

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Avaliação da remoção de interferentes endócrinos, ativos farmacêuticos e
cafeína em água para abastecimento público do estado de São Paulo.**

NATÁLIA GUIMARÃES DE FIGUEIREDO

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr Ernani Pinto

SÃO PAULO
2014

Natália Guimarães de Figueiredo

**Avaliação da remoção de interferentes endócrinos, ativos farmacêuticos e cafeína em água
para abastecimento público do estado de São Paulo.**

(VERSÃO CORRIGIDA)

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Ernani Pinto

Orientador/Presidente

Dra. Simone Carvalho Chiapetta

Prof. Dr. Marcelo Antunes nolasco

Prof. Dr. José Carlos Mierrzwa

Prof. Dr. Maurício Yonamine

São Paulo, 01 de agosto de 2014.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

F475a Figueiredo, Natália Guimarães de
Avaliação da remoção de interferentes endócrinos, ativos farmacêuticos e cafeína em água para abastecimento público do estado de São Paulo / Natália Guimarães de Figueiredo -- São Paulo, 2013.

110p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Pinto, Ernani

1. Toxicologia ambiental 2. Cromatografia líquida de alta eficiência
3. Espectrometria de massas 4. Tratamento de água 5. Cafeína
6. Fármacos I. T. II. Pinto, Ernani, orientador.

615.9 CDD

*“Well it is going to fight with determination,
to embrace life and live with passion,
lose with class and winning with boldness,
because the world belongs to those who dare
and life is too much to be insignificant”*

Charles Chaplin

“é preciso força pra sonhar e perceber que a
estrada vai além do que se vê”

Los Hermanos

Aos meus pais por todo o carinho e dedicação

Agradecimentos

A Deus que me deu força e perseverança, nunca me deixou desistir.

Aos meus pais, pela educação, por me darem o privilégio de estudar. Vocês são os responsáveis por todos os frutos que colhi!!

Ao Prof. Ernani, pela orientação, oportunidade e confiança fundamentais para o meu crescimento científico.

Ao Prof. Sidney, pela colaboração com o trabalho e por ceder as instalações do seu laboratório para realização dos ensaios de remoção

À Simone Carvalho Chiapetta, minha grande amiga “Dilma”, pelo convívio, incentivo e amizade, pela companhia diária, pelas risadas, congressos. Difícil descrever todo o carinho que tenho por você. Agradeço muito por ter estado comigo durante tantas etapas da minha vida e por saber que muitas ainda virão.

À Fabyana por toda a ajuda assim que cheguei em São Paulo e pela convivência e amizade ao longo do tempo.

Aos que passaram pelo LTPNA, Diogo, Vanessa, Stella, Vânia, Ronaldo, Bruna, Gustavo, Luana, Gisele, Regiane e aos que ainda lá estão, Fernanda, Raquel, Kazumi, Carlos e Miriam pela convivência, e, principalmente por terem me aturado reclamando das pipetas e do ar condicionado.

À minha querida Iniciação Científica Jéssica, pelo auxílio, amizade, pelas barrinhas de proteínas, por ter encarado tantas furadas comigo e por me fazer companhia no *hall* das pessoas “que vêm depois das atingidas por raios”.

À Mariah, Ariane, Fabi, Felipe e Bárbara que de colegas de trabalho se tornaram grandes amigos. Obrigada pela convivência, pelos ensinamentos, pelas discussões (científicas ou não), pela paciência, pelas caronas, pelas risadas, por tornarem os dias de laboratório mais leves e agradáveis. Obrigada pela minha facção. Obrigada por colaborarem direta e indiretamente com meu trabalho.

Às queridas amigas Aninha e Thaísa por todos os nossos momentos. Por estarem sempre comigo compartilhando aprendizado, alegrias e frustrações.

A todos os professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas.

Às funcionárias da secretaria do Bloco 17 Sueli, Edna, Ana, Dora e à Samantha do Programa Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas.

À Dna Luzia pelo carinho com que sempre nos tratou e a Dna. Márcia pelos litros de café que me mantinham alerta durante o dia.

Ao 65C e todas as suas formações. À Sofia e Ana que tornaram nosso ap uma verdadeira casa e foram minha família em São Paulo durante tanto tempo. À Tati e Raquel por terem me recebido de portas abertas sempre que precisei, inclusive me deixando esquecer que eu não morava mais lá.

Aos amigos do “Solar dos Príncipes”, Ere, Pintinho, Curió, Baiano, Bono e Japa pela amizade e por todos os momentos de descontração. To devendo alguns copos para vocês.

Aos amigos de toda vida Vanessa, Rachel, Lisiane, Fabiana e Leonardo por estarem sempre presentes na minha vida, pela amizade incondicional, pelo companheirismo e paciência.

À amiga Janaina por disputar comigo a preferência da inquilina do poço. Mesmo a distância rir sempre foi a nossa melhor opção

A todos que conheci nessa temporada paulistana. Obrigada por fazerem parte da minha vida!

À força tarefa que me socorreu na finalização desse trabalho: Ariane, Mariah, Ernani, Simone, Joana e Fabiana.

A FAPESP, CAPES, CNPQ e FUSP pelo apoio financeiro

A todos que ao seu modo contribuíram para este trabalho.

Resumo

FIGUEIREDO, N.G. **Avaliação da remoção de interferentes endócrinos, ativos farmacêuticos e cafeína em água para abastecimento público do Estado de São Paulo.** 2014. 110f. (Tese de Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Alguns compostos orgânicos como interferentes endócrinos e ativos farmacêuticos estão sendo encontrados em águas superficiais e vêm chamando a atenção de órgãos públicos e da comunidade científica. Dentre esses compostos, foram enfatizados nesse trabalho, o hormônio sintético 17 α -etinilestradiol, o surfactante (4-nonilfenol), bisfenol A, o antibiótico β -lactâmico amoxicilina e a cafeína como traçador de atividade antrópica. Estes compostos são continuamente introduzidos em corpos d'água pelo lançamento de esgoto *in natura* o que afeta a qualidade da água, a saúde dos ecossistemas e impacta o suprimento de água potável. Considerando a baixa taxa de remoção desses contaminantes pelo tratamento de água atualmente utilizado no Brasil e o estado de degradação dos mananciais de água para abastecimento público, esse trabalho apresenta o desenvolvimento de metodologia analítica para determinação dos compostos citados e a avaliação da eficiência de remoção quando o tratamento convencional de água é aplicado. A determinação foi baseada em métodos já estabelecidos e envolveram as etapas de limpeza e concentração de amostra usando extração em fase sólida (SPE) e análise por cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC) com detector de arranjo de diodos (DAD) e espectrometria de massas. As amostras do Reservatório do Guarapiranga foram utilizadas para ensaios em escala laboratorial que simulavam o tratamento convencional de água em planta real. Os resultados mostraram a adequação dos métodos utilizados para a separação e determinação desses compostos em amostras ambientais. Além disso, apontaram para a necessidade de se avaliar a utilização de metodologias não convencionais que otimizem a remoção pelo tratamento de água atualmente utilizado.

Palavras-chave: interferentes endócrinos, fármacos, cafeína, SPE-HPLC-DAD/MS, tratamento de água

Abstract

FIGUEIREDO, N.G. **Assessment of endocrine disruptors, pharmaceuticals and caffeine removal in drinking water of the São Paulo State.** 2014. 110f. (Tese de Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Some organic compounds, such as endocrine disruptors and pharmaceuticals, are being found in the surface water, and are concerning both the public organs and the scientific community. Among these compounds, the synthetic hormone 17α -ethinylestradiol, the surfactant (4-nonylphenol), bisphenol-A, the β -lactam antibiotic amoxicillin and the marker of human activity caffeine were highlighted in the present work. These compounds are continuously drained to the water bodies by sewers, affecting not only the water quality itself, but also the ecosystems, and impacting the drinking water availability. Currently in Brazil, the removal rate of these contaminants is low, whereas the water sources for public supply are highly degraded. In this context, the present work develops an analytical method to detect the aforementioned compounds, and to evaluate the efficiency of its removal by conventional water treatments. Detection was based on pre-established methods and steps involved clean up and samples concentration by solid phase extraction (SPE), high performance liquid chromatography with diode array detection (DAD), and mass spectrometry. Recovery tests were done using environmental samples from Guarapiranga Reservoir (São Paulo, SP). This samples were further used in laboratorial tests, simulating real scale water conventional treatments. Current results revealed the adequacy of the chosen methods in the separation and determination of the abovementioned compounds from natural samples. Also, they highlight the need for the evaluation of non-conventional methodologies that optimize removal by current water treatment.

Keywords: endocrine disruptors, pharmaceuticals, caffeine, SPE-HPLC-DAD/MS water treatment

Lista de Figuras

Figura 1. Rotas de introdução de produtos farmacêuticos no ambiente aquático	26
Figura 2. Mecanismos de degradação amoxicilina onde (1) amoxicilina, (2) Ácido Amoxicilóico, (3) Ácido Amoxilóico e (4) Amoxicilina dicetopiperazina (adaptado de LAMM, 2002).....	30
Figura 3. Fórmula estrutural dos estrogênios	37
Figura 4. Esquema de tratamento convencional de água, adaptado de FERREIRA FILHO e MARCHETTO, 2006	40
Figura 5. Vista geral do Reservatório do Guarapiranga, localizado na Bacia do Alto Tietê, na região sul/sudoeste da área metropolitana da cidade de São Paulo (23°43'50.5"S)	49
Figura 6. Foto da realização do ensaio de jarros.....	56
Figura 7. Cromatograma obtido nos comprimentos máximos de absorção dos compostos de interesse: (1) Amoxicilina, 232 nm; (2) Cafeína, 273 nm (3) Bisfenol A; 278 nm (4) 17 α etinilestradiol; 280 nm (5) 4-nonilfenol, 278 nm utilizando coluna Luna C ₁₈ a 30 °C com gradiente binário de acetonitrila e água acidificada (pH 3,0)	60
Figura 8. Espectros de absorção no UV para a amoxicilina, cafeína e interferentes endócrinos	61
Figura 9. Cromatograma obtido nos comprimentos máximos de absorção dos compostos de interesse nos comprimentos máximos de absorção dos compostos de interesse: (1) Amoxicilina – Tr 2,8 min, 232 nm (2) Cafeína – Tr 14,6 min, 273 nm (3) Bisfenol A – Tr 22,6 min, 278 nm (4) 17 α -etinilestradiol – Tr 29,122 min, 280 nm (5) 4-nonilfenol – Tr 39,9 min, 278 nm utilizando coluna PolarRP a 30 °C com gradiente binário de acetonitrila e água acidificada (pH 3,0)	62
Figura 10. Cromatograma obtido nos comprimentos máximos de absorção dos compostos de interesse nos comprimentos máximos de absorção dos compostos de interesse: (1) Amoxicilina – Tr 2,8 min, 232 nm (2) Cafeína – Tr 14,6 min, 273 nm (3) Bisfenol A – Tr 22,6 min, 278 nm (4) 17 α -etinilestradiol – Tr 29,122 min, 280 nm (5) 4-nonilfenol – Tr 39,9 min, 278 nm utilizando coluna Hidro RP Phenomenex® a 30 °C com gradiente binário de acetonitrila e água acidificada (pH 3,0)	63
Figura 11. Gráfico de linearidade para a amoxicilina.....	64
Figura 12. Gráfico de linearidade para a cafeína	64

Figura 13. Gráfico de linearidade para o bisfenol A.....	65
Figura 14. Gráfico de linearidade para o 17 α etinilestradiol	65
Figura 15. Gráfico de linearidade para o 4-nonilfenol	65
Figura 16. Cromatograma de separação da AMX (1), ácido amoxilóico (2) e cafeína (3) em modo positivo de ionização por electrospray e interferente endócrinos (4) que deveriam ter sinal a partir de 20 min em modo negativo de ionização por electrospray, scan 50-500 m/z	66
Figura 17. Cromatograma de separação de AMX (1) Amoxicilina (2) Cafeína em modo positivo de ionização (3) BPA (4) 17 α -etinilestradiol (5) 4-nonilfenol, em modo negativo de ionização por eletrospray, scan 50-500 m/z.	67
Figura 18. Espectro de massas da Cafeína (Tr 14,2 min), [M+H] ⁺ 195 m/z, ESI-QqQ em modo positivo de ionização	68
Figura 19. Espectro de Massas da amoxicilina (Tr 3,4 min), ESI-QqQ em modo de ionização positivo; [M+H] ⁺ = 366 m/z e [M+H - NH ₃] ⁺ = 349 m/z	68
Figura 20. Espectro de massas do produto de degradação da amoxicilina, Tr 4,5 min ESI-QqQ em modo de ionização positivo.....	69
Figura 21. Espectro de massas do produto do metil-éster de amoxicilina, Tr 11,8 min, ESI-QqQ em modo de ionização positivo	69
Figura 22. Espectro de massas do BPA (Tr 25,5 min), [M-H] ⁻ = 227 m/z, ESI-QqQ em modo negativo de ionização.....	70
Figura 23. Espectro de massas do 17 α -etinilestradiol (Tr 28,5 min), [M-H] ⁻ 295 m/z, ESI-QqQ em modo negativo de ionização	70
Figura 24. Espectro de massas do 4-nonilfenol, Tr 32 min, [M-H] ⁻ 295 m/z, ESI-QqQ em modo negativo de ionização.....	71
Figura 25. Mecanismos de fragmentação propostos para o BPA, 17 α -etinilestradiol e 4-nonilfenol propostos por Magi et al., 2010.....	72
Figura 26. Otimização dos valores vazão e temperatura do gás de bainha	73
Figura 27. Cromatograma de íons totais da separação de (1) Amoxicilina, (2) Ác. Amoxilóico, (3) Amoxicilina metil éster, (4) Cafeína em modo positivo de ionização e (5) Bisfenol A (6) 17 α -etinilestradiol (7) 4-nonilfenol em modo negativo de ionização por eletrospray em modo MRM das transições descritas na Tabela 15.	73

