrona, respectivamente em amostras de esgoto bruto.

Figura 14 - Cromatograma dos íons monitorados (modo SIM) para o ibuprofeno.

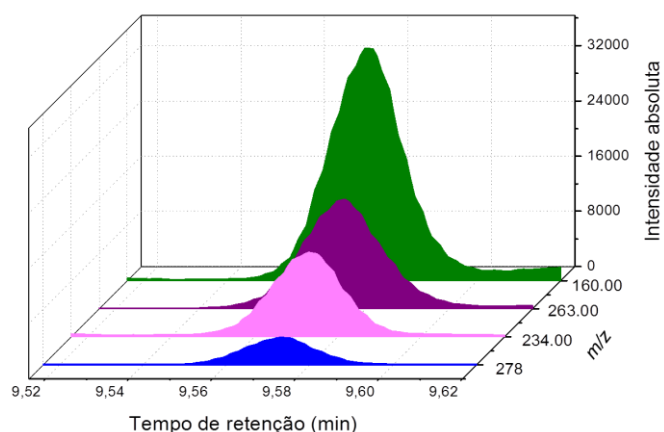


Figura 15 - Cromatograma dos íons monitorados (modo SIM) para o 4-octilfenol.

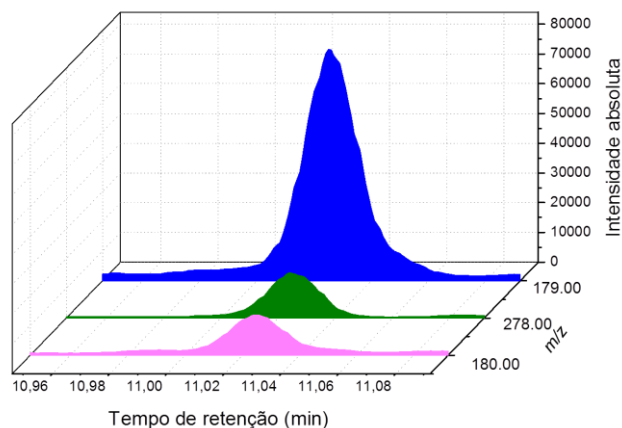
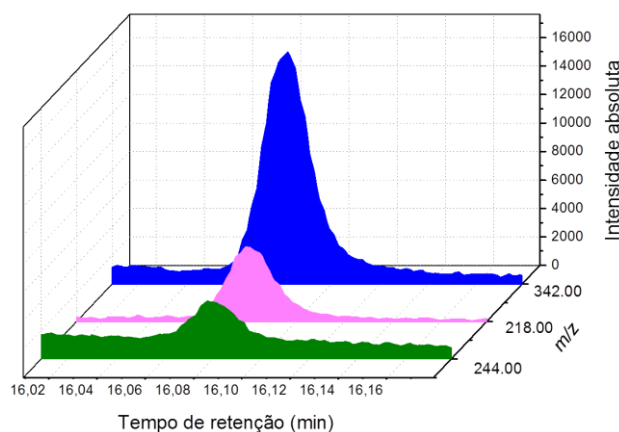


Figura 16 - Cromatograma dos íons monitorados (modo SIM) para a estrona.



5.2.2 Curva analítica e linearidade

As curvas analíticas e a linearidade foram estabelecidas por meio da injeção de padrões dos analitos derivatizados, utilizando 8 níveis de concentração para cada analito (2,5 a 150 $\mu\text{g/L}$). O padrão interno 4-nonilfenol deuterado foi adicionado a cada padrão na concentração de 50 $\mu\text{g/L}$. Após a análise cromatográfica, as curvas analíticas foram construídas relacionando a razão das áreas dos picos dos analitos com o PI (área do analito / área do PI), com a concentração dos microcontaminantes ($\mu\text{g/L}$).

Regressões lineares foram obtidas e os coeficientes de determinação (R^2) apresentaram-se com valores superiores a 0,99 para a maioria dos compostos, exceto para o paracetamol e diclofenaco que apresentaram R^2 de 0,9882 e 0,9702, respectivamente. As curvas analíticas estão apresentadas no Apêndice A e as equações das regressões lineares e os respectivos coeficientes de determinação de cada analito encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11 - Equação da curva e coeficiente de determinação para os analitos em estudo.

Analito	Equação da curva	R²
Ibuprofeno	$y = 214,35x - 1,2776$	0,9978
Paracetamol	$y = 226,73x + 2,0608$	0,9882
4-Octilfenol	$y = 41,776x + 1,5825$	0,9991
4-Nonilfenol	$y = 27,995x + 1,2464$	0,9992
Naproxeno	$y = 386,99x + 1,3613$	0,9987
Bisfenol A	$y = 39,256x - 2,0656$	0,9974
Diclofenaco	$y = 1552x - 5,5375$	0,9702
Estrona	$y = 243,52x - 0,5682$	0,9954
Estradiol	$y = 194,14x + 1,5808$	0,9993
Etinilestradiol	$y = 409,48x + 3,6629$	0,9963

Fonte: Do autor, 2018.

5.2.3 Efeito matriz

O efeito matriz é a interferência na detecção de compostos causada pela complexidade das amostras e por compostos presentes na matriz que co-eluem durante a análise cromatográfica. Os compostos indesejados podem competir com os sítios ativos na coluna cromatográfica reduzindo a interação entre os sítios ativos e os analitos, causando supressão ou aumento da resposta cromatográfica (PITTELLA, 2009). Diversas técnicas de preparo, limpeza ou *clean up* de amostras foram desenvolvidas visando eliminar ou minimizar os efeitos causados pelos interferentes presentes na matriz.

Com a finalidade de mensurar o efeito matriz e determinar o fator de correção (F_{EM}) na análise de microcontaminantes orgânicos em amostras de esgoto bruto, foi feito o *spike* do extrato orgânico da amostra como descrito no item 4.7.3. A relação entre a resposta cromatográfica obtida pela adição de padrão após o processo de extração e a resposta da amostra sem fortificação mostra o quanto a matriz é capaz de afetar a análise dos compostos de interesse.

Quando o fator de correção (F_{EM}) for maior que 1, o efeito matriz é considerado aumentativo sobre o analito e se menor que 1, ocorre efeito supressivo. A Tabela 12 apresenta os fatores de correção (F_{EM}) e as porcentagens do efeito matriz calculados em três níveis de concentração.

Tabela 12 - Valores de efeito matriz para os microcontaminantes estudados.

Analito	Concentração ($\mu\text{g/L}$)	F_{EM}	Efeito matriz
Ibuprofeno	10	2,3239	Aumento de 132,39%
	75	1,0892	Aumento de 8,92%
	150	0,6664	Supressão de 33,36%
Paracetamol	10	20,7330	Aumento de 1973,30%
	75	0,1490	Supressão de 85,09%
	150	0,6306	Supressão de 36,94%
4-Octilfenol	10	2,7571	Aumento de 175,71%
	75	1,0068	Aumento de 0,68%
	150	0,8825	Supressão de 11,75%
4-Nonilfenol	10	1,8527	Aumento de 85,26%
	75	0,9123	Supressão de 8,77%
	150	0,9317	Supressão de 6,83%
Naproxeno	10	7,2402	Aumento de 624,02%
	75	3,5462	Aumento de 254,62%
	150	2,6913	Aumento de 169,13%
Bisfenol A	10	6,3335	Aumento de 533,35%
	75	1,7182	Aumento de 71,82%
	150	1,3458	Aumento de 34,58%
Diclofenaco	10	4,7020	Aumento de 370,20%
	75	5,8195	Aumento de 481,95%
	150	5,6228	Aumento de 462,28%

Tabela 12 - Valores de efeito matriz para os microcontaminantes estudados (continuação).

Analito	Concentração (µg/L)	F_{EM}	Efeito matriz
Estrona	10	1,0441	Aumento de 4,41%
	75	0,9669	Supressão de 3,31%
	150	0,9170	Supressão de 8,30%
Estradiol	10	0,7831	Supressão de 21,69%
	75	0,5269	Supressão de 47,31%
	150	0,4361	Supressão de 56,39%
Etinilestradiol	10	1,0939	Aumento de 9,39%
	75	0,5420	Supressão de 45,80%
	150	0,4731	Supressão de 52,69%

Fonte: Do autor, 2018.

Neste trabalho, os valores de efeito matriz variam entre 0,68 a 1973,30% da resposta cromatográfica, ocorrendo tanto efeitos aumentativos quanto supressivos. Devido à complexidade da amostra estudada, já era esperado que os componentes da matriz interferissem na análise cromatográfica, sendo primordial a avaliação do seu efeito para se obter confiabilidade dos dados de resposta obtidos.