Figura 28. Cromatograma de íons totais da separação de (1) Amoxicilina (2) Ác. Amoxilóico (3) Cafeína em modo positivo de ionização por eletrospray e (4) BPA (5) 17 α -etinilestradiol; (6) 4-nonilfenol em modo negativo de ionização eletrospray utilizando gradiente da Tabela 17, detecção em modo MRM.....	74
Figura 29. Cromatograma MRM da separação de (1) Ác. Amoxilóico - 340 m/z > 323 m/z (2) Amoxicilina – 366 m/z > 349 m/z (3) Cafeína - 195 m/z > 138 m/z em modo positivo de ionização por eletrospray e (4) BPA - 227 m/z > 212 m/z (5) 17 α -etinilestradiol – 296 m/z > 145 m/z; (6) 4-nonilfenol – 219 m/z em modo negativo de ionização eletrospray utilizando gradiente da Tabela 6, detecção em modo MRM.....	75
Figura 30. Gráfico de linearidade para a amoxicilina.....	76
Figura 31. Gráfico de linearidade para a cafeína	77
Figura 32. Gráfico de linearidade para o bisfenol A.....	77
Figura 33. Gráfico de linearidade para o 17 α -etinilestradiol.....	78
Figura 34. Gráfico de linearidade para o 4-nonilfenol	78
Figura 35. Representação esquemática dos ensaios de otimização dos parâmetros operacionais dos ensaios de jarros	82
Figura 36. Avaliação da redução da turbidez após o ensaio de jarros. Os dados expressos como média de Δ NTU (n=3 por grupo, ***p<0,001 ANOVA)	84
Figura 37. Avaliação da remoção de Absorção em UV $_{\lambda 254nm}$ após o ensaio de jarros dados expressos como média de Δ Abs (n=3 por grupo, ***p<0,001, *p<0,05 (ANOVA)	84
Figura 38. Avaliação da remoção de carbono orgânico total (COT) após o ensaio de jarros. .84	
Figura 39. Avaliação da remoção dos compostos orgânicos por HPLC-DAD (Branco fortificado com 2,5 mg.L ⁻¹ dos analitos). Dados expressos como média das áreas relativas (n=3 por grupo, ANOVA)	85
Figura 40. Avaliação da remoção dos compostos orgânicos por HPLC-DAD (Ác. Húmico 20 mg.L ⁻¹ fortificado com 2,5 mg.L ⁻¹ dos analitos. Dados expressos como média das áreas relativas (n=3 por grupo, ANOVA).....	85
Figura 41. Avaliação da remoção dos compostos orgânicos por HPLC-DAD (Ác. Húmico 20 mg.L ⁻¹ fortificado com 2,5 mg.L ⁻¹ dos analitos). Dados expressos como média das áreas relativas (n=3 por grupo, ANOVA).....	877
Figura 42. Avaliação da remoção dos compostos orgânicos por HPLC-MS/MS, modo positivo de ionização por eletrospray, aquisição em MRM (Branco fortificado com 50 μ g.L ⁻¹ dos	

analitos). Dados apresentados como média das áreas relativas dos picos obticos (n=3 por grupo, ANOVA)877

Figura 43. Avaliação da remoção dos compostos orgânicos por HPLC-MS/MS, modo positivo de ionização por electrospray, aquisição em MRM (Ác. Húmico 5 mg.L⁻¹ fortificado com 50 µg.L⁻¹ dos analitos). Dados apresentados como média das áreas relativas dos picos obticos (n=3 por grupo, ANOVA).....888

Figura 44. Ensaio com carvão ativado para avaliação da remoção dos compostos orgânicos por HPLC-MS/MS, modo positivo de ionização por electrospray, aquisição em MRM (Ác. Húmico 5 mg.L⁻¹ fortificado com 50 µg.L⁻¹ dos analitos). Dados apresentados como média das áreas relativas dos picos obticos (n=3 por grupo, ANOVA)88

Lista de Tabelas

Tabela 1. Poluentes orgânicos, metais e os problemas a eles relacionados	20
Tabela 2. Propriedades físico químicas de compostos de diferentes classes.....	22
Tabela 3. Efeitos e anomalias atribuídos aos interferentes endócrinos ^a	33
Tabela 4. Especificação de reagentes solventes orgânicos utilizados	47
Tabela 5. Especificação da Instrumentação utilizada	48
Tabela 6. Nome IUPAC ^b , pureza, marca e número CAS ^a dos compostos determinados.....	48
Tabela 7. Métodos cromatográficos avaliados para a separação da amoxicilina, cafeína e interferentes endócrinos.....	52
Tabela 8. Descrição procedimentos de SPE avaliados para concentração de amoxicilina, cafeína e interferentes endócrinos em amostras de água.....	54
Tabela 9. Características físico-químicas das amostras sintéticas e da amostra coletada no reservatório do Guarapiranga	58
Tabela 10. Gradiente binário utilizado para separação cromatográfico de cafeína, AMX e interferentes endócrinos em coluna Luna C ₁₈ Phenomenex® com detecção por DAD	60
Tabela 11. Gradiente Binário utilizado para separação cromatográfico de cafeína, amoxicilina e interferentes endócrinos em coluna Hidro RP Phenomenex® com detecção por DAD	62
Tabela 12. Verificação da Conformidade do Sistema Cromatográfico	63
Tabela 13. Equações das retas e coeficientes de determinação do estudo de linearidade do método para determinação dos analitos por LC-DAD	66
Tabela 14. Composição da fase móvel para análise dos analitos por LC-QqQ.....	67
Tabela 15. Gradiente Binário utilizado para separação cromatográfica de cafeína, AMX e interferentes endócrinos com detecção por espectrometria de massas	67
Tabela 16. Parâmetros de espectrometria de massas utilizados em Modo MRM.....	71
Tabela 17. Gradiente Cromatográfico para separação dos analitos de interesse.....	74
Tabela 18. Equações das retas, coeficientes de determinação, LD e LQ do estudo de linearidade do método para determinação dos analitos por LC-MS/MS	78
Tabela 19. Testes de recuperação (%) dos analitos em água destilada fortificada e solução de ácido húmico fortificada após extração em cartucho OASIS HLB e análise por LC-MS/MS	80
Tabela 20. Testes de recuperação (%) dos analitos em água destilada fortificada e solução de ácido húmico fortificada após extração em cartucho OASIS HLB e análise por LC-MS/MS	80
Tabela 21. Parâmetros otimizados para realização do ensaio de jarros	81
Tabela 22. Parâmetros físico químicos de qualidade da água estabelecidos pelas legislações vigentes.....	83

Lista de Abreviaturas

- AMX** - Amoxicilina
ANOVA – Análise de Variância
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPA – Bisfenol A
CAG - carvão ativado granulado
CAP - carvão ativado em pó
CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente
COT - carbono orgânico total
DAD - detector de arranjos de fotodiodo
EFSA - European Food and Safety
ESI - *Eletrospray*
ETA – Estação de Tratamento de Esgoto
ETE - Estações de Tratamento de Esgoto
HPLC-DAD - Cromatografia a líquido com detecção por arranjo de diodos
IDA - ingestão diária aceitável
LC-MS - cromatografia a líquido acoplado espectrometria de massas
LD - limites de detecção
LME - limite máximo de exposição
logP - coeficiente de partição octanol-água
LQ – Limite de quantificação
LTPNA - Laboratório Toxinas e Produtos Naturais de Algas
Mg Pt.Co.L⁻¹ – miligrama de Platina/Cobalto por litro
MRM – Monitoramento de reações seletivas
NOAEL - Dose de Efeito Adverso Não Observado
NTU – Unidade nefelométrica de turbidez
OMS - Organização Mundial de Saúde
POA - Processos Oxidativos Avançados
QqQ - triplo quadrupolo
Q-TOF - Acoplamento espectrômetro de massas quadrupolo-tempo de voo
SPE - extração em fase sólida
SPE-GC-MS - extração em fase sólida com separação por cromatografia a gás e detecção por espectrometria de massas
SPE-HPLC-DAD - extração em fase sólida com separação por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos
SPE-HPLC-MS - extração em fase sólida com separação por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas
THM's - trihalometanos
TOF - tempo de voo
Tr - tempo de retenção
USEPA - United States Environmental Protection Agency
UV - Ultravioleta

Sumário

Agradecimentos.....	vii
Resumo	ix
Abstract	x
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xv
Lista de Abreviaturas	xvi
1. Introdução	19
2. Fundamentação Teórica	25
2.1. Ocorrência de contaminantes orgânicos no ambiente aquático	25
2.3. Amoxicilina – metabolismo, degradação e contaminação ambiental	28
2.4. Interferentes endócrinos.....	30
2.4.1. Bisfenol A – Potencial Toxicológico e Exposição Humana	34
2.4.2. 4-Nonilfenol – Produção e exposição humana	36
2.4.3. 17 α -etinilestradiol – Uso e exposição humana.....	37
2.5. Tratamentos aplicados na remoção de compostos orgânicos em água para abastecimento público	38
2.6. Métodos analíticos para determinação de fármacos e interferentes endócrinos em amostras ambientais	43
2.7. Justificativa	44
3. Objetivos	46
4. Materiais e Métodos	47
4.1. Solventes, reagentes e padrões	47
4.3. Preparo dos Padrões	49
4.4. Caracterização físico-química das amostras de água.....	50
4.4.1 <i>Medidas de pH</i>	50
4.4.3. <i>Medidas de cor</i>	50
4.4.4. <i>Determinação de cloro residual</i>	50
4.4.5. <i>Determinação da absorção UV$_{\lambda 254\text{ nm}}$</i>	51
4.5. Método analítico	51
4.5.1. <i>Otimização de metodologia analítica por HPLC-DAD e LC-MS para determinação de AMX, cafeína, BPA, 17α etinilestradiol e nonilfenol em amostras de água sintética</i> .	51
4.5.2. <i>Extração em fase sólida</i>	53
4.6. Ensaio de Jarros (BALLARD e MACKAY, 2005; HYUNG e KIM, 2009).....	55
5. Resultados e Discussão	58
5.2. Método analítico.....	59

5.2.1 Otimização de metodologia analítica por LC-DAD e LC-MS para determinação de amoxicilina, cafeína, bisfenol A, 17 α etinilestradiol e nonilfenol em amostras de água sintética	59
5.2.2. Testes de Recuperação – Extração em fase sólida	79
5.3 Ensaio de Jarros.....	80
6. Conclusão	90
7. Referências Bibliográficas.....	92

1. Introdução

O crescimento demográfico e a expansão industrial trouxeram como consequência quadros de contaminação atmosférica, de solo e recursos hídricos, em todo o mundo. Com isso, a partir da criação da *USEPA (United States Environmental Protection Agency)*, em 1970, o interesse da comunidade acadêmica, dos setores público e privado e o número pesquisas sobre o monitoramento da presença de compostos orgânicos xenobióticos nos diversos compartimentos ambientais se intensificaram.

No ambiente aquático, esses contaminantes podem ser encontrados em águas superficiais e de subsolo, sedimentos marinhos, solo, efluentes e lodo biológico (o que indica persistência ao processo de digestão) (BILA E DEZOTTI, 2007) das Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) e de Água (ETA). Em águas, são encontrados em concentrações traço, variando ng.L^{-1} a $\mu\text{g.L}^{-1}$ (LI, 2014; GROS et al., 2006a e 2006b; PÉREZ e BARCELÓ, 2007; LÓPEZ-ROLDÁN et al., 2010; FERREIRA DA SILVA et al., 2011). A grande diversidade de compostos e as baixas concentrações dificultam sua detecção e análise, além de representar um desafio para os processos de tratamento de água e esgoto (WESTERHOFF et al., 2005; TIJANI et al., 2013; ZHANG et al., 2008; MORASCH et al., 2010; RODIL et al., 2012).

Por serem continuamente introduzidos no meio ambiente, mesmo em baixas concentrações, estas substâncias podem afetar a qualidade da água, a saúde dos ecossistemas e impactar o suprimento de água potável (SCHWARZENBACH et al., 2007). Entre as rotas de aporte em águas superficiais podem ser citados tanto o lançamento de esgoto *in natura*, em razão do déficit em infraestrutura de saneamento em muitas localidades quanto o lançamento de efluentes de ETE. Este fato se agrava pela capacidade limitada de remoção de diversos contaminantes pelos processos de tratamento de água tradicionalmente utilizados (STUMPF et al., 1999).

Dentre estes compostos, são classificados como contaminantes emergentes: fármacos de diferentes classes, tais como analgésicos, anti-inflamatórios, drogas psiquiátricas, antilipídêmicos, antibióticos (de uso humano e veterinário), contrastes de raio X, hormônios e esteróides, além de componentes presentes em protetores solares, produtos de higiene pessoal, ftalatos, inseticidas repelentes, antisépticos e surfactantes. As razões para tal interesse baseiam-se no fato de serem moléculas com atividades biológicas

definidas (terapêuticas ou não), algumas são ambientalmente persistentes, podendo afetar não somente organismos alvo, mas organismos de espécies distintas que apresentem semelhanças bioquímicas, como sítios em receptores ativos compatíveis para essas moléculas (CHRISTENSEN, 1998; FENT et al., 2006). Diversos estudos sobre potencial ecotoxicológico mostram resultados preocupantes, como feminização de peixes e répteis (hormônios naturais e sintéticos), resistência microbiana (antibióticos) e danos funcionais (anti-inflamatórios), quando a exposição aguda e/ou crônica é levada em consideração (BILA E DEZOTTI, 2003; JORGENSEN, 2000; MIRANDA, 1998), conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Poluentes orgânicos, metais e os problemas a eles relacionados

Uso	Classe	Exemplos	Problemas	Referências
Produtos Industriais	Aditivos	Ftalatos	Biomagnificação	MACDONALD et al., 2000
	Monômero de plástico	PCBs (bifenilas policloradas)		ERIKSSON et al., 2001
	Retardantes de chama	PBDEs (ésteres difenil polibromados)		
Produtos Comerciais	Detergentes	Etoxilados de nonilfenol	Produto de transformação com atividade endócrina,	AHEL et al., 1994
	Fármacos	Antibióticos	Resistência bacteriana,	KOLPIN et al., 2002
	Hormônios sintéticos	Etinilestradiol	Feminização de peixes	BILA E DEZOTTI, 2007
Biocidas	Produtos de higiene pessoal	Filtro solar	Efeitos desconhecidos, atividade como interferentes endócrinos	DAUGHTON e TERNES, 1999
	Praguicidas	DDT (dicloro difenil tricloroetano)	Efeitos tóxicos, metabólitos persistentes	IWATA et al., 1994 BIGNERT et al., 1998

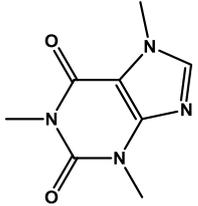
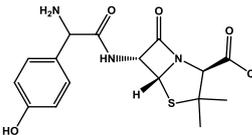
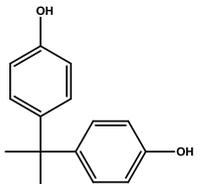
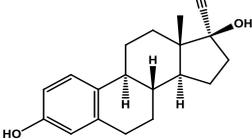
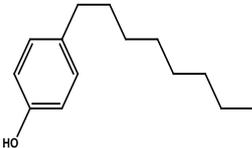
Tabela 1 (cont.) Poluentes orgânicos, metais e os problemas a eles relacionados

Uso	Classe	Exemplos	Problemas	Referências
	Metais pesados inorgânicos	Cd, Hg, Arsênio, Selênio, Fluoreto	Riscos para a saúde humana	WHO, 2011 NRIAGU, 1988
Compostos químicos naturais	Gosto e Odor	Geosmina e Metilisoborneol	Qualidade da água potável	KUJIBIDA et al., 2009
	Cianotoxinas	Microcistinas	Riscos para a saúde humana	AZEVEDO et al., 2002 DÖRR et al., 2010
	Hormônios naturais	Estradiol	Feminização de peixes	EGGEN et al., 2003
Desinfecção e oxidação	Subprodutos de desinfecção	Trihalometanos	Qualidade da água potável, riscos para a saúde humana	RICHARDSON e SIMMONS, 2002
Produtos de transformação	Metabólitos em geral	Cloroacetanilida	Qualidade da água potável	HLADIK et al., 2005

O destino e o comportamento dos interferentes endócrinos, no meio ambiente, estão diretamente relacionados com suas propriedades físico químicas. São essas propriedades que influenciarão no fato do composto permanecer na fase aquosa (como muitos dos fármacos ácidos, neutros e básicos) ou em sua interação com partículas sólidas, tais como estrogênios ou certos antibióticos, que têm um potencial mais alto para ser adsorvido por lodos de esgoto. Contaminantes hidrofóbicos podem particionar em sólidos do lodo primário ou secundário e essa tendência pode ser avaliada por meio do coeficiente de partição octanol-água (logP) (DREWES, 2003).

Na Tabela 2 são apresentados compostos representativos de diferentes classes orgânicas com suas propriedades físico químicas.

Tabela 2. Propriedades físico químicas de compostos de diferentes classes

Composto	Classe	Estrutura	Fórmula	M (g.mol ⁻¹)	pKa	LogP
Cafeína	Marcador antropogênico		C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194.19	10 ^a	0.01 ^b
Amoxicilina	Antibiótico		C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	365.38	3.4 ^c 6.7 9.4	0.58 ^c
Bisfenol A	Monômero plástico		C ₁₅ H ₁₆ O ₂	228.29	10.2 ^d	2.5- 3.3 ^e
17α- etinilestradiol	Hormônio Sintético		C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296.41	10.4 ^a	3.67- 4.15 ^e
4-nonilfenol	Surfactante não iônico		C ₁₅ H ₂₄ O	220.35	10.7 ^a	4.36- 4.60 ^e

^a Broséus et al., 2009 ^bKatsu et al., 2008 ^cBabic et al., 2007 ^dCarballa et al., 2005 ^e Verliefde, 2007

A legislação brasileira não trata os fármacos como poluentes e nem seus possíveis efeitos residuais para a saúde foram avaliados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), no Brasil, a tecnologia mais amplamente utilizada no tratamento de água para abastecimento é o sistema convencional, contemplando as etapas de coagulação, floculação, sedimentação, filtração e desinfecção. No contexto histórico, os mananciais empregados para abastecimento público foram escolhidos de modo a possibilitar que as ETAs fossem do tipo convencionais. Assim sendo, o principal objetivo a ser atendido era a produção de água potável de acordo com o padrão de potabilidade para cor e turbidez e que fosse segura do ponto de vista microbiológico e químico, dentro do estabelecido pela

legislação vigente, atualmente a portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011). Como a grande maioria dos sistemas de abastecimento no Brasil possui mais de 30 anos, atualmente as ETAs enfrentam problemas com relação a remoção de contaminantes até então desconhecidos ou que não haviam sido quantificados (FERREIRA FILHO e MARCHETTO, 2006). Contudo, em países desenvolvidos, como Estados Unidos, Canadá e Inglaterra, a crescente preocupação com os subprodutos da desinfecção e com micro-organismos específicos, fez com que novas tecnologias fossem consideradas, dentre as quais os processos de separação por membranas (EPA, 2003; JACANGELO et al., 1997) e adsorção e degradação em carvão biologicamente ativo (AWWA, 1998; AWWA, 2000). Associado à isto, estudos recentes mostram que os processos oxidativos, tais como os Processos Oxidativos Avançados (POA), ozonização (O_3/H_2O_2) e fotocatalise (H_2O_2/UV) são tecnologias promissoras na remoção de micropoluentes no tratamento de água potável ou de outros sistemas aquosos (KLAVARIOTI et al., 2009).

Além dos desafios associados às tecnologias de tratamento, a questão do monitoramento dessa ampla gama de substâncias e compostos químicos atualmente disponíveis e potencialmente presentes nos mananciais utilizados para abastecimento é fundamental. Para a determinação desses compostos, uma variedade de métodos analíticos válidos para matrizes biológicas como sangue, tecido e urina é relatada na literatura (BILA E DEZOTTI, 2003). Porém, no caso da análise de fármacos residuais e/ou seus metabólitos e produtos de transformação em efluentes de ETE, em águas de rios, de solos e água potável, o desenvolvimento de métodos mais sensíveis, com capacidade de detecção de concentrações na faixa de $\mu g.L^{-1}$ e $ng.L^{-1}$, torna-se necessário (RICHARDSON, 2006).

No Brasil, os fármacos vêm sendo monitorados desde 1997, apesar de não serem regulados, segundo dois estudos realizados no Rio de Janeiro. No primeiro, publicado por STUMPF e colaboradores em 1999, com amostragem realizada em 1996, foram detectados antilipídêmicos, anti-inflamatórios e alguns de seus metabólitos em esgoto, em efluente de ETE ($0,1$ a $1,0 \mu g.L^{-1}$) e em águas de rios ($0,02$ e $0,04 \mu g.L^{-1}$). No segundo, realizado por Ternes e colaboradores (1999), foram encontrados estrogênios naturais (17β -estradiol e estrona) e o contraceptivo sintético 17α -etinilestradiol na ETE da Penha/RJ e em esgoto bruto, amostrados em 1997. A faixa de concentração detectada variou entre $0,021 \mu g.L^{-1}$ e $0,04 \mu g.L^{-1}$ para os estrogênios naturais. Com relação a remoção dessas substâncias, as

taxas observadas foram de 67% para a estrona no efluente tratado em filtro biológico e 83% para o efluente tratado pelo processo de lodos ativados. Para o 17 β -estradiol, estas taxas foram de 92% para o efluente tratado em filtro biológico e 99,9% para o efluente tratado pelo processo de lodos ativados, respectivamente. Para o 17 α -etinilestradiol, as taxas de remoção, na ETE, relatadas foram de 64 e 78% para o efluente do filtro biológico e para o efluente do tanque de lodo ativado. Em um estudo mais recente realizado na cidade de Campinas por Sodré e colaboradores (SODRÉ et al., 2010) foi investigada a ocorrência de contaminantes emergentes em água potável. Utilizando metodologia analítica baseada em extração em fase sólida com separação por cromatografia a gás e detecção por espectrometria de massas (SPE-GC-MS), de 11 contaminantes investigados, 6 foram encontrados nas amostras. Stigmasterol apresentou a maior concentração média ($0,34 \pm 0,13 \mu\text{g.L}^{-1}$), seguido pelo colesterol ($0,27 \pm 0,07 \mu\text{g.L}^{-1}$), cafeína ($0,22 \pm 0,06 \mu\text{g.L}^{-1}$), e bisfenol A ($0,16 \pm 0,03 \mu\text{g.L}^{-1}$). Estrona e 17 β -estradiol foram detectados somente nas épocas de seca em concentrações abaixo do limite de quantificação do método utilizado.

A forma de exposição dos seres humanos a esses contaminantes emergentes ocorre principalmente por meio da ingestão de alimentos como: frango, peixes, carnes bovina e suína, legumes e verduras, água contaminada e, em menor proporção, pelo contato via derme e inalação dessas substâncias, como é o caso dos inseticidas e produtos de higiene pessoal.

2. Fundamentação Teórica

2.1. Ocorrência de contaminantes orgânicos no ambiente aquático

O aumento da contaminação mundial de sistemas aquáticos, com grande quantidade de compostos orgânicos sintéticos e naturais é um dos principais problemas ambientais atualmente enfrentados. Embora a maioria destes compostos esteja presente em baixas concentrações, muitos deles podem levar a problemas toxicológicos, em particular quando presentes como componentes de efeito sinérgico em misturas complexas. Geralmente, esses compostos quando absorvidos pelo organismo podem ser excretados sem transformação, em sua forma inalterada, ou metabolizados por reações de biotransformação divididas em reações de fase I e de fase II: as de fase I são reações de oxidação, redução, hidrólise e alquilação e as reações de fase II são reações como sulfatação e glicuronidação nas quais são formados conjugados mais polares e hidrofílicos e excretados pela urina, bile, fezes ou esterco animal na forma de um metabólito ou uma mistura de vários sendo frequentemente encontrados no esgoto doméstico (KÜMMERER, 2009).

Depois de sua liberação para os sistemas de esgoto, eles passam por estações de tratamento (ETE) onde não são completamente eliminados e acabam por atingir os sistemas de águas superficiais e prejudicar a produção de água potável (DREWES et al., 2003; MIAO et al., 2004; JONES et al., 2005b; JONES et al., 2005a; BILA E DEZOTTI, 2003; GHISELLI e JARDIM, 2007; ALMEIDA e WEBER, 2005; PETRIE et al., 2013).