Os valores de efeito matriz apresentados na Tabela 12, foram os efeitos encontrados durante as análises para validação do método de extração. Por se tratar de uma amostra complexa e partindo do conceito de que cada amostra influencia/interfere na extração e na resposta cromatográfica de maneira diferente, o efeito matriz é corrigido em todas as análises, pela segunda injeção (extrato da amostra + *spike*).

5.2.4 Exatidão

O ensaio de recuperação foi realizado com a finalidade de estabelecer a exatidão do método, sendo feito em três níveis de fortificação em amostras de esgoto bruto coletadas na ETE Marzagão, da cidade de Itabirito/MG. Para se obter os valores de recuperação, apresentados na Tabela 13, as áreas obtidas na análise cromatográfica foram corrigidas pelo

efeito matriz (como abordado no item 4.7.4) e utilizou-se as curvas analíticas previamente estabelecidas.

Tabela 13 - Índice de recuperação dos microcontaminantes estudados.

Analito	Concentração (µg/L)	Recuperação média (%)	CV (%)	Valor médio da recuperação (%)
Ibuprofeno	10	114,05	0,38	107,11
	75	106,78	5,34	
	150	100,49	12,73	
Paracetamol	10	567,57	4,18	3229,71
	75	8111,28	10,56	
	150	1010,28	5,79	
4-Octilfenol	10	92,49	7,07	86,30
	75	88,74	4,57	
	150	77,66	7,79	
4-Nonilfenol	10	109,47	6,75	88,48
	75	82,25	8,51	
	150	73,72	8,14	
Naproxeno	10	69,25	0,43	86,59
	75	102,07	3,99	
	150	88,44	6,17	
Bisfenol A	10	135,84	4,96	116,32
	75	110,61	16,39	
	150	102,52	18,27	
Diclofenaco	10	100,67	0,21	81,14
	75	73,86	5,01	
	150	68,89	13,12	
Estrona	10	-	-	68,62
	75	55,69	11,01	
	150	81,54	5,66	

Tabela 13 - Índice de recuperação dos microcontaminantes estudados (continuação).

Analito	Concentração (µg/L)	Recuperação média (%)	CV (%)	Valor médio da recuperação (%)
Estradiol	10	-	-	
	75	17,61	17,74	58,14
	150	98,66	20,77	
Etinilestradiol	10	-	-	
	75	-	-	106,28
	150	106,28	8,60	

Fonte: Do autor, 2018.

Os guias de validação determinam que os valores de CV sejam inferiores ou iguais a 20%, o que pode ser observado na Tabela 13, em que apenas o estradiol, em seu maior nível de estudo, apresentou um valor de CV um pouco superior ao aceitável. Isso pode ser justificado devido a amostra de esgoto bruto utilizada para o ensaio de recuperação não se encontrar isenta dos microcontaminantes, além de ser uma matriz extremamente complexa contendo diversos compostos que influenciam na resposta cromatográfica do analito.

As recuperações obtidas neste trabalho se aproximam das de outros trabalhos relatados na literatura, como por Migowska e colaboradores (2012) utilizando extração em fase sólida (HLB) e análise por CG/EM, que obtiveram recuperações na ordem de 80,3% (E1), 68,2% (E2), 83,9% (EE2), 102,4% (IBU), 89,4% (PCT), 70,8% (NPX), 75,6% (DCF) em amostras de esgoto filtradas. Em amostras de lodo de esgoto, Kumirska e colaboradores (2015) relataram recuperações de 108,2% para IBU, 51,6% para PCT, 91,7% para NPX, 107,5% para DCF, 38,7% para E1, 82,3% para E2 e 75,9% para EE2, com extração em fase sólida assistida por micro-ondas e análise por CG/EM. A técnica de extração utilizada neste trabalho foi abordada por Lima (2013) para amostras de esgoto filtradas e análise por CG/EM. As recuperações médias alcançadas foram 45,2 a 82, 5% para IBU, 40,0 a 811,9% para PCT, 29,3 a 115,9% para 4-OP, 38,7 a 263,6% para 4-NP, 26,9 a 135,9% para BPA, 18,8 a 55,4% para E1, 18,4 a 82,5% para E2, 63,5 a 141,1% para EE2.

A partir da Tabela 13 podem-se observar índices de recuperação superiores a 100%. Esses valores podem ser justificados pelo efeito causado pela matriz na transferência de massa do *liner* do injetor para a coluna cromatográfica. Segundo Erney e colaboradores (1993), a

partir da análise de pesticidas organoclorados em matrizes gordurosas, pode-se perceber um aumento nas respostas cromatográficas dos analitos no extrato da matriz em relação às respostas em solvente puro. Isso ocorre devido a competição entre os compostos presentes na matriz e os analitos de interesse, afetando a adsorção no *liner*. Com isso, há uma maior transferência de massa dos analitos para a coluna cromatográfica, resultando em maior resposta pelo detector. Pinho e colaboradores (2012) também avaliaram a adsorção de pesticidas (clorpirifós e deltametrina) em injetores e colunas cromatográficas e verificaram que a adsorção de clorpirifós no injetor foi influenciada pela deltametrina. A deltametrina tem maior peso molecular e temperatura de ebulição, apesar de ser menos polar que clorpirifós, fazendo com que ela seja adsorvida preferencialmente nos componentes do injetor, acarretando na menor interação do clorpirifós e, conseqüentemente, aumento da resposta deste no detector.

O paracetamol apresentou valores de recuperação muito elevados quando comparados aos demais microcontaminantes estudados (567,57% em 10 µg/L, 8111,28% em 75 µg/L e 1010,28% em 150 µg/L). Esses valores são justificados pela presença em alta concentração deste analito na amostra sem fortificação (branco), onde foi observado um valor médio em área 8,87 vezes maior que o padrão 4-nonilfenol deuterado usado para acompanhamento da análise (50 µg/L). Com isso, ao fortificar as amostras com as concentrações estudadas, extraiu-se, também, o analito já contido na amostra de esgoto bruto, obtendo-se recuperações excessivamente altas.

A complexidade da matriz afetou o procedimento de extração dos microcontaminantes principalmente para os hormônios estrona, estradiol e etinilestradiol, que em alguns níveis de concentração não foi possível recuperá-los. Diferentes compostos presentes na matriz estudada que apresentam características próximas aos hormônios citados podem ter sido extraídos e, durante a análise cromatográfica, podem ter afetado o sinal analítico dos microcontaminantes em questão, prejudicando a sua quantificação e determinação.

Em relação às recuperações obtidas e apresentadas na Tabela 13, para os analitos ibuprofeno, 4-octilfenol, 4-nonilfenol, naproxeno, bisfenol A e diclofenaco o valor de recuperação é considerado satisfatório, levando em consideração o fato de ser uma análise simultânea de compostos com propriedades físico-químicas distintas e por se tratar de uma matriz extremamente complexa sob o ponto de vista analítico. Para os demais analitos, este método pode ser considerado semi-quantitativo, devido às altas porcentagens de recuperação

obtidas para o paracetamol e a ausência de recuperação em alguns níveis de concentração da estrona, estradiol e etinilestradiol.

5.2.5 Limites de detecção e de quantificação

As análises de diversas soluções padrão (previamente derivatizadas), em uma ampla faixa de concentração (2,5 a 150 µg/L), realizadas na etapa de validação do método, foram utilizadas para se verificar os limites de detecção (LD) e quantificação do equipamento (LQ).

A relação sinal ruído (S/R) foi utilizada para a determinação dos limites, sendo considerada para LD a menor concentração em que o sinal observado do analito fosse três vezes maior que o ruído da linha de base. Já a menor concentração cujo sinal analítico fosse dez vezes maior que o ruído foi estabelecido como LQ. A Tabela 14 apresenta os valores dos limites de detecção e quantificação do equipamento para cada microcontaminante.

Tabela 14 - Limites de detecção e quantificação do equipamento CG/EM para cada microcontaminante estudado.

Analito	LD (µg/L)	LQ (µg/L)
Ibuprofeno	0,12	0,40
Paracetamol	0,08	0,27
4-Octilfenol	0,12	0,39
4-Nonilfenol	0,04	0,15
Naproxeno	0,48	1,61
Bisfenol A	0,07	0,24
Diclofenaco	1,01	3,36
Estrona	0,30	1,02
Estradiol	0,26	0,85
Etinilestradiol	0,74	2,47

Fonte: Do autor, 2018.

Para a obtenção dos limites de detecção e quantificação do método (LDM e LQM, respectivamente) considerou-se os valores de LD e LQ, o fator de concentração da técnica ELL-PBT (40 vezes) e o índice de recuperação do analito no menor nível de concentração. Para os analitos que não apresentaram recuperação em algum nível estudado, utilizou-se a média das recuperações obtidas para os cálculos de LDM e LQM. A Tabela 15 apresenta os limites de detecção e quantificação do método.

Tabela 15 - Limite de detecção e quantificação do método para cada microcontaminante estudado.

Analito	LDM (ng/L)	LQM (ng/L)
Ibuprofeno	2,61	8,70
Paracetamol	0,36	1,20
4-Octilfenol	3,12	10,41
4-Nonilfenol	1,01	3,35
Naproxeno	17,43	58,12
Bisfenol A	1,35	4,49
Diclofenaco	25,07	83,56
Estrona	11,09	36,98
Estradiol	11,03	36,75
Etinilestradiol	17,45	58,17

Fonte: Do autor, 2018.

Os valores obtidos para LDM e LQM são considerados satisfatórios levando em consideração o fator de concentração do método (40 vezes) e o efeito matriz da amostra. Chormey e colaboradores (2017) obtiveram valores de limites de detecção (ng/L) de 0,24 para E1, 0,30 para E2, 0,16 para 4-NP, 0,09 para 4-OP e 0,33 para BPA e limites de quantificação (ng/L) de 0,80 para E1, 1,01 para E2, 0,55 para 4-NP, 0,31 para 4-OP e 1,10 para BPA em análises de águas residuais por CG/EM e microextração dispersiva líquido-líquido como preparo de amostra. Migowska e colaboradores (2012) reportaram para os microcontaminantes E1, E2, EE2, IBU, PCT, NPX, DCF analisados por CG/EM os valores de LDM de 8,5; 10,0; 8,1; 6,6; 7,6; 16,9; 52,9 respectivamente, assim como valores de LQM de

24,9; 29,3; 23,8; 19,5; 22,4; 56,5; 158,7, respectivamente. Os limites encontrados por Chormey (2017) e Migowska (2012) são menores devido aos fatores de concentração de suas técnicas de extração serem bem mais altos que na EPBT.

5.2.6 Precisão

A precisão do método foi avaliada por meio da repetibilidade (precisão intra-dia ou precisão intracorrída) e precisão intermediária (precisão inter-dias ou precisão intercorrídas) analisando o coeficiente de variação (CV).

A repetibilidade avaliou a concordância entre triplicatas em três níveis de concentração, analisadas em um curto período de tempo pelo mesmo analista e mesma instrumentação. A Tabela 16 apresenta os coeficientes de variação obtidos para a avaliação da repetibilidade.

Tabela 16 - Valores de coeficiente de variação para avaliação da repetibilidade obtidos após triplicata em três níveis de concentração dos microcontaminantes em estudo.

Analito	Concentração (µg/L)	Média (Área analito/Área PI)	CV (%)
Ibuprofeno	10	0,57812	1,81
	75	0,68803	1,42
	150	0,80805	0,63
Paracetamol	10	3,99200	1,74
	75	3,66333	9,63
	150	3,17078	8,50
4-Octilfenol	10	0,10390	5,89
	75	0,68423	1,66
	150	1,32260	4,53
4-Nonilfenol	10	0,09699	5,94
	75	1,07387	2,57
	150	2,18294	6,50

Tabela 16 - Valores de coeficiente de variação para avaliação da repetibilidade obtidos após triplicata em três níveis de concentração dos microcontaminantes em estudo (continuação).

Analito	Concentração (µg/L)	Média (Área analito/Área PI)	CV (%)
Naproxeno	10	1,78896	1,58
	75	1,90078	2,81
	150	2,09117	3,58
Bisfenol A	10	0,89433	3,19
	75	1,59752	0,83
	150	2,38153	3,50
Diclofenaco	10	0,09747	3,22
	75	0,19967	4,67
	150	0,26105	4,99
Estrona	10	0,04029	5,26
	75	0,19710	4,57
	150	0,26395	7,15
Estradiol	10	0,01893	7,23
	75	0,14643	5,02
	150	0,15269	1,90
Etinilestradiol	10	0,01558	8,08
	75	0,05445	6,14
	150	0,08280	4,46

Fonte: Do autor, 2018.

A precisão intermediária também foi avaliada nos mesmos níveis de concentração, mesmo analista, mesma instrumentação e mesmo número de replicatas, mas as análises foram realizadas dois dias depois das primeiras injeções (para verificação da repetibilidade) e compararam-se as respostas cromatográficas, obtendo os CV das análises. A Tabela 17 apresenta os coeficientes de variação obtidos para a avaliação da precisão intermediária.

Tabela 17 - Valores de coeficiente de variação para avaliação da precisão intermediária obtidos após triplicata em três níveis de concentração dos microcontaminantes em estudo.

Analito	Concentração (µg/L)	Média (Área analito/Área PI)	CV (%)
Ibuprofeno	10	0,57986	1,85
	75	0,67982	2,27
	150	0,80612	0,95
Paracetamol	10	4,03209	2,05
	75	3,97657	15,07
	150	3,53412	15,12
4-Octilfenol	10	0,10628	8,32
	75	0,66753	3,58
	150	1,22750	9,04
4-Nonilfenol	10	0,08495	17,36
	75	1,06298	2,00
	150	2,03591	9,26
Naproxeno	10	1,79114	1,59
	75	1,90602	2,05
	150	2,08097	2,38
Bisfenol A	10	0,90695	2,87
	75	1,62156	2,39
	150	2,35856	2,68
Diclofenaco	10	0,09825	3,27
	75	0,19299	5,15
	150	0,27209	5,54
Estrona	10	0,04454	10,88
	75	0,19055	4,94
	150	0,28046	7,75
Estradiol	10	0,01895	9,20
	75	0,13518	10,06
	150	0,17136	13,39

Tabela 17 - Valores de coeficiente de variação para avaliação da precisão intermediária obtidos após triplicata em três níveis de concentração dos microcontaminantes em estudo (continuação).

Analito	Concentração (µg/L)	Média (Área analito/Área PI)	CV (%)
Étinilestradiol	10	0,01536	16,23
	75	0,05708	6,48
	150	0,08728	7,62

Fonte: Do autor, 2018.

Para todos os analitos os valores do CV se apresentam entre 0,63 e 12,02% para os ensaios de repetibilidade e 0,95 a 19,95% na avaliação da precisão intermediária e, portanto, pode-se constatar que o método é preciso já que o CV se enquadra dentro do limite estabelecido pelo INMETRO para a análise de substâncias em níveis traço de concentração, a saber, $CV < 20\%$.

5.3 Comparação das análises de amostras de esgoto bruto e esgoto filtrado submetidos ao método validado

Após a validação do método, realizou-se o procedimento de extração por partição em baixa temperatura em amostras filtradas visando comparar as concentrações dos analitos estudados nas amostras autênticas de esgoto, avaliando a influência de suas propriedades físico-químicas. A Tabela 18 apresenta as concentrações em µg/L dos analitos encontrados nas amostras, corrigidos pela recuperação do método e pelo efeito matriz de cada amostra e seus respectivos valores de coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow}$).

Tabela 18 - Concentrações encontradas em amostras de esgoto bruto filtradas e não filtradas, em µg/L, e os valores de coeficiente de partição octanol/água de cada analito estudado.

Analito	Log K_{ow}	Concentração (µg/L)	
		Amostra não filtrada	Amostra filtrada
Ibuprofeno	3,97	13,24	8,77
Paracetamol	0,46	2,59	6,27
4-Octilfenol	5,66	38,16	n.d.
4-Nonilfenol	5,76	48,50	20,42
Naproxeno	3,18	174,55	141,76
Bisfenol A	3,32	134,62	127,90
Diclofenaco	4,51	185,43	50,93
Estrona	3,13	40,21	n.d.
Estradiol	4,01	n.d.	n.d.
Etinilestradiol	3,67	n.d.	n.d.

Fonte: Do autor, 2018.

Observando-se a Tabela 18 e os coeficientes de partição octanol-água (K_{ow}) dos analitos apresentados na Tabela 4, conclusões podem ser tiradas em relação à disposição dos analitos nas amostras de esgoto. Os microcontaminantes 4-octilfenol, 4-nonilfenol e diclofenaco apresentam valores de log K_{ow} superiores a 4, indicando seu caráter lipofílico, ou seja, apresentam alta sorção em matéria orgânica. Isso é comprovado pelas concentrações encontradas nas amostras não filtradas serem maiores que as obtidas nas amostras filtradas. Os analitos ibuprofeno, naproxeno, bisfenol A e estrona, apresentam moderada absorção tanto na fração aquosa quanto orgânica (log K_{ow} entre 2,5 e 4). Podem-se observar valores de concentrações próximos entre esses analitos nas duas amostras, exceto para o hormônio estrona que foi detectado apenas nas amostras não filtradas. Já o paracetamol, apresenta característica hidrofílica (log K_{ow} menor que 2,5), apresentando maior afinidade por frações aquosas, e, por isso, sua concentração em amostras filtradas foi superior à sem filtração.