Vários estudos têm relatado a presença destes compostos em águas de rio (TERNES et al., 2001, LIN e REINHARD, 2005; ELLIS, 2006) e em água potável (HEBERER, 2002; MELO e BRITO, 2014; SODRÉ et al, 2010). Ressalta-se que a ocorrência de micropoluentes em água potável é dependentes das fontes utilizadas pelas ETAs e dos níveis pluviométricos do período. Amostras de água em épocas com menos chuva apresentaram concentrações mais elevadas do que aquelas provenientes de épocas mais chuvosas (LUO et al., 2014).

A Figura 1 apresenta as rotas de aporte de fármacos e interferentes endócrinos no ambiente aquático desde sua utilização na medicina humana e veterinária e como resíduos de produção industrial até atingir o suprimento de água potável.

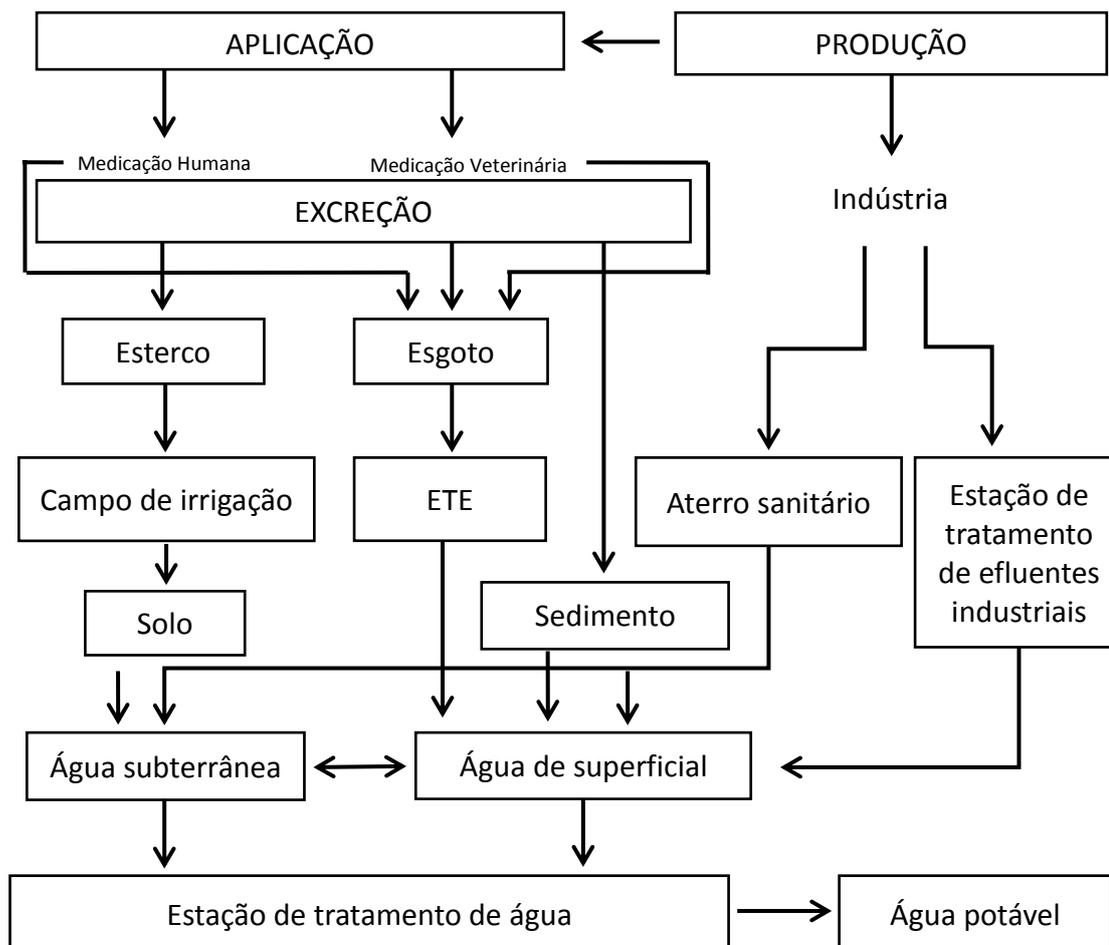


Figura 1. Rotas de introdução de produtos farmacêuticos no ambiente aquático (adaptado de Bila e Dezotti, 2007)

Nesse ambiente, os compostos orgânicos têm 3 destinos (RICHARDSON et al., 1985): **(i)** podem ser completamente eliminados, ou seja mineralizados a gás carbônico e água, como por exemplo, o ácido acetilsalicílico; **(ii)** podem passar por algum processo metabólico ou ser degradado parcialmente, como a amoxicilina ou **(iii)** podem ser persistentes como antiinflamatórios e antilipidêmicos (STUMPF et al., 1999). Apesar de alguns compostos apresentarem alta taxa de redução pelos processos de tratamento de água e esgoto, em torno de 95%, os mesmos são continuamente introduzidos no ambiente, o que justifica a constante necessidade de monitoramento por apresentarem alto potencial para produção de subprodutos como é o caso do 17β -estradiol, da estrona e da progesterona, todos da classe dos interferentes endócrinos (WHESTERHOFF et al., 2005).

Como forma de se avaliar a contaminação de águas superficiais pode-se utilizar marcadores químicos como agentes fluorescentes branqueadores, utilizados por exemplo em sabão em pó; surfactantes, utilizados em detergentes sendo o alquil benzeno sulfonato o mais utilizado e a cafeína que é consumida e excretada exclusivamente pelo homem

(SANKARARAMAKRISHNAN & GUO, 2005). As concentrações desses compostos indicam não somente o aporte de efluente de ETE, como também aporte direto de esgoto não tratado seja ele comercial ou doméstico (BUERGE et al., 2006). Assim sendo, podem ser considerados marcadores antropogênicos, que caracteriza a ação do homem sobre o ambiente estudado.

Uma vez que existe uma enorme diversidade de compostos orgânicos sintéticos que podem estar presentes em águas naturais, esgotos sanitários e águas de abastecimento e que tenham como origem as ações antropogênicas, foi necessário efetuar uma seleção de compostos representativos de diferentes classes orgânicas. Deste modo, foram definidas três categorias de compostos orgânicos a serem empregadas neste estudo: **(i)** indicador antropogênico: cafeína, **(ii)** fármaco: amoxicilina **(iii)** interferentes endócrinos: bisfenol A, 4- nonilfenol e 17 α -etinilestradiol.

2.2. Cafeína – metabolismo, excreção e indicação de atividade antropogênica

A cafeína (1,3,7 metil-xantina), é um alcalóide do grupo das xantinas (Tabela 2) presente em mais de 60 espécies de plantas, sementes de café, cacau, árvores de cola e folhas de chá e constituinte de uma enorme variedade de bebidas, produtos alimentícios e medicamentos de diferentes áreas da medicina (IGNAZ et al., 2003). Assim como as outras xantinas, a cafeína é capaz de estimular o sistema nervoso, produzindo um estado de alerta, de curta duração (GARDINALI e ZHAO, 2002).

A média de consumo global encontra-se em torno de 70 mg/dia/pessoa (BUERGE et al., 2003). No entanto, varia de acordo com as características populacionais de cada país. Nos Estados Unidos e Brasil são consumidos 200 mg/dia/pessoa. Na Austrália entre 190 e 410 mg/dia/pessoa (BUERGE et al., 2003) e em Portugal entre 4,7 e 200 mg/dia/pessoa (PENA et al., 2005).

Apesar do organismo humano não necessitar de cafeína, seu consumo moderado (máximo de 4,6 mg.Kg⁻¹ de massa corporal para adultos saudáveis) não está associado a riscos à saúde (MARIA e MOREIRA, 2007). A cafeína proveniente de café e outras bebidas é absorvida no estômago e intestino delgado e em 45 min distribuída por todos os tecidos do corpo. É metabolizada no fígado pelo sistema enzimático do citocromo P450, em três metabólitos principais derivados de xantinas:

- a) Paraxantina: que aumenta a lipólise elevando o teor de glicerol e ácidos graxos livre
- b) Teobromina: que dilata os vasos sanguíneos e aumenta o volume de urina;
- c) Teofilina: relaxa os músculos dos brônquios e pode ser usada no tratamento da asma.

Cada um desses metabólitos, em seguida, é metabolizado em vários ácidos metilúricos e, então, excretados pela urina. Apenas de 0,5 a 3% da dose ingerida é excretada de forma inalterada na urina (NELSON e COX, 2005).

Além do percentual excretado pela urina, o descarte direto de alimentos, bebidas e medicamentos fez com que quantidades significativas de cafeína fossem encontradas em águas superficiais, subterrâneas e residuais (BUERGE et al., 2003; WEIGEL et al., 2004; GLASSMEYER et al., 2005). Em ETEs, a cafeína é lentamente metabolizada pela bactéria *Pseudomonas putrida*, mas, não há dados conclusivos sobre a degradação deste composto em condições anaeróbicas (CHEN et al., 2002). Em 2002, CHEN e colaboradores relataram que concentrações de cafeína foram encontradas em efluentes de ETE nos Estados Unidos ($> 100 \mu\text{g.L}^{-1}$), Canadá ($20\text{-}300 \mu\text{g.L}^{-1}$) e Suécia ($34 \mu\text{g.L}^{-1}$). Esses autores ainda ressaltaram que, em alguns casos, podem ser encontrados também derivados clorados da cafeína.

A presença da cafeína no ambiente aquático é, sobretudo, de origem antropogênica, pois o homem é a única espécie que a consome, utiliza e a excreta de uma forma regular (BUERGE et al., 2003; WEIGEL et al., 2004; GLASSMEYER et al., 2005). Embora não seja considerada um interferente endócrino e seus efeitos à biota não sejam conhecidos, em alguns casos, foi associada a elevadas concentrações de nitratos no meio aquático (CHEN et al., 2002) e à presença de coliformes totais, comumente usados como traçador de contaminação fecal (PIOCOS e CRUZ, 2000; SANKARARAMAKRISHNAN e GUO, 2005; FERREIRA e da CUNHA, 2005).

2.3. Amoxicilina – metabolismo, degradação e contaminação ambiental

A amoxicilina (AMX), Tabela 2, é uma penicilina semi sintética do grupo dos antimicrobianos β -lactâmicos. Assim como outras penicilinas semi sintéticas foi desenvolvida com o objetivo de aumentar o espectro de ação antimicrobiano tendo em vista os compostos já existentes (BAILO et al., 2008).

A AMX apresenta baixa taxa de metabolismo e após a administração por via oral, distribui-se facilmente pelos tecidos e líquidos orgânicos sendo excretada de 80-90% AMX em sua forma inalterada pela urina (HIRSCH et al., 1999).

As penicilinas geralmente não representam uma ameaça para o meio ambiente devido à baixa estabilidade do anel β -lactâmico que degrada facilmente tanto em meio ácido quanto básico e pela ação de enzimas β -lactamase presentes tanto em bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. A abertura do anel está relacionada com a perda da atividade microbiológica (GOMES e SOUZA, 2010; PEREZ-PARADA, 2011) e dificulta sua detecção em águas residuais. No entanto, por ter seu uso amplamente difundido tanto na medicina humana quanto veterinária, é continuamente liberada para o meio ambiente como resultado do processo de manufatura, disposição imprópria ou excreção metabólica. Sua natureza polar e pouco volátil pode permitir que resista aos processos de digestão anaeróbica (degradação de matéria orgânica na ausência de oxigênio, através de microorganismos) aplicados nas ETE e se mantenham na água (DE BAERE et al., 2002) que mesmo por curto período de tempo. Tal fato acarreta dois problemas ambientais: a contaminação dos recursos hídricos e o desenvolvimento de microorganismos resistentes a antibióticos (JORGENSEN et al., 2000).

Há pouca informação disponível sobre o destino e comportamento da amoxicilina em ambiente aquático. Existe a possibilidade da degradação da amoxicilina em ácido amoxicilóico conduzir a outros compostos, tais como o ácido amoxilóico e à amoxicilina dicetopiperazina, os quais já foram detectados em amostras ambientais (LAMM, 2009; NAGELE, 2005, PEREZ-PARADA et al., 2011). A Figura 2 apresenta os principais metabólitos da amoxicilina.

Segundo a ANVISA, amoxicilina integrou a lista dos princípios ativos mais vendidos no país entre o período de out/08 a out/09.