Com isso, percebe-se que as propriedades físico-químicas dos analitos regem sua afinidade com o meio. A obtenção de concentrações diferentes para o mesmo analito nas amostras submetidas ou não à filtração evidencia a extração dos analitos adsorvidos na fração insolúvel do esgoto (extração da quantidade total ou parcial do analito adsorvido). Quantificar e identificar fármacos em apenas uma das frações de esgoto, como encontrado na literatura científica, só reporta a concentração encontrada na fração estudada. Portanto, para se obter as concentrações reais dos analitos presentes na matriz ambiental esgoto é necessário desenvolver e validar uma técnica de extração de microcontaminantes das frações aquosas e insolúveis simultaneamente do esgoto (esgoto bruto total).

5.4 Análises de amostras autênticas

As amostras de esgoto foram coletadas na Estação de Tratamento de Esgotos Marzagão da cidade de Itabirito, Minas Gerais, respeitando o tempo teórico de detenção hidráulica das amostras em cada etapa de tratamento. Foram analisadas amostras de esgoto bruto (coletadas na entrada do reator UASB), na entrada do filtro biológico percolador (FBP) e ao final do processo (após medidor de vazão tipo *Parshall*). As amostras foram submetidas ao processo de extração por partição em baixa temperatura, seguida de derivatização e análise por CG/EM. Procurou-se evitar o armazenamento das amostras por muitos dias, preparando-as no dia seguinte a sua chegada ao laboratório, para minimizar possíveis perdas por degradação. As respostas cromatográficas obtidas em área de pico foram tratadas em relação ao padrão interno (área analito/área PI), quanto à recuperação e ao efeito matriz, sendo esse último calculado em cada amostra analisada, a partir do *spike* de uma fração do extrato da amostra. A Tabela 19 apresenta os valores de concentração, em $\mu\text{g/L}$, de cada microcontaminante estudado encontrado nas amostras autênticas.

Tabela 19 - Concentração em $\mu\text{g/L}$ encontradas nas amostras autênticas pelo método desenvolvido neste trabalho.

Analito	Entrada UASB	Entrada FBP	Efluente final
Ibuprofeno	29,26	18,59	15,28
Paracetamol	0,49	0,12	n.d.

Tabela 19 - Concentração em $\mu\text{g/L}$ encontradas nas amostras autênticas pelo método desenvolvido neste trabalho (continuação).

Analito	Entrada UASB	Entrada FBP	Efluente final
4-Octilfenol	3,06	1,72	0,54
4-Nonilfenol	2,93	4,31	11,55
Naproxeno	13,86	12,25	7,71
Bisfenol A	13,20	10,52	8,54
Diclofenaco	12,55	4,08	6,87
Estrona	1,98	1,24	0,76
Estradiol	2,45	n.d.	n.d.
Etinilestradiol	n.d.	n.d.	n.d.

Fonte: Do autor, 2018.

Foi possível detectar em todas as amostras analisadas a presença dos anti-inflamatórios ibuprofeno, paracetamol, naproxeno e diclofenaco, justificado por seu uso demasiado sem prescrição médica pela população. Os teores dos fármacos IBU, PCT e NPX foram reduzidos durante as etapas de tratamento, porém apenas o PCT não foi detectado no efluente final da ETE. Já o DCF, apresentou uma redução em relação ao seu teor inicial, porém foi encontrado no efluente final com uma concentração 60% maior que na entrada do filtro biológico percolador. O bisfenol A também foi detectado, sendo um plastificante largamente utilizado em embalagens plásticas em geral, apresentando redução em seus teores durante o tratamento. Os microcontaminantes 4-octilfenol e 4-nonilfenol também foram encontrados nas amostras reais, já que estão presentes em diversos produtos como cosméticos e produtos de limpeza, óleos lubrificantes, emulsificantes, aditivos plásticos, entre outros. Para o analito 4-OP foi possível observar a redução em seu teor inicial, diferentemente do 4-NP que apresentou um aumento de sua concentração em todas as etapas de tratamento. O hormônio estrona foi encontrado em todas as amostras analisadas, ocorrendo, também, a redução de seu teor inicial. O hormônio estradiol foi detectado apenas na amostra de esgoto da entrada do sistema de tratamento. E o etinilestradiol não foi encontrado em nenhuma amostra analisada.

Com isso, pode-se observar que os sistemas de tratamento de esgotos não são eficazes na eliminação completa da maioria dos analitos estudados, o que justifica a presença constante desses microcontaminantes nos corpos d'água e a necessidade de seu monitoramento.

6 CONCLUSÕES

Os microcontaminantes de preocupação emergente constituem uma classe de substâncias que tem despertado o interesse da comunidade científica por serem encontrados em diversas matrizes ambientais em níveis traço e por seus efeitos adversos na vida animal e no homem. Trata-se de um problema preocupante já que os sistemas de tratamento de água e esgoto não são eficazes na remoção desses compostos e suas rotas de contaminação são diversas. Devido ao fato desses compostos estarem presentes em diversas matrizes ambientais em baixíssimas concentrações, se fez necessário o desenvolvimento de diferentes metodologias de extração e concentração eficientes para a análise simultânea de microcontaminantes de preocupação emergente.

Neste trabalho foi desenvolvida a técnica de múltipla extração com partição em baixa temperatura para análise simultânea em CG/EM de dez microcontaminantes (ibuprofeno, paracetamol, 4-octilfenol, 4-nonilfenol, diclofenaco, naproxeno, bisfenol A, estrona, estradiol, etinilestradiol) nas frações aquosas e insolúveis simultaneamente do esgoto bruto. O método consiste no ajuste do pH da amostra para 2, adição de três porções de 3 mL de acetonitrila como solvente extrator e resfriamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 horas. O extrato é seco sob fluxo de N_2 , ressuspenso em 500 μL de acetato de etila e seco novamente em vial com *insert*. Ao vial, adiciona-se 25 μL de piridina e 75 μL de BSTFA + 1% TCMS e a mistura foi levada para a estufa a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos para a reação de derivatização necessária para tornar os analitos passíveis de análise em CG. O extrato foi então analisado e os microcontaminantes identificados e quantificados por CG/EM nas condições previamente otimizadas.

O método desenvolvido se mostrou eficaz para os analitos ibuprofeno, 4-octilfenol, 4-nonilfenol, diclofenaco, naproxeno, bisfenol A apresentando valores médios de recuperação para a técnica de extração de 81,14 a 116,32%. Para os demais analitos, paracetamol, estrona, estradiol e etinilestradiol, o método de extração pode ser considerado como semi-quantitativo, devido às elevadas recuperações encontradas para o paracetamol e a ausência de recuperação em alguns níveis de concentração estudados para os hormônios estrona, estradiol e

etinilestradiol. Os valores dos coeficientes de variação (CV) de todos os analitos são abaixo de 20% e os limites de detecção e quantificação do método variam de 0,36 a 25,07 ng/L e 1,20 a 83,56 ng/L, respectivamente.

Após validar o método de extração, este foi aplicado em amostras autênticas de esgoto bruto e efluentes de ETE, podendo-se observar que os sistemas de tratamento não são eficazes na completa eliminação dos analitos estudados, o que justifica a constante presença desses microcontaminantes em corpos d'água.

O desenvolvimento de um método para determinação de microcontaminantes nas frações do esgoto simultaneamente (sem filtração da amostra) não é encontrado na literatura. Nela são encontrados métodos de determinação destes compostos em amostras filtradas de esgoto ou em lodos ativados ou sedimentos. Avaliando as características físico-químicas dos microcontaminantes, percebe-se que eles apresentam maior afinidade/possibilidade de interação com sedimentos orgânicos, por isso estudou-se o desenvolvimento e a validação de um método de extração das frações solúveis e insolúveis simultaneamente do esgoto, visando obter concentrações reais dos microcontaminantes presentes na amostra. Ao comparar as análises realizadas em amostras de esgoto que passaram por sistemas de filtração às amostras brutas, percebe-se que ocorre a extração dos analitos adsorvidos na fração insolúvel do esgoto (extração da quantidade total ou parcial do analito adsorvido). Como não foram feitas análises separadamente das frações do esgoto, obtendo um balanço de massa referente à extração dos analitos em cada fração, as concentrações encontradas não podem ser classificadas como concentrações reais dos analitos. As vantagens dessa técnica são: redução de custos no procedimento de extração em comparação à extração em fase sólida, redução de tempo no procedimento (a filtração das amostras é demorada) e quantificação total dos microcontaminantes presentes no esgoto. Como desvantagem, o efeito causado pela matriz nas análises é maior, já que a amostra não passa por nenhum pré-tratamento antes da etapa de extração, contendo diversos interferentes que competem com os analitos de interesse.

Por fim, o método desenvolvido se mostrou capaz de realizar a análise de 10 microcontaminantes em esgoto bruto total, dentre eles os desreguladores endócrinos: estrona, estradiol, etinilestradiol, bisfenol-A, 4-nonilfenol e 4-octilfenol, e os fármacos: ibuprofeno, naproxeno, paracetamol e diclofenaco.

7 TRABALHOS FUTUROS

A partir deste trabalho, temos como sugestões para os trabalhos futuros:

- Avaliar condições para otimização da técnica de extração nas frações do esgoto simultaneamente, visando reduzir o efeito matriz causado pela complexidade da amostra;
- Testar outros solventes ou misturas destes como solvente extrator;
- Usar método EPBT para análise em CLAE/EM;
- Analisar outras classes de microcontaminantes passíveis de derivatização e análise por CG/EM;
- Utilizar maiores volumes de amostra e solvente extrator visando maiores fatores de concentração, melhorando os limites de detecção e quantificação do método;
- Comparar as recuperações obtidas na técnica EPBT com a retirada de 3 frações orgânicas (adição de 3 vezes o volume de solvente extrator) após o congelamento com a retirada de apenas 1 fração orgânica (adição do volume total do solvente extrator uma única vez);
- Aplicar a técnica de extração EPBT nas duas frações do esgoto separadamente, obtendo um balanço de massa da transferência dos analitos, podendo obter, então, as concentrações reais dos microcontaminantes presentes na matriz esgoto bruto.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, N.; DAVIS, B.; SCHAEBERLE, C. M.; SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A.M. Perinatally administered Bisphenol A as a potential mammary gland carcinogen in rats. **Environ Health Perspect**, v. 121, p. 1040-1046, 2013.

ANA - Agência Nacional de águas. Atlas Esgotos - Despoluição de bacias hidrográficas, 2017. Disponível: < <http://atlasesgotos.ana.gov.br/>>. Acesso em: 30 agosto de 2018.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em:< <http://portal.anvisa.gov.br/dcb/conceitos-e-definicoes>>. Acesso em: 15 julho 2018.

AQUINO, S. F.; BRANDT, E. M. F.; CHERNICHARO, C. A. L. Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: revisão da literatura. **Eng Sanit Ambient**, v. 18, n. 3, p. 187-204, 2013.

BARROS, A. L. C. DE. **Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura para a análise de agrotóxicos via UHPLC/ESI-MS/MS em águas superficiais em Ouro Branco/MG**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cerebrovasculares e renais. **Arq Bras Cardiol**, 94(4), p. 556-563, 2010.

BECKER, R. W. **Determinação de anti-inflamatórios em efluente urbano na região de Porto Alegre-RS por SPE, derivatização e GC-MS**. [S.l.]: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

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

BRANDT, E. M. F.; QUEIROZ, F. B.; AFONSO, R. J. C. F.; AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L. Behaviour of pharmaceuticals and endocrine disrupting chemicals in simplified sewage treatment systems. **Journal of Environmental Management**, v. 128, p. 718-726, 2013.

CAMPBELL, C. G.; BORGLIN, S. E.; GREEN, F. B.; GRAYSON, A.; WOZEI, E.; STRINGFELLOW, W. T. Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. **Chemosphere**, v. 65, p. 1265-1280, 2006.

CEC - Commission of the European communities. Community strategy for endocrine disrupters: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. Communication from the commission to the council and the European parliament, Brussels, COM(1999) 706 final, 1999.

CFE - Conselho Federal de Farmácia. Disponível em:< <http://www.cff.org.br/noticia.php?id=3879>>. Acesso em: 20 julho 2018.

CHORMEY, D. S.; BÜYÜKPINAR, Ç.; TURAK, F.; KOMESLI, O. T.; BAKIRDERE, S. Simultaneous determination of selected hormones, endocrine disruptor compounds, and pesticides in water medium at trace levels by GC-MS after dispersive liquid-liquid microextraction. **Environ Monit Assess**, v. 189, p. 277, 2017.

DA SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.

DRUG BANK. Disponível em:<<https://www.drugbank.ca/>>. Acesso em: 01 maio 2017.

EPA – USA - U.S. Environmental Protection Agency. Disponível em <<http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/pollutants.cfm>> Acesso em: 01 mar. 2017.

EPA Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water , Soil , Sediment , and Biosolids by HPLC / MS / MS. 2007.

EPA Method 1698: Steroids and hormones in water, soil, sediment and biosolids by HRGC/HRMS. 2007.

FARIA, E.; LIMA, D.R. S.; XAVIER, L. P. S.; AQUINO, S. F.; AFONSO, R. J. C. F.; CHERNICHARO; GOMES, R. P. Uso de fotorreatores UV para a remoção de diclofenaco e etinilestradiol de esgoto tratado em sistema UASB-FBP. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 20, n. 3, p. 493-502, 2015.

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

GOMES, R. P.; PENA, C. B.; REZENDE, J.; COUTRIM, M. X.; AFONSO, R. J. C. F. Validation of a new high-throughput method to determine urinary S-phenylmercapturic acid using low-temperature partitioning extraction and ultra high performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of separation science**, v. 40, p. 550-557, 2017.

GOMES, R. P. **Métodos de extração com partição a baixa temperatura para a determinação de marcadores biológicos de exposição ao benzeno, em urina, por**

UHPLC-MS/MS. 2016. 176f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental) - Escola de Minas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2016.

GOODMAN GILMAN, A. Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica. 10^a ed. Mc Graw Hill, 2005.

GORGA, M.; INSA, S.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Analysis of endocrine disrupters and related compounds in sediments and sewage sludge using on-line turbulent flow chromatography–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1352, p. 29-37, 2014.

GÖTZ, C. W.; STAMM, C.; FENNER, K.; SINGER, H.; SCHÄRER, M.; HOLLENDER, J. Targeting aquatic microcontaminants for monitoring: exposure categorization and application to the Swiss situation. **Environ Sci Pollut Res**, v. 17, p. 341-354, 2010.

GOULART, S. M.; ALVES, R. D.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J. H.; ASSIS, T. C.; QUEIROZ, M. E. L. R. Optimization and validation of liquid–liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 671, p. 41-47, 2010.

HALKET, J. M.; ZAIKIN, V. G. Derivatization in mass spectrometry - 1. Silylation. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 9, p. 1-21, 2003.

HARZER, Bárbara; STIPP, Maria Carolina; HERRERIAS, Tatiana. Avaliação da função hepática de peixes *Rhamdia quelen* expostos aos desreguladores endócrinos estriol e estrona. **Revista Intertox-EcoAdvisor de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade**, v. 8, n. 1, p. 82-99, 2015.

HERNÁNDEZ, F.; SANCHO, J. V.; IBÁÑEZ, M.; GUERRERO, C. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, 2007.

HUERTA-FONTELA, M.; GALCERAN, M. T.; VENTURA, F. Fast liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and hormones in water resources. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 4212-4222, 2010.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **DOQ-CGCRE-008**: Orientações sobre validação de métodos analíticos. p. 31, 2016.

JARDIM, W. F.; MONTAGNER C. C.; PESCARA, I. C.; UMBUZEIRO, G. A.; BERGAMASCO, A. M. D. D.; ELDRIDGE, M. L.; SODRÉ, F. F. An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. **Separation and Purification Technology**, v. 84, p. 3-8, 2012.

KOSTOPOULOU, M.; NIKOLAOU, A. Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 11, p. 1023-1035, 2008.

KUMIRSKA, J.; MIGOWSKA, N.; CABAN, M.; LUKASZEWICZ, P.; STEPNOWSKI, P. Simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and oestrogenic hormones in environmental solid samples. **Science of the Total Environment**, v. 508, p. 498-505, 2015.

LEITE, G. S.; AFONSO, R. J. C. F.; AQUINO, S. F. Caracterização de contaminantes presentes em sistemas de tratamento de esgotos, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem em alta resolução. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 734-738, 2010.

LIMA, B. D. **Otimização e validação de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura de microcontaminantes orgânicos em amostras de esgoto e análise por CG-EM**. 2013. 104f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental) - Escola de Minas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

LIMA, D. R. S.; AFONSO, R. J. C. F.; LIBÂNIO, M.; AQUINO, S. F. Avaliação da remoção de fármacos e de desreguladores endócrinos em águas de abastecimento por clarificação em escala de bancada. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 783-788, 2014.

LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A. Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). **Pure Appl. Chem.**, v. 75, n. 5, p. 631-681, 2003.

MELO, S. A. S.; TROVÓ, A. G.; BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 188-197, 2009.

MIGOWSKA, N.; CABAN, M.; STEPNOWSKI, P.; KUMIRSKA, J. Simultaneous analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs and estrogenic hormones in water and wastewater samples using gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography with electron capture detection. **Science of the Total Environment**, v. 441, p. 77-88, 2012.