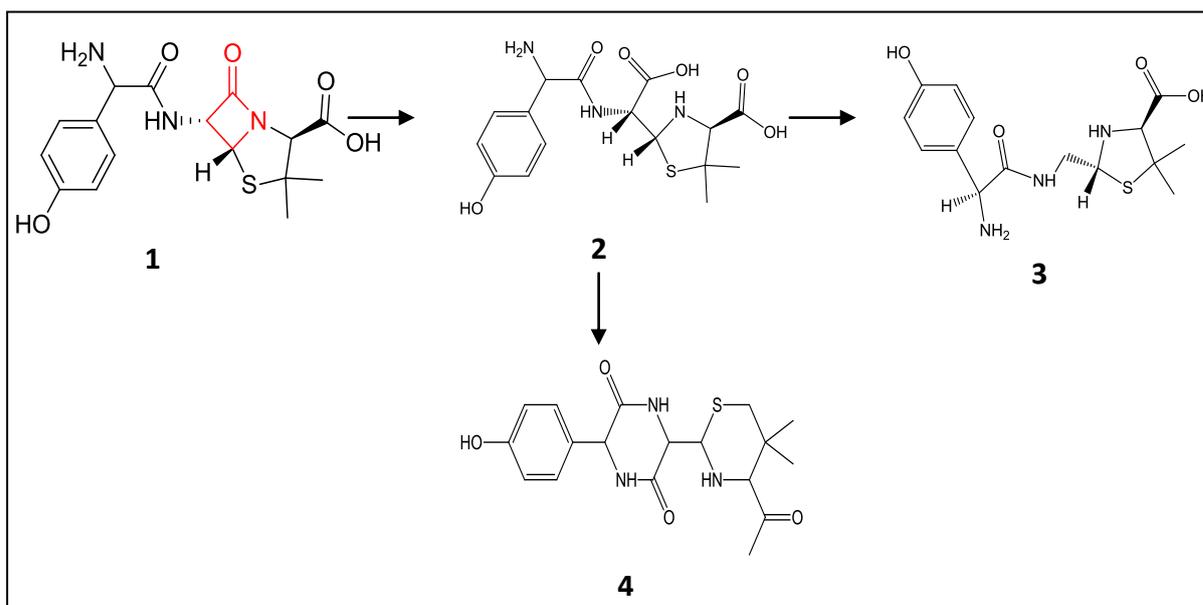


Figura 2. Mecanismos de degradação amoxicilina onde **(1)** amoxicilina, **(2)** Ácido Amoxicilóico, **(3)** Ácido Amoxilóico e **(4)** Amoxicilina dicetopiperazina (adaptado de LAMM, 2002)

2.4. Interferentes endócrinos

Os compostos orgânicos chamados interferentes endócrinos são substâncias que atuam como hormônios e possuem propriedades que podem provocar distúrbios no sistema endócrino de animais e humanos, mesmo em baixas concentrações. Observações sobre a ocorrência de anormalidades no sistema endócrino de animais submetidos à exposição de alguns compostos orgânicos motivaram o interesse no estudo destas substâncias (ALLEN et al., 1999; TAYLOR et al., 1999, GIMENO et al., 1998; JOBLING et al., 1998).

Alterações crônicas no desenvolvimento e na reprodução de várias espécies presentes em diferentes compartimentos ambientais têm sido atribuídas à ocorrência de uma grande variedade de substâncias químicas, principalmente em sistemas aquáticos naturais. Mesmo em concentrações traço, alguns compostos exógenos, sintéticos ou naturais, têm sido detectados em amostras de águas superficiais em todos os continentes do planeta, principalmente em função da atividade antrópica (KIM et al., 2006; REYERO et al., 2005; SHARMA et al., 2009; ROCHA et al., 2014).

Muitas definições são propostas para o termo interferentes endócrinos (SUSAN, 2011; GHISELLI e JARDIM, 2007), alguns autores consideram que são aquelas substâncias que interagem com sítios receptores de hormônios, enquanto que para outros, qualquer

substância que interfira no funcionamento do sistema endócrino, independentemente de atuar no sítio receptor ou não. A definição dada pela *USEPA* é a de que se trata de um “agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônio natural no corpo que são responsáveis pela manutenção, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos” (EPA, 1997; EC, 1997; KAVLOC, 1996).

Juntamente com o sistema nervoso, que se comunica por impulsos elétricos ao longo dos circuitos nervosos e celulares, o sistema endócrino regula as funções fisiológicas do organismo transportando informações da circulação de um tecido para outro via hormônios. Os hormônios são produzidos e secretados pelas glândulas endócrinas diretamente para a corrente sanguínea e influenciam de forma excitadora ou inibidora as atividades funcionais de outras células (GUYTON e HALL, 2011).

Por meio da interação com receptores de hormônios e vários outros processos no sistema endócrino e neuronal tais substâncias podem imitar a ação de um hormônio produzido pelo organismo, como o estrogênio ou a testosterona, desencadear reações químicas semelhantes no organismo; bloquear os receptores nas células que recebem os hormônios e, dessa forma, impedir a ação dos hormônios naturais; ou afetar a síntese, transporte, metabolismo e a excreção dos hormônios, alterando suas concentrações no organismo (BIRKETT e LESTER, 2003; DAMNSTR, 2002; FONTENELE et al., 2010).

De uma maneira geral, os interferentes endócrinos podem ser agrupados em dois diferentes grupos (NOHYNEK et al., 2013; DORSCH et al., 2012; SILVA et al., 2012):

1. Substâncias sintéticas - incluem os hormônios sintéticos (hormônios idênticos aos naturais utilizados como contraceptivos orais e/ou aditivos na alimentação animal), bem como os xenoestrogênios, substâncias utilizadas nas indústrias, agricultura e para os bens de consumo. Nesta categoria, estão incluídos os praguicidas e aditivos plásticos, as bifenilas policloradas, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, compostos de organoestanho, alquilfenóis, e ainda subprodutos de processos industriais, como as dioxinas e furanos;

2. Substâncias naturais - fitoestrogênios, tais como, genisteína e metaresinol e estrogênios naturais 17 β -estradiol, estrona e estriol.

Substâncias sintéticas com ação desreguladora são geralmente persistentes no ambiente, acumulam-se no solo e nos sedimentos, são transportadas para outras regiões pela atmosfera e podem acumular-se ao longo da cadeia trófica, expondo animais superiores a maiores riscos (CLARKE e SMITH, 2011). Nos ambientes aquáticos, tanto as substâncias naturais quanto sintéticas são encontradas em concentrações fisiológicas, ou seja, muito próximas das encontradas no organismo. Entretanto, para se avaliar os riscos da exposição de organismos aquáticos a tais substâncias deve-se compreender também os mecanismos de degradação que as envolvem, além do monitoramento das suas concentrações no meio ambiente. Para isso, deve-se recorrer aos ensaios biológicos do tipo *in vitro* e/ou *in vivo*, embora este último forneça dados ecotoxicológicos mais relevantes quando se trata da identificação de interferentes endócrinos em potencial (TSE, 2013; LEE et al., 2008; BEZBARUAH e KALITA, 2010).

Para muitas substâncias químicas sintéticas como os praguicidas, os efeitos produzidos a partir das atividades destes compostos no sistema endócrino (estrogênica, androgênica, anti-estrogênica e/ou anti-androgênica), observados em ensaios *in vitro*, apresentam ordens de magnitude menores quando comparados aos hormônios endógenos como o estradiol. Porém, não se deve ignorar a presença dessa classe de compostos, pois, embora pareçam ser menos potentes que os hormônios endógenos, muitos deles são persistentes no ambiente, acumulando-se nos vários compartimentos, principalmente biota, sendo posteriormente detectados nas águas, nos sedimentos, no material particulado rico em matéria orgânica, mesmo após terem deixado de ser produzidos industrialmente há várias décadas (RODNEY et al., 2013; VERBRUGGEN e VAN DEN BRINK, 2010; FARRÉ et al., 2008).

O destino dos estrógenos no ambiente dependerá de suas características físico-químicas e de fatores como: lipofilicidade, persistência, bioacumulação, tempo de exposição, mecanismos de biotransformação e de excreção, entre outros. Algumas substâncias presentes no meio ambiente sofrem biotransformação, resultando em metabólitos ou subprodutos, igualmente ou até mais danosos que os compostos originais. Devem ser levadas em conta também as propriedades do meio receptor, tais como temperatura, turbidez, pH, alcalinidade, oxigênio dissolvido, radiação, matéria orgânica e concentração de diversas outras substâncias. Devido a sua lipofilicidade e baixa volatilidade, o processo de sorção em sedimentos suspensos pode ser um fator

significativo na redução dos estrógenos na fase aquosa facilitando sua dispersão no meio ambiente. (RHYU et al., 2014; THUY e NGUYEN, 2013; KIM et al., 2010; KIM et al., 2009).

A ocorrência destes contaminantes em efluente de ETE, água de rios receptores de esgoto bruto ou tratado e águas tratadas para abastecimento público têm sido estudadas em todo do mundo (MARTÍN et al., 2012; ZORITA et al., 2009; KIM et al., 2007; PAL, et al., 2010; UTRILLA et al., 2013). Estes estudos mostram que, dependendo do tempo de exposição, podem estar relacionadas com doenças como câncer de mama, testicular e de próstata, ovários policísticos e redução da fertilidade masculina. As evidências mostram que os sistemas reprodutivos de certos organismos terrestres e aquáticos são afetados por estrogênios, resultando no desenvolvimento de anormalidades e deterioração reprodutiva nos organismos expostos. Além disso, essa exposição a estrogênios (ou substâncias que mimetizam a ação de estrogênios) pode causar a feminização de peixes se a exposição ocorrer durante o período crítico da diferenciação sexual (LI et al., 2012; PISAPIA et al., 2012; EERTMANS et al., 2003; ROULLIER-FABRE et al, 2014; LOPEZ-CASAS et al., 2012; KOLLE et al., 2012; PORTE et al., 2006).

A Tabela 3 explicita os efeitos e anomalias atualmente atribuídos aos interferentes endócrinos.

Tabela 3. Efeitos e anomalias atribuídos aos interferentes endócrinos^a

Espécie	Contaminantes	Efeitos
Peixe	Efluente ETE	Feminização de peixes Declínio da população Indução da síntese de vitelogenina ^b
	17 α etinilestradiol	Indução da síntese vitelogenina ^b Mortalidade da espécie Declínio da reprodução
	BPA e 4-nonilfenol	Declínio na reprodução Feminização de peixes
Mamíferos	Bisfenol A e PCB	Anomalias no sistema reprodutivos de ratos, Mortalidades de golfinhos Baixa concentração de testosterona
Répteis	DDE e DDT	Hormônios desregulados Anomalias morfológicas nas gônadas
Anfíbios	Efluente ETE	Anomalias no sistema reprodutivo Declínio na população Indução da síntese de vitelogenina Hermafroditismo

^a Adaptada de BILA E DEZOTTI, 2007^b Vitelogenina, Proteína sintetizada por fêmeas ovíparas durante o ciclo reprodutivo

2.4.1. Bisfenol A – Potencial Toxicológico e Exposição Humana

O Bisfenol A (BPA), Tabela 2, é um monômero de plástico utilizado na produção de policarbonato (substância que dá forma a objetos como copos, mamadeiras e garrafas), resinas epóxi e poliésteres insaturados (YOSHIDA; et al., 2001; DEKANT e VÖLKEL, 2008). Cerca de 30% da produção de BPA é utilizada na fabricação de resinas epóxi, que reúnem excelentes propriedades protetoras contra a corrosão, têm estabilidade térmica e resistência mecânica. As resinas epóxi são utilizadas, principalmente, como revestimentos em inúmeras aplicações industriais e de consumo, como embalagens de alimentos e bebidas, revestimentos protetores para usos automobilísticos e náuticos e na fabricação de turbinas eólicas geradoras de energia natural (STAPLES et al., 1998).

Durante a produção de plástico de policarbonato e resinas epóxi, as moléculas de BPA são firmemente ligadas umas às outras para formarem uma estrutura polimérica do material propriamente dito, porém a polimerização incompleta pode resultar na migração de pequenas quantidades de BPA para o produto acondicionado nessas embalagens durante o aquecimento dos processos de estabilização e estocagem (GRUMETTO et al., 2008; KANG e KONDO, 2002).

Desde o reconhecimento de que o BPA possui propriedades estrogênicas fracas, muitos estudos foram feitos para estimar a exposição humana e as concentrações ambientais do composto. Tal composto tem sido recentemente relatado como um potente mimetizador estrogênico. Análises do BPA demonstraram que este composto induz proliferação, alteração na região reprodutiva da fêmea, bem como câncer no testículo e na próstata, redução de esperma, desmasculinização, feminilização, alteração nas funções de imunidade e diminuição de fertilidade em pássaros, peixes e mamíferos. Alguns pesquisadores tem estudado o efeito do BPA na saúde humana e confirmado suas propriedades estrogênicas mesmo em concentrações inferiores a 1 ng.L^{-1} (FISHER, et al., 1999) e um efeito agonístico sobre os estrogênios endógenos já que competem pelos mesmos receptores (SUSIARJO et al., 2007; AOKI e TAKADA, 2012).

Como pode haver migração do BPA dos materiais de embalagens para os alimentos (EHLERT et al. 2008; GUART et al., 2014), fato que pode ser comprovado pela identificação de BPA em produtos enlatados como vegetais (GONZALEZ-CASTRO et al., 2011; SAJIKI et al., 2007), alimentos infantis e refrigerantes em lata (CAO et al., 2009; GRUMETTO et al. 2008), a toxicocinética após administração oral é considerada a mais

relevante para avaliação da exposição e biomonitoramento (TSAI, 2006). Após administração oral é absorvido pelo trato gastrointestinal (95% da dose) e sofre metabolismo de primeira passagem na parede do intestino e no fígado. Durante este metabolismo, sofre glucoronidação e o metabólito formado foi identificado na urina e sangue de humanos após um tempo de meia vida de aproximadamente 6h (VÖLKEL et al., 2002; KUREAYASH et al., 2002; INOUE et al., 2003; INOUE et al., 2000; PRITCHETT et al., 2002).

A formação de conjugados de BPA pode ser considerada uma reação de desativação já que os conjugados formados são desprovidos de atividade estrogênica, levando-se em conta ainda que o próprio bisfenol já possui baixa afinidade com os receptores estrogênicos (MATTHEWS et al., 2001; SHIMIZU et al., 2002; SNYDER et al., 2000).

Embora considere-se que a exposição ao BPA seja muito inferior aos níveis que levariam ao aparecimento de efeitos adversos (OMS, 2010) os órgãos regulamentadores ainda divergem sobre os limites aceitáveis para o BPA em alimentos.

A EFSA (*European Food and Safety*) estabeleceu uma ingestão diária aceitável (IDA) de $0,05 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de peso corporal baseada em um *NOAEL* (Dose de Efeito Adverso Não Observado) de 5 mg.Kg^{-1} de peso corporal por dia e fator de segurança 100. Esse *NOAEL* foi publicado em estudo realizado por STUMP e colaboradores em 2009 (STUMP, 2009).

No Brasil, a ANVISA estabeleceu, através da resolução RDC nº 17 de 17 de março de 2008 o limite máximo de exposição (LME) de $0,6 \text{ mg.Kg}^{-1}$ e, por precaução, devido a maior suscetibilidade de crianças na faixa etária de 0 a 12 meses que não possuem o sistema de eliminação pelo corpo humano completamente desenvolvido, publicou em 19 de setembro de 2011 a RDC 41/2011 que proíbe o uso deste material na fabricação de mamadeiras (BRASIL, 2011).

Em 1999, foram produzidos cerca de 2.000 milhões de toneladas de BPA e estima-se que em 2005 a produção mundial alcançou 3.500 milhões de toneladas do produto (BKH, 2005). Com base no alto volume de BPA que é produzido mundialmente e pelo fato de ser um produto com diversas aplicações é provável que o aporte para o ambiente tenha como maior contribuição processos de produção e manufatura do mesmo, além de despejos de efluentes industriais sem tratamento adequado e uma pequena contribuição pode ser atribuída à lixiviação dos produtos finais de consumo (TSAI, 2006). O tempo de

meia-vida do BPA em águas superficiais é de 1 a 150 dias, podendo dobrar quando se trata de águas subterrâneas (FRANSE e de VOOGT, 1997), sendo o mesmo persistente à biodegradação. Pode ser decomposto microbiologicamente ou por processos fotocatalítico ($\text{TiO}_2/\text{UV-C}$ e $\text{TiO}_2/\text{UV-A}$) e fotolítico (UV-A e UV-C) levando a formação de subprodutos de oxidação com atividade mais tóxica do que o próprio bisfenol A (SILVA et al., 2014). Nos solos, a meia vida do BPA pode variar de 1 a 180 dias aproximadamente e no ar esse valor varia entre 0,7 e 7,4 horas, devido a rápida oxidação sofrida pela reação com radicais hidroxila (MEZCUA et al., 2006).

2.4.2. 4-Nonilfenol – Produção e exposição humana

O 4-nonilfenol (Tabela 2) é um dos compostos mais comuns da classe dos alquilfenóis e, juntamente com o octilfenol, são os que apresentam maior importância ambiental devido à escala em que são produzidos, dos processos de biodegradação dos alquilfenóis etoxilados e por apresentarem maior estrogenicidade no grupo (LOOS et al., 2007).

Os alquilfenóis são basicamente grupos alquila de diferentes tipos e tamanhos ligados a um anel aromático que contém uma ligação fenólica. Entre seus componentes encontram-se os etoxilados e os carboxilados que possuem o grupo etoxila e carboxila substituindo o hidrogênio do OH fenólica (WARHURST, 1995).

Os alquilfenóis etoxilados são surfactantes não-iônicos usados em formulações de detergentes de uso industrial e doméstico, há pelo menos quatro décadas. Também são usados na produção de resinas fenólicas, como aditivos plásticos, emulsificantes, agentes umidificantes e em formulações de agrotóxicos. A produção anual de alquilfenóis etoxilados no mundo alcançou 390.000 toneladas em 2002 (LINTELMANN et al., 2003) e seu aporte no ambiente aquático advém do uso doméstico de surfactantes (HE et al., 2013). Os processos biológicos empregados para o tratamento de soluções contendo alquilfenóis etoxilados em ETE geram alquilfenóis mais tóxicos e mais persistentes no ambiente (SOARES et al., 2008; LOOS et al., 2007, LIAN et al., 2009). O BPA e o nonilfenol são fracamente estrogênicos e frequentemente apresentam potenciais três ou mais ordens de magnitude menores que os estrogênios estrona, 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol

(JOHSON et al., 2000), mas que apresentam potencial para induzir a produção de vitelogenina em peixes e alterar seu desenvolvimento sexual (LEE et al., 2013).

2.4.3. 17 α -etinilestradiol – Uso e exposição humana

Os estrogênios encontrados em produtos farmacêuticos são, geralmente, estrogênios que tiveram suas estruturas moleculares alteradas com o objetivo de se tornarem mais potentes do que os estrogênios do corpo e conseqüentemente mais ativos. Devido a fácil metabolização, hormônios naturais como 17 β estradiol e progesterona não são adequados para aplicações orais, exceto se forem ingeridos em altas concentrações. Por outro lado, os esteróides sintéticos atuam no sistema endócrino e alteram a atividade fisiológica mesmo em baixas concentrações (YING et al., 2002).

Hormônios naturais apresentam solubilidade em água entre 5,75 e 13,25 mg.L⁻¹, enquanto os esteróides sintéticos possuem esta solubilidade entre 0,16 e 4,83 mg.L⁻¹. O estrogênio sintético mais consumido é o 17 α etinilestradiol utilizado em contraceptivos que apresenta toxicidade de 10 a 50 vezes maior do que a estrona e o 17 β estradiol (SEGNER et al., 2003). Este hormônio já foi detectado em corpos d'água (KOLPIN et al., 2002; KASPRZYK-HORDERN et al., 2008) em concentrações capazes de levar a feminização de peixes, alterações no DNA de espécies aquáticas e no número de células do sistema imune (KOLPIN et al., 2002).

A preocupação com relação a presença de hormônios estrogênios no ambiente aquático é ressaltada em publicações que demonstram seu comportamento durante os processos de tratamento de água e esgoto, métodos alternativos e eficazes para remoção desses compostos e possibilidades de redução do aporte desses compostos no ambiente (POJANA et al., 2007; LUO et al., 2014; KUSTER et al., 2010). A Figura 3 apresenta a fórmula estrutural dos estrogênios citados.

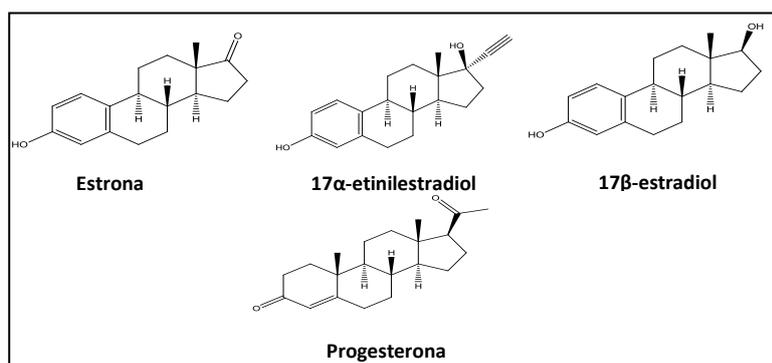


Figura 3. Fórmula estrutural dos estrogênios

2.5. Tratamentos aplicados na remoção de compostos orgânicos em água para abastecimento público

O fim do problema gerado pela presença de poluentes orgânicos em sistemas aquáticos deve ser realizado em duas etapas: uma a longo prazo que é a recuperação das áreas afetadas e a outra, que deve ser realizada a curto prazo é o desenvolvimento de tecnologias de tratamento capazes de remover esses poluentes e de produzir água potável para a população.

Atualmente não há legislação sobre concentrações máximas de produtos farmacêuticos no ambiente, apesar de seu potencial impacto sobre o meio ambiente e a saúde humana. Com base no princípio da precaução, *European Union Water Framework Directive* produz uma lista atualizada de substâncias prioritárias a cada quatro anos (2000/60/CE) e identificou compostos de produtos farmacêuticos como potenciais poluentes.

O Ministério do Meio Ambiente, através do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), na resolução N° 357, de 17 de março de 2005, que “dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências”, retrata que existem parâmetros aceitáveis para os diferentes usos da água, desde o consumo humano até águas para recreação ou atividades esportivas. Tal legislação está baseada em normatizações estabelecidas em países desenvolvidos e não trata os fármacos como poluentes. Como mostrado anteriormente, o sistema de tratamento de água convencional utilizado no Brasil não é totalmente eficaz para remoção dos compostos orgânicos (STUMPF et al., 1999; TERNES et al., 1997). No Brasil, ao longo das últimas décadas também tem sido observado um intenso processo de urbanização fazendo com que áreas sensíveis, próximas a mananciais para abastecimento sejam ocupados de maneira desordenada, com conseqüente comprometimento da qualidade da água. É o caso do Reservatório do Guarapiranga, cuja ocupação de seu entorno é responsável pela deteriorização ambiental e da água (MIERWZA et al., 2008).

O sistema de tratatamento convencional composto por processos físico-químicos com etapas coagulação, floculação, decantação, filtração e desinfecção, podendo ser acrescido de pré e pós-cloração é utilizado para a remoção de partículas, colóides e

algumas substâncias dissolvidas sendo em geral, ineficazes para a remoção da maioria dos micropoluentes (VAZ et al., 2010).

As etapas de coagulação e floculação têm como objetivo o aumento das partículas que se encontram na forma de suspensão fina, em estado coloidal ou em solução, como bactérias, protozoários e/ou plâncton para que estas possam ser removidas pelos processos de sedimentação, filtração ou flotação. O coagulante é adicionado na unidade de mistura rápida e, em seguida, a água segue para os floculadores para que a ação do coagulante e da agitação promova o encontro dos flocos formados pela desestabilização das partículas e sedimentem nos decantadores (VAZ et al., 2010).

Normalmente, as unidades de coagulação e floculação precedem os decantadores, mas dependendo da qualidade da água do manacial, após a coagulação a água pode ser enviada diretamente aos filtros em processo conhecido como filtração direta (VAZ et al., 2010).

Nos decantadores, os flocos depositam-se no fundo do tanque, formando uma camada de lodo, que periodicamente é removida através de lavagens ou descargas. Esta etapa precede a etapa de filtração que retém partículas e micro-organismos não sedimentados.

Os filtros podem ser constituídos de antracito, areia, pedregulhos e cascalhos com tamanhos variados (camada suporte). Ao final da filtração a água é recolhida em canal para água filtrada e passa pelo processo de desinfecção para eliminação de patógenos. Antes da distribuição à população, a água tratada ainda é fluoretada com adição de um composto de flúor que tem a finalidade de prevenção de cárie dentária (VAZ et al., 2010). A Figura 4 apresenta um esquema do sistema de tratamento convencional de água com possíveis pontos de aplicação de substâncias auxiliares.