MOREIRA, M.; AQUINO, S.; COUTRIM, M.; SILVA, J.; AFONSO, R. Determination of endocrine-disrupting compounds in waters from Rio das Velhas, Brazil, by liquid chromatography/high resolution mass spectrometry (ESI-LC-IT-TOF/MS). **Environmental Technology**, v. 32, n. 12, p. 1409-1417, 2011.

NIE, Y.; QIANG, Z.; ZHANG, H.; ADAMS, C. Determination of endocrine-disrupting chemicals in the liquid and solid phases of activated sludge by solid phase extraction and gas

chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 7071-7080, 2009.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 5 ed. Cengage Learning, 2015.

PITTELLA, C. M. **Determinação de resíduos de pesticidas em mel de abelhas (*Apis sp*) por cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas**. 2009. 119f. Dissertação - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

PUBCHEM. Disponível em:<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 01 maio 2017.

QUARESMA, A. V. **Monitoramento de microcontaminantes orgânicos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas e elementos inorgânicos por fluorescência de raios X por reflexão total nas águas da Bacia do Rio Doce**. 2014. 186f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental) - Escola de Minas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

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

QUEIROZ, F. B. **Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de fármacos e perturbadores endócrinos em amostras de esgoto utilizando extração em fase sólida e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas**. 2011. 114f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental) - Escola de Minas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

QUEIROZ, F. B.; SILVA, J. C.; AQUINO, S. F.; COUTRIM, M. X.; AFONSO, R. J. C. F. Determination of Endocrine Disrupters and Pharmaceuticals in Sewage Samples by Tandem Solid Phase Clean up/Extraction and High Performance Liquid Chromatography-Negative and Positive Electrospray High-Resolution Mass Spectrometry. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 00, n. 00, p. 1-15, 2014.

RAIMUNDO, C. C. M. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia**. 2007. 108f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

REAXYS. Disponível em:< <https://www.reaxys.com/reaxys/session.do>>. Acesso em: 01 maio 2017.

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

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

RIBEIRO, F. A. D. L. et al. Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164–171, 2008.

ROBLES-MOLINA, J.; LARA-ORTEGA, F. J.; GILBERT-LÓPEZ, B.; GARCÍA-REYES, J.; MOLINA-DÍAZ, A. Multi-residue method for the determination of over 400 priority and emerging pollutants in water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1350, p. 30-43, 2014.

RODRIGUES, K. L. T.; SANSON, A. L.; QUARESMA, A. V.; GOMES, R. P.; SILVA, G. A.; AFONSO, R. J. C. F. Chemometric approach to optimize the operational parameters of ESI for the determination of contaminants of emerging concern in aqueous matrices by LC-IT-TOF-HRMS. **Microchemical Journal**, v. 117, p. 242-249, 2014.

ROGERS, H. R. Sources, behaviour and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges. **The Science of the Total Environment**, v. 185, p. 3-26, 1996.

SANSON, A. L. **Estudo da extração e desenvolvimento de metodologia para determinação simultânea de microcontaminantes orgânicos em água superficial por GC-MS e Métodos quimiométricos**. 2012. 151f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental), Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2012.

SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8 ed. São Paulo: Thomson, 2006.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, 2005.

USEPA 1997 “Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis” U.S. Environmental Protection Agency, Report No. EPA/630/R-96/012, Washington DC.

VAKONDIOS, N.; MAZIOTI, A. A.; KOUKOURAKI, E. E. An analytical method for measuring specific endocrine disruptors in activated sludge (biosolids) using solid phase

microextraction-gas chromatography. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, p. 1910-1917, 2016.

VEGA-MORALES, T.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J. Determination of alkylphenol polyethoxylates, bisfenol-A, 17 α -ethynylestradiol and 17 β -estradiol and its metabolites in sewage samples by SPE and LC/MS/MS. **Journal of Hazardous Materials**, v. 183, p. 701-711, 2010.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, p. 227–236, 2001.

VON SPERLING, M. **Introdução à Qualidade das Águas e ao Tratamento de Esgotos**. Vol.1, 3^aed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA); Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. 2005. 452 p.

YU, Y.; WU, L. Analysis of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal products in sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, v. 89, p. 258-263, 2012.

ZHANG, Z. L.; HIBBERD, A.; ZHOU, J. L. Optimisation of derivatisation for the analysis of estrogenic compounds in water by solid-phase extraction gas chromatography–mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 577, p. 52-61, 2006.

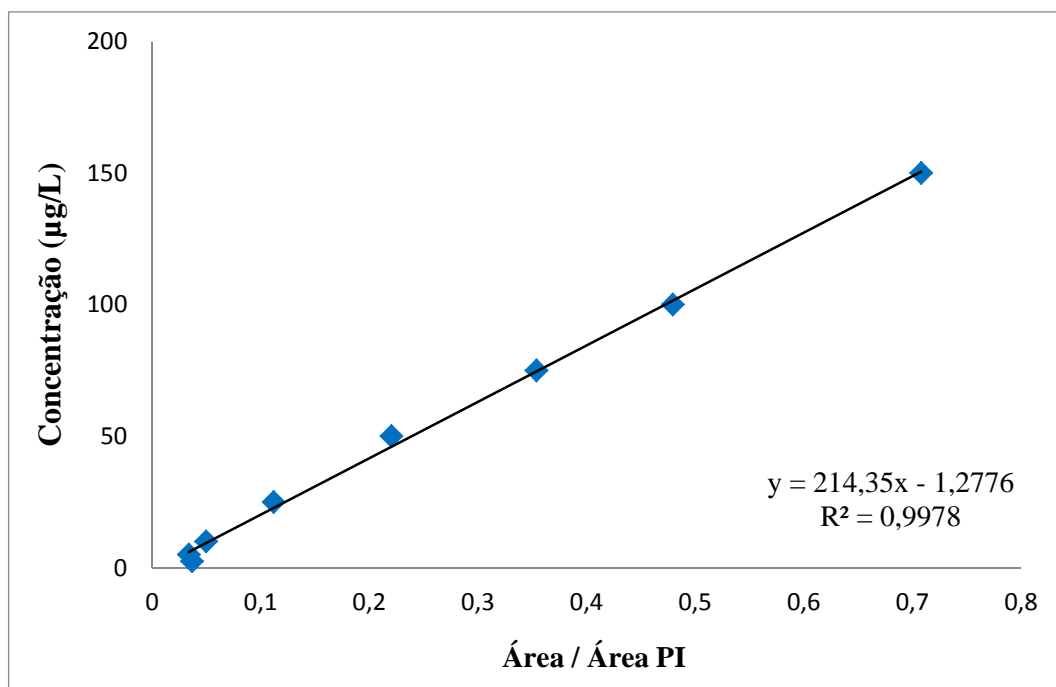
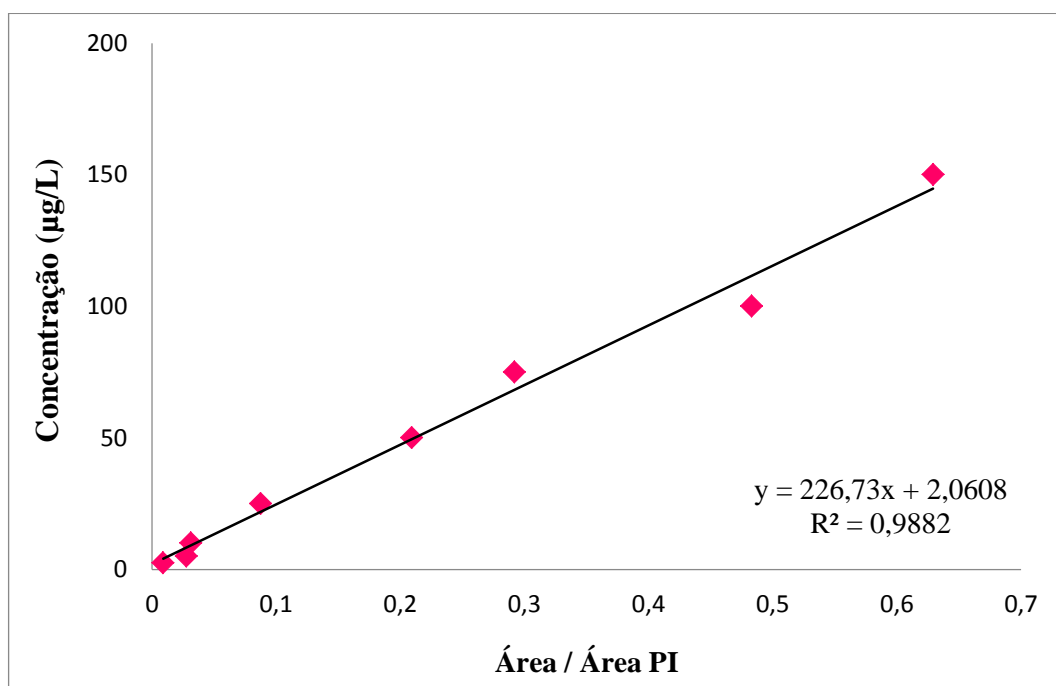
Apêndice A - Curvas analíticas para os microcontaminantes estudados**Figura 17 - Curva analítica para o ibuprofeno.****Figura 18 - Curva analítica para o paracetamol.**