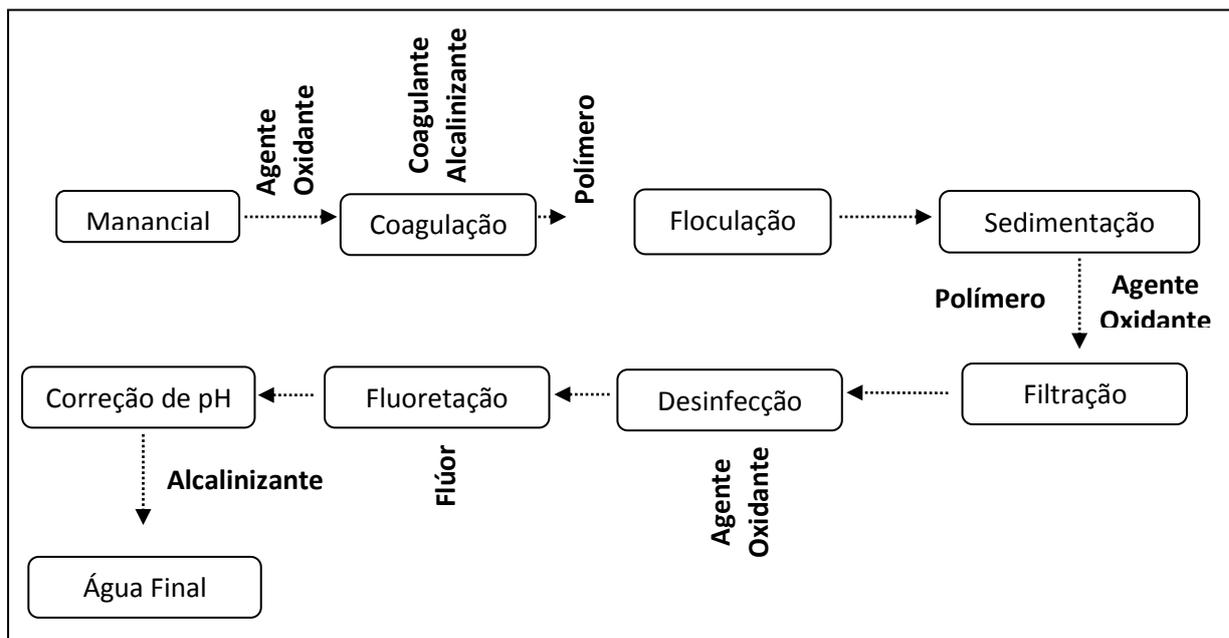


Figura 4. Esquema de tratamento convencional de água, adaptado de FERREIRA FILHO e MARCHETTO, 2006

MATAMOROS e SALVADÓ em 2013 avaliaram a remoção de micropoluentes por esse processo. As remoções variaram de eliminação irrelevante a 50%, entre os quais foram observadas as remoções relativamente altas (20-50%) para os compostos com K_{ow} menor do que 4 em pH entre 7 e 8. Em 2014, LUO e colaboradores demonstraram em um revisão da literatura que a maioria dos micropoluentes tem baixa taxa de remoção pelos processos de coagulação e floculação. Há pequenas diferenças entre as doses e diferentes tipos de coagulantes utilizados. O cloreto férrico ($FeCl_3$) atinge taxas consideradas ótimas e sulfato de alumínio ($Al_2(SO_4)_3$) é mais eficaz para a remoção de compostos hidrofóbicos. A composição das águas superficiais também pode exercer efeitos positivos ou negativos sobre a remoção de micropoluentes durante o tratamento de coagulação-floculação. Por exemplo, o ácido húmico dissolvido pode aumentar a eliminação de alguns compostos farmacêuticos, tais como o diclofenaco, ibuprofeno e benzafibrato formando complexos com esses compostos, como também pode diminuir a remoção de micropoluentes, devido à remoção preferencial destes compostos por meio da coagulação. Além disso, o desempenho dos processos de coagulação-floculação pode também ser influenciada por diversas condições de operação, incluindo as condições de mistura, pH, alcalinidade, temperatura, bem como a presença de cátions e ânions que podem interferir no processo (LUO et. al, 2014).

Associado ao processo de coagulação-floculação, o uso de cloro é ainda o tratamento convencional mais comum para a desinfecção de água potável. Diversos estudos sobre a cloração de compostos aromáticos mostraram que a taxa de reação de cloro pode ser fortemente influenciada pela presença de diferentes grupos funcionais no anel de benzeno. A reação é normalmente rápida nos produtos farmacêuticos que contêm aminas, dando origem a cloraminas como produtos de oxidação (PINKSTON e SEDLAK, 2004). Numerosos estudos demonstram que a utilização de cloro leva a formação de compostos tóxicos e o grau de mineralização para uma grande quantidade de compostos orgânicos não atinge níveis aceitáveis (GLASSMEYER e SHOEMAKER, 2005 ; BEDNER E MACCREHAN , 2006; BEDNER E MACCREHAN , 2006, NEGREIRA et al., 2008; VANDERFORD et al., 2008; GERVAIS et al., 2011).

Tecnologias de tratamentos que podem eficientemente remover poluentes cujo aporte seja associado a atividade humana vêm sendo bastante investigada dando-se ênfase não só a sua destruição, mas também a eliminação de seu efeito potencial (GUNTEN, 2003; Joss, 2005). Neste sentido, podem ser citados sistemas de separação por membranas (JACANGELO et al., 1997; HOFMAN et al., 1998; MA et al., 1998; WILBERT et al., 1998; NICOLAISEN, 2002; BENTAMA et al., 2004), adsorção em carvão ativado granular (SOBECKA, et al., 2006; SPEITEL E DIGIANO, 1987), POA (MELO et al., 2009) para remoção de fármacos residuais e interferentes endócrinos em efluentes industriais e domésticos, bem como no tratamento de água potável.

A ozonização pode ser considerada uma tecnologia promissora na remoção de estrógenos naturais e sintéticos de águas potáveis e efluentes de ETE devido as altas taxas de remoção alcançadas quando baixas doses de ozônio são utilizadas (HUBER et al., 2005). Contudo, há relatos de estrogenicidade residual que pode estar associada a formação de subprodutos de oxidação (BILA E DEZOTTI, 2007). Com relação a amoxicilina há relatos de que a degradação se mostrou eficiente para sua remoção (> 90%), mas a variação de no máximo 30% na dosagem de carbono orgânico total (COT) evidencia a formação de intermediários recalcitrantes (ANDREOZZI et al., 2005), nessas condições. As desvantagens estão relacionadas ao custo de produção do O₃, à limitações por transferência de massa do O₃ gasoso à fase aquosa e à formação de bromatos (DOMENECH et al., 2001).

Os POA investigados na remoção de interferentes endócrinos de ambientes aquáticos são: O₃/H₂O₂, fotocatalise, H₂O₂/UV. Sob condições de tratamento reais,

praguicidas (atrazina e outros herbicidas) e fármacos como amoxicilina, bezafibrato, paracetamol (TROVÓ et al., 2008) e tetraciclina (BAUTITZ E NOGUEIRA, 2007) foram oxidados com O_3/H_2O_2 e o reativo de fenton (Fe^{2+}/H_2O_2) em efluente de ETE sob radiação solar. A degradação obtida foi superior a 95% para todos os fármacos em intervalos de tempo de no máximo 5 min (TROVÓ et al., 2008; BAUTITZ e NOGUEIRA, 2007). Tais processos podem ser aplicados tanto na saída das estações de tratamento de esgoto quanto nas etapas finais do processo de tratamento de água.

O carvão ativado é comumente usado no tratamento de água potável para remoção de micropoluentes responsáveis pelo gosto e odor desagradáveis e também precursores da formação de trihalometanos (THM's, subprodutos do processo de desinfecção que podem aumentar a toxicidade dos efluentes gerados). Estudos de remoção de interferentes, fármacos e produtos de uso pessoal (62 compostos), mostraram que somente 10% dos compostos são oxidados facilmente pelo cloro, enquanto a adição de $5mg.L^{-1}$ de carvão ativado em pó (CAP) com 4 horas de contato remove de 50 a >98% dos compostos. Consideram, assim, a adição de CAP no processo de tratamento de água uma estratégia de custo relativamente baixo para remoção de interferentes endócrinos, fármacos e produtos de uso pessoal. Entretanto, a *USEPA* avalia o carvão ativado granulado (CAG) como a melhor tecnologia para remoção de numerosos poluentes orgânicos (WESTERHOFF et al, 2005)

Para a obtenção de água potável, a mineralização completa muitas vezes não é viável. Portanto, a avaliação dos produtos das reações e dos subprodutos que resultam da oxidação dos componentes da matriz também são um desafio. A cinética e os mecanismos de formação de produtos secundários devem ser investigadas com mais detalhe, dado a carência de informações sobre sua toxicidade, atividade biológica, e degradabilidade. Micropoluentes persistentes podem ser removidos por filtração utilizando membrana (nanofiltração e osmose inversa) ou carvão ativado (NGHIEM et al., 2005). No entanto, dependendo do tempo de operação, sua capacidade de adsorção ou retenção diminui devido à interferência da matéria orgânica natural. Além disso, a incrustação biológica pode levar ao entupimento de filtros. Para a sua aplicação com sucesso, ambos processos necessitam estratégias melhoradas de regeneração, que evitam a diminuição do seu desempenho e o retorno dos micropoluentes para o meio ambiente.

2.6. Métodos analíticos para determinação de fármacos e interferentes endócrinos em amostras ambientais

Para a determinação de fármacos, diferentes métodos analíticos são relatados na literatura, e podem ser aplicados a amostras ambientais. Um dos grandes problemas encontrados é a necessidade do desenvolvimento de metodologias que permitam a análise não só dos fármacos, mas também dos metabólitos que podem ser prejudiciais ao meio ambiente em concentrações da ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$ ou ng.L^{-1} . Para tanto, é usualmente utilizado o método de extração em fase sólida (SPE) para concentrar e extrair os compostos-alvo e técnicas cromatográficas e espectrométricas para separação e detecção adequadas (ODAINI et al., 2010; PAILLER et al., 2009; MIGOWSKA et al., 2012; ZHOU et al., 2012).

TERNES, em 2001 (TERNES, 2001) fez uma revisão sobre os métodos analíticos utilizados na determinação de vários fármacos residuais, atingindo níveis de ng.L^{-1} , em diferentes matrizes aquosas. Com relação aos interferentes endócrinos LOPEZ DE ALDA e BARCELÓ revisaram métodos para determinação de estrogênios em matrizes aquosas (LOPEZ DE ALDA e BARCELÓ, 2001) e utilizaram técnica automatizada de extração em fase sólida com separação por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos (SPE-HPLC-DAD) para a determinação de hormônios esteróides e substâncias sintéticas em amostras de água (LOPEZ DE ALDA e BARCELÓ, 2000 e 2001).

Para detecção de fármacos residuais em ambiente aquático (efluentes de ETE, em águas de rios, de solos e água potável) na faixa de $\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1} , os métodos descritos na literatura são baseados em SPE-GC-MS (STUMPF et al., 1999; SACHER et al., 2001; XIAO et al., 2001; OLLERS et al., 2001; MOL et al., 2000) ou extração em fase sólida com separação por cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por espectrometria de massas (SPE-HPLC-MS) (HPLC-MS) (FARRÉ et al., 2001; AHRER et al., 2001; LINDSEY et al., 2001; HIRSCH et al., 1998; SACHER et al., 2001; TERNES et al., 2001; GOLET et al., 2001; Hartig et al., 1999; TERNES et al., 1999, JONHSON et al., 2000). Devido à sua sensibilidade e seletividade, a detecção por espectrometria de massas é usada para assegurar a identificação das substâncias estudadas.

Em 2006, RICHARDSON fez uma revisão sobre a utilização da espectrometria de massas para determinação de contaminantes emergentes em amostras ambientais e dos subprodutos de desinfecção em água potável. A revisão inclui técnicas de limpeza e

concentração tanto online quanto offline, separação cromatográfica e técnicas de detecção usando espectrômetros do tipo triplo quadrupolo (QqQ), tempo de voo (TOF) e quadrupolo-tempo de voo acoplados (Q-TOF). Pode ser citada também a revisão publicada por PETROVIC e colaboradores, em 2005, sobre análise de fármacos utilizado o acoplamento de cromatografia a líquido com espectrometria de massas (LC-MS) (PETROVIC et al., 2005).

Com relação a determinação de subprodutos de oxidação e metabólitos muitos autores utilizam a cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução conseguindo dessa forma elucidar mecanismos de degradação e identificar compostos ainda não relatados (GONZALEZ-MARIÑO et al., 2013; GOMEZ et al., 2010; BIRKHOLZ et al., 2014; PICÓ, et al., 2008; MAGI et al., 2010; PEREZ-PARADA et al., 2011).

2.7. Justificativa

Recentemente, o monitoramento de contaminantes orgânicos de origem antropogênica no meio ambiente vem ganhando grande interesse, pois muitas dessas substâncias são frequentemente encontradas em efluentes de ETEs e águas naturais, em concentrações na faixa de $\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1} . No Brasil, esse fato se agrava pela deteriorização da qualidade da água dos mananciais utilizados para abastecimento público que recebem aporte direto de esgoto doméstico em razão do quadro deficitário de infraestrutura em saneamento presente no país.

O controle do descarte de efluentes líquidos no corpo receptor é estabelecido, no Brasil, por legislação federal, CONAMA 357/2005 (BRASIL, 2005) que especifica as substâncias e padrões numéricos de emissão. Ao se considerar a grande quantidade de substâncias passíveis de serem lançadas no ambiente aquático por atividades industriais, verifica-se que o número é muito maior do que as que foram estabelecidas pela legislação. Tanto a identificação e detecção de todas as substâncias presentes em efluentes de natureza química complexa quanto a possibilidade de se estimar os efeitos dessas substâncias sobre a biota aquática ainda são os maiores problemas a serem enfrentados.