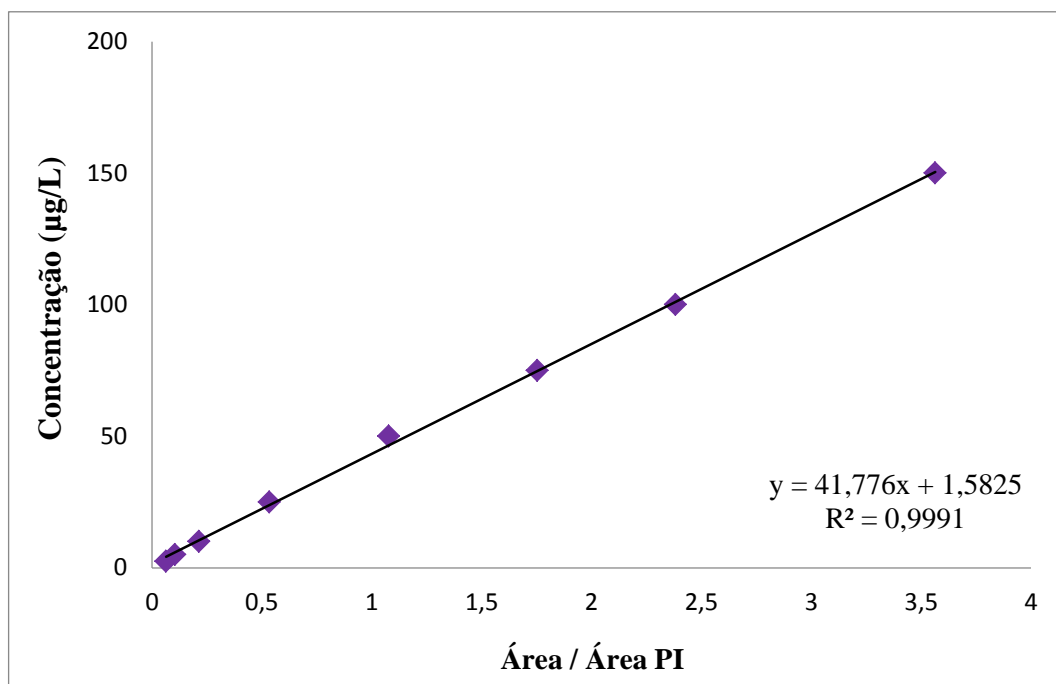
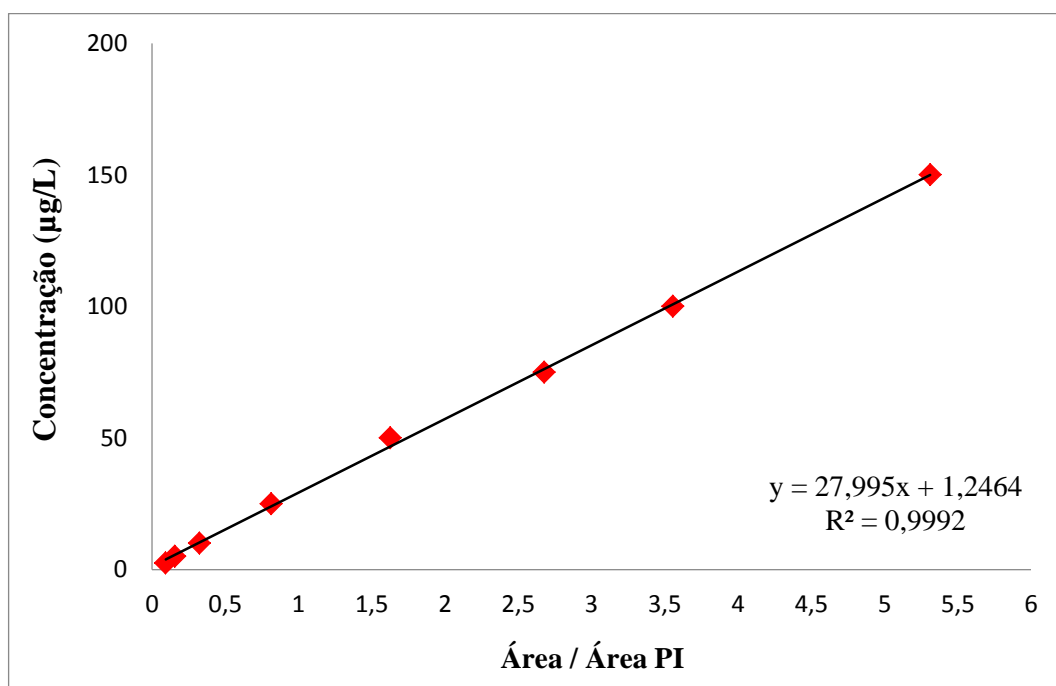
Figura 19 - Curva analítica para o 4-octilfenol.**Figura 20** - Curva analítica para o 4-nonilfenol.

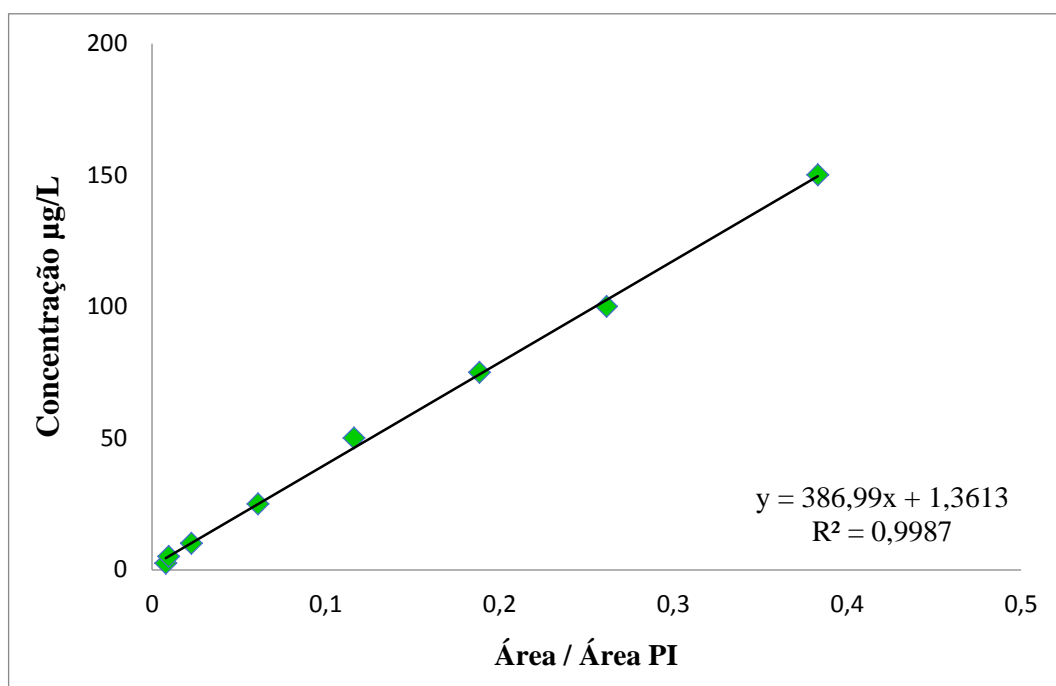
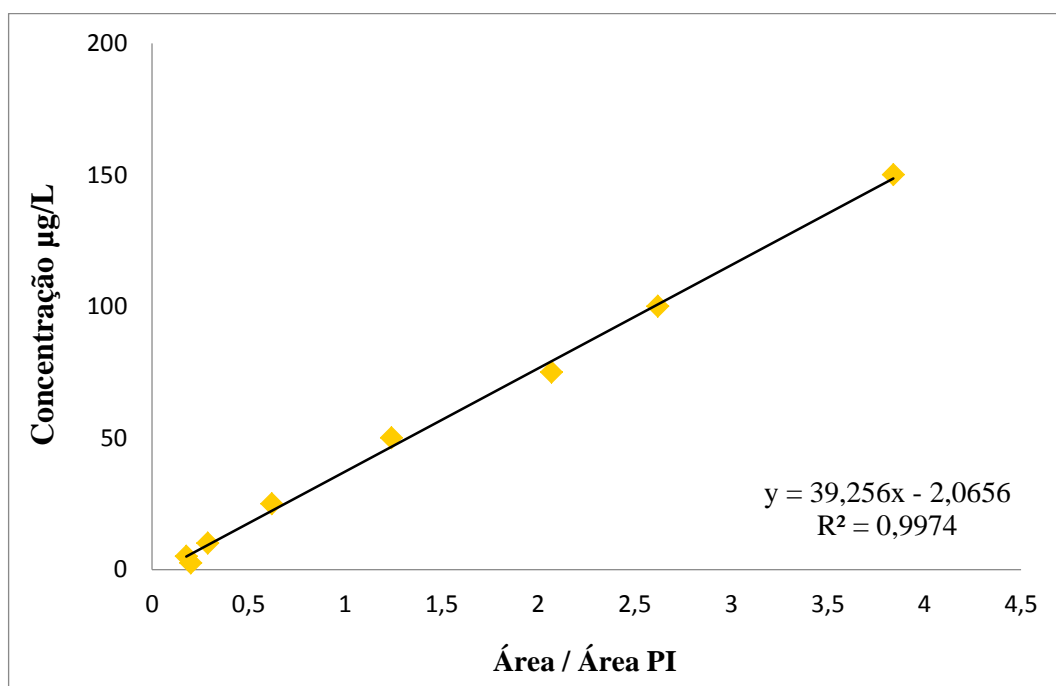
Figura 21 - Curva analítica para o naproxeno.**Figura 22** - Curva analítica para o bisfenol A.

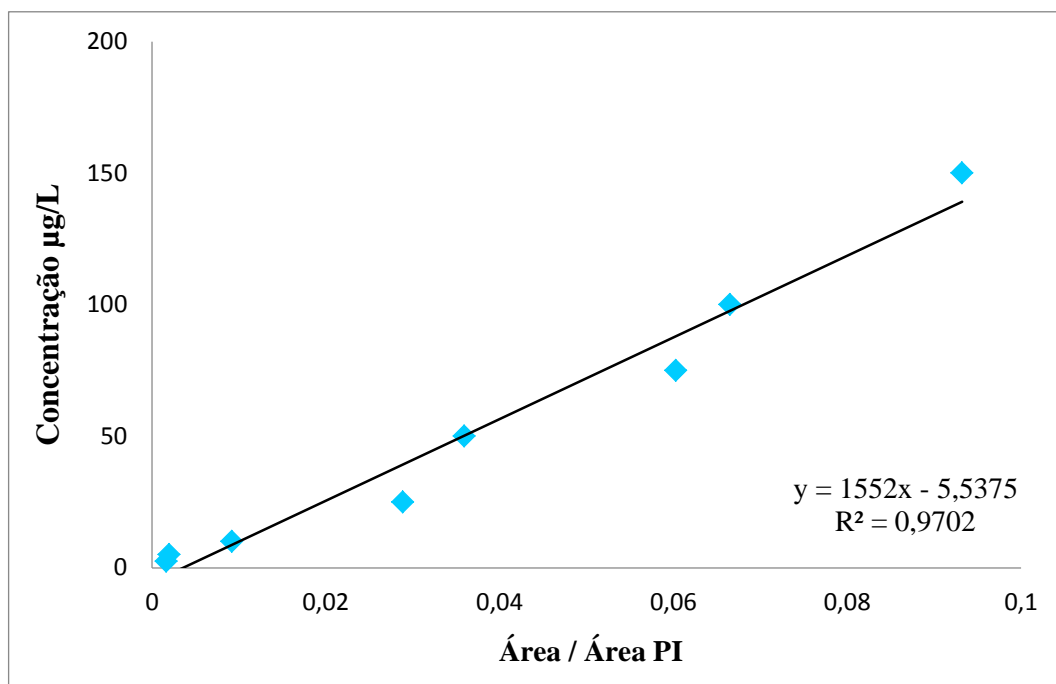
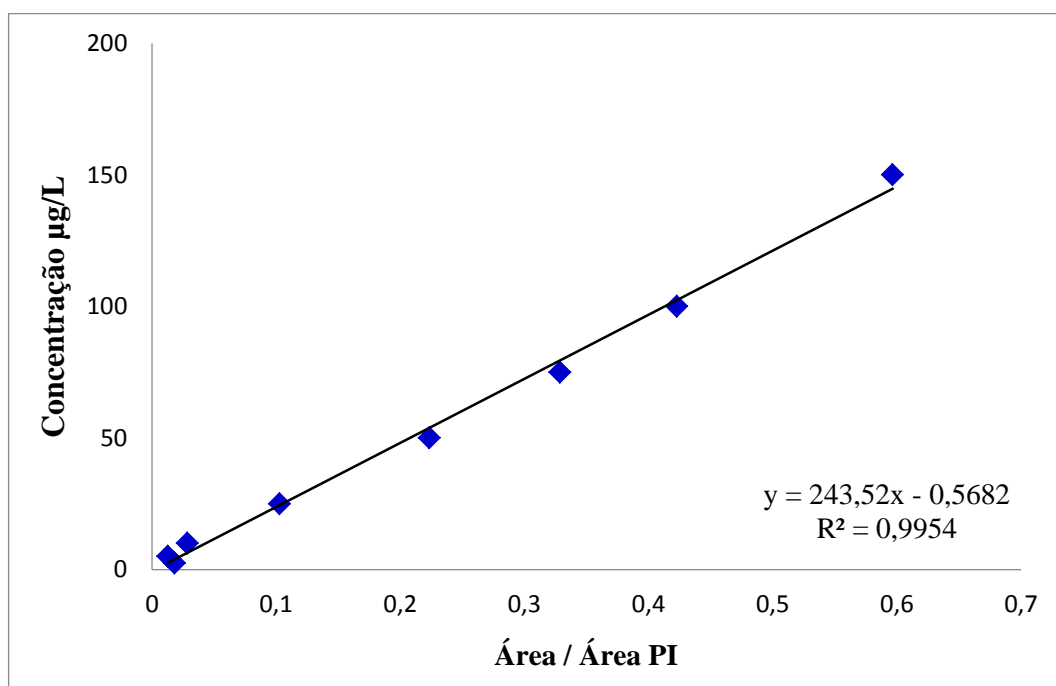
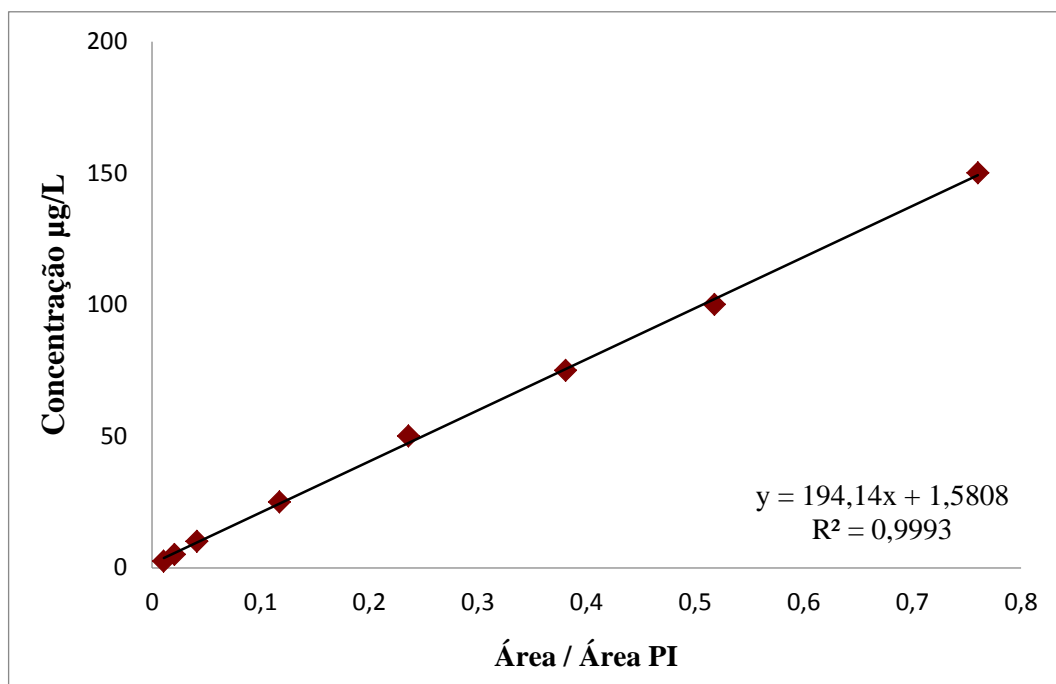
Figura 23 - Curva analítica para o diclofenaco.**Figura 24** - Curva analítica para a estrona.

Figura 25 - Curva analítica para o estradiol.**Figura 26 - Curva analítica para o etinilestradiol.**