Estudos como o realizados por STACKELBERG e colaboradores (2004) e conduzido pelo *US Geological Survey* e por STUMPF e colaboradores (1999) que avaliaram a presença

de diversos contaminantes orgânicos, encontrando dentre eles antibióticos em ETE, em ETA, nos rios que as abastecem e em água potável comprovam a resistência desta classe de contaminantes aos processos convencionais de tratamento. Destacam-se ainda a questão da regulamentação quanto à presença destas substâncias em água potável, ainda hoje incipiente por não haver dados suficientes para que se proceda à regulamentação do descarte das mesmas. Deve-se levar em conta ainda que ausência de alguns compostos orgânicos não necessariamente implicam sua total remoção na ETE e/ou na ETA. Os processos de tratamento podem estar transformando-os em substâncias com toxicidade desconhecida ou ainda, sem metodologia analítica que permita sua determinação e quantificação.

A combinação de tecnologias de tratamento convencionais e não convencionais em efluentes de ETE permitiriam a remoção desses resíduos evitando a contaminação de águas superficiais por essa fonte e, conseqüentemente, os efeitos em organismos aquáticos seriam minimizados. Por outro lado, a água captada pela ETA que estaria contaminada por resíduos de fármacos provenientes de outras fontes, como esgoto doméstico *in natura* e efluente rural, após passar pelos processos convencionais de tratamento, se submetida aos processos não convencionais anteriormente citados teria sua carga orgânica reduzida e, assim, possíveis efeitos prejudiciais à saúde humana seriam minimizados.

Enquanto as análises químicas identificam e quantificam as concentrações das substâncias tóxicas, os testes de toxicidade avaliam o efeito dessas substâncias sobre sistemas biológicos (Radjénovic et al., 2009). Desse modo, as análises químicas e os testes de toxicidade se complementam e torna-se imprescindível a avaliação da toxicidade final do efluente, independente dos processos de tratamento aos quais tenham sido submetidos.

Nesse contexto, por meio do monitoramento de compostos orgânicos por HPLC-DAD e HPLC-MS antes e após a aplicação do tratamento de água, pode-se gerar um melhor conhecimento sobre o desempenho das tecnologias de tratamento propostas para a remoção de contaminantes orgânicos presentes em mananciais utilizados para abastecimento público.

3. Objetivos

O objetivo geral do projeto é a avaliação da remoção de compostos orgânicos, amoxicilina, cafeína, 4-nonilfenol, BPA e 17 α etinilestradiol em água para abastecimento público pelo processo de tratamento convencional e relacionar as taxas de remoção obtidas com a redução de cor, turbidez e variação de pH estabelecidos como parâmetros de potabilidade da água pela legislação vigente.

Objetivos Específicos

- Desenvolver metodologia analítica utilizando técnicas cromatográficas e espectrométricas para detecção e quantificação das substâncias de interesse;
- Avaliar procedimentos para limpeza e concentração de amostras, visando ampliar a capacidade do método analítico e melhorar a resolução da análise;
- Determinar interferentes endócrinos, amoxicilina e cafeína em amostras de água do Reservatório do Guarapiranga;
- Avaliar a eficiência de remoção de amoxicilina, cafeína e interferentes endócrinos pelo sistema de tratamento convencional de água em escala laboratorial.

4. Materiais e Métodos

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório Toxinas e Produtos Naturais de Algas (LTPNA) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e no Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Estes laboratórios disponibilizaram toda a infraestrutura necessária à execução da parte experimental do trabalho.

4.1. Solventes, reagentes e padrões

Todos os solventes utilizados apresentavam pureza mínima de grau HPLC e encontram-se listados na Tabela 4 juntamente com os demais reagentes utilizados. Os equipamentos utilizados encontram-se listados na Tabela 5. A água utilizada em todas as análises foi deionizada em sistema MilliQ® com resistividade igual a 18,2 MΩ cm. A AMX foi obtida do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCS, FIOCRUZ, RJ) sob forma de sal tri-hidratado com 98% de pureza. Os padrões BPA, 4-nonilfenol e 17α-etinilestradiol e os padrões internos amoxicilina (fenil ¹³C₆), cafeína (trimetil ¹³C₃) e bisfenol-*d*₁₂ foram obtidos da Sigma-Aldrich Brasil, em pureza > 99%. A Tabela 6 traz informações sobre os padrões analíticos utilizados neste trabalho.

Tabela 4. Especificação de reagentes solventes orgânicos utilizados

Solvente	Especificação	Fabricante
Metanol (CH ₃ OH)	HPLC	J.T.Baker, EUA
Acetonitrila (CH ₃ CN)	HPLC	J.T.Baker, EUA
Hidróxido de Amônio (NH ₄ OH)	HPLC	Fluka, EUA
Formiato de Amônio (CH ₅ NO ₂)	LC/MS	Fluka, EUA
Ácido Fórmico (CH ₂ O ₂)	LC/MS	Fluka, EUA

Tabela 5. Especificação da Instrumentação utilizada

Equipamento	Especificação
Cromatógrafo a Líquido	Prominence, UFLC System, Shimadzu
Cromatógrafo a Líquido	Agilent 1290
Espectrômetro de massas triplo quadrupolo (QqQ)	Agilent TriploQuad 6460
Interface LC-MS	<i>Electrospray</i> (ESI)
Estação de tratamento de Dados	Agilent MassHunter LabSolution
Sistema de purificação de água	Milli-Q, Direct 6.0
Banho de ultra-som	Elmasonic E60H
Balança analítica	Denver APX-60
SpeedVac	SPD 1010-115, Thermo Electro Corporation®

Tabela 6. Nome IUPAC^b, pureza, marca e número CAS^a dos compostos determinados

Compostos	Número CAS^a	Marca	Pureza	Nome IUPAC^b
Cafeína	58-08-2	Sigma-Aldrich	98%	3,7-diidro,1,3,7-trimetil-1H-purino-2,6-diona
Amoxicilina	61336-70-7	INCQS, FIOCRUZ	99%	(2S,5R,6R)-6-[[[(2R)-2-amino-2-(4-hidroxifenil)acetil-amido]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-ácido carboxílico
Bisfenol A	80-05-7	Sigma-Aldrich	99%	4,4'-isopropilidenedifenol
4-nonilfenol	104-40-5	Sigma-Aldrich	99,9%	4-n-nonilfenol
17α-etinilestradiol	57-63-6	Sigma-Aldrich	99,3%	19-norpregna-1,3,5(10)-trien-20-ino-3,17 α -diol

^aCAS: Chemical Abstracts Service, ^bIUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

4.2 Coleta

Amostras de água bruta foram coletadas no Reservatório do Guarapiranga cuja represa está localizada na Bacia do Alto Tietê, na região sul sudoeste da área metropolitana da cidade de São Paulo. A Figura 5 apresenta uma vista geral do Reservatório do Guarapiranga. As coletas foram realizadas no período da manhã e as amostras coletadas e transportadas em reservatório plástico com tampa.



Figura 5. Vista geral do Reservatório do Guarapiranga, localizado na Bacia do Alto Tietê, na região sul/sudoeste da área metropolitana da cidade de São Paulo (23°43'50.5"S)

4.3. Preparo dos Padrões

Soluções estoque (1 mg.mL^{-1}) individuais de cada analito foram preparadas em MeOH e água (1:1, v:v) após a pesagem dos padrões em balança analítica com precisão de 0,01 mg. As soluções de trabalho, em concentrações de até 5 ng.mL^{-1} foram preparadas por diluição direta das soluções estoque. Todas as soluções foram armazenadas em geladeira (4 a 8 °C) até o momento de uso. Em razão da instabilidade da amoxicilina, soluções novas eram preparadas antes de cada uso.

Amostras de água sintética foram preparadas dissolvendo-se padrão comercial de ácido húmico (Sigma-Aldrich) em NaOH $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ a concentrações finais 5 e 20 mg.L^{-1} .

Amostras de água sintética fortificada foram preparadas adicionando-se os padrões analíticos às amostras de água sintética anteriormente preparadas. A concentração final dos analitos nessas amostras foi $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e $50 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ (ZHAO et al., 2012; YANG et al., 2010; BALLARD e MACKAY, 2005). As amostras coletadas conforme descrito no item 4.2 e as amostras sintéticas preparadas foram caracterizadas por determinação de pH, turbidez, cor, carbono orgânico total e absorção em $\text{UV}_{254 \text{ nm}}$.

4.4. Caracterização físico-química das amostras de água

A caracterização físico química permitiu avaliar a qualidade da água bruta e das amostras sintéticas quanto aos parâmetros selecionados, tais como pH, turbidez, cor, carbono orgânico total (COT) e absorção em UV_{λ254nm}. A caracterização foi realizada após a coletas das amostras e, no caso das amostras sintéticas, antes da realização dos ensaios de jarros.

4.4.1 Medidas de pH

A leitura do pH da amostra foi realizada diretamente em pHmetro digital Metrohm modelo 827 calibrado diariamente com padrões de pH 4, 7 e 9 da marca Metrohm.

4.4.2 Medidas de turbidez

A determinação da turbidez da amostra foi realizada sem filtração em turbidímetro HACH modelo 2100, previamente calibrado com padrões específicos, introduzindo-se cubetas de vidro, com capacidade de 30 mL da água a ser analisada.

4.4.3. Medidas de cor

As medidas de cor foram realizadas após filtração em membranas de acetato celulose (0,45 µm) pelo método espectrofotométrico do espectrofotômetro Hach DR 2010 através da conversão dos valores de absorção em λ 455 nm em mg.Pt-Co.L⁻¹.¹

4.4.4. Determinação de cloro residual

A determinação de cloro residual foi realizada em espectrofotômetro Hach utilizando foi utilizado o reagente específico do equipamento para a análise de cloro livre: *DPD Free Chlorine powder pillow* (Método DPD, N,N-dietil-1,4 fenilenodiamino). As leituras são realizadas em 530 nm.

¹ mg.Pt-Co.L⁻¹: Escala padronizada para determinação de cor em água (CONAMA 357/2005.)

4.4.5. Determinação da absorção UV $_{\lambda 254\text{ nm}}$

As medidas de absorção em UV $_{\lambda 254\text{ nm}}$ foram realizadas em espectrofotômetro Thermo.

4.4.6. Determinação de carbono orgânico total (COT)

As determinações de carbono orgânico total foram realizadas por técnico especializado no Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo em equipamento da marca Shimadzu, modelo TOC-V $_{\text{CPH}}$.

4.5. Método analítico

4.5.1. Otimização de metodologia analítica por HPLC-DAD e LC-MS para determinação de AMX, cafeína, BPA, 17 α etinilestradiol e nonilfenol em amostras de água sintética

A metodologia empregada foi adaptada de Montagner e Jardim (Montagner e Jardim, 2011). Todo o material utilizado foi lavado com detergente neutro Extran[®], água corrente, água ultrapura e seco em estufa por 24h.

Os experimentos foram inicialmente realizados em HPLC, modelo Prominence, marca Shimadzu com detector de arranjos de fotodiodo (DAD). A separação cromatográfica foi otimizada variando-se os tipos de coluna, composição e gradiente de fase móvel. Foram utilizadas colunas de fase estacionária reversa (C₁₈, Polar RP e Hidro RP) e monitorados os comprimentos de onda (λ) máximos de absorção para cada um dos compostos: 232 nm (amoxicilina), 273 nm (cafeína), 278 e 280 nm (interferentes endócrinos). O volume injetado foi de 10 μL de solução contendo cada padrão em concentração 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

A Tabela 7 apresenta os parâmetros cromatográficos empregados para cada método de análise por HPLC-DAD. A conformidade do sistema cromatográfico foi avaliada para o método proposto usando HPLC-DAD. Os parâmetros: tempo de retenção (Tr), comprimento de onda máximo (λ), fator de retenção (k), resolução (R) considerando o pico de interesse e o pico anterior mais próximo e fator alargamento (Tf) foram verificados para separação dos compostos em uma solução 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e calculados pelo software LabSolutions da Shimadzu. Curvas analíticas foram preparadas para cada composto com concentrações de (5, 10, 50, 100 e 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e construídas em termos de área média de três injeções de cada concentração. Para cada concentração foram calculadas as médias

das injeções e o desvio padrão relativo. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram obtidos através de 5 injeções do ponto de menor concentração da curva. O limite de detecção é considerado 3 vezes maior que a relação sinal/ruído e o limite de quantificação é encontrado multiplicando-se essa mesma relação por 10 (ANVISA, 2003).

Tabela 7. Métodos cromatográficos avaliados para a separação da amoxicilina, cafeína e interferentes endócrinos

Método	Coluna	Dimensões	Fase Móvel	Fluxo (mL.min ⁻¹)
1	Luna C ₁₈ Phenomenex®	150 x 2 mm, 3 µm	Acetonitrila (0,1% Ác. Fórmico): H ₂ O (pH 3,0)	0,2
2	Polar RP Phenomenex®	150 x 2 mm, 4 µm	Metanol (0,1% Ác.Fórmico): Ác. Fórmico 0,1% (pH 3,0)	0,2
3	Hidro RP Phenomenex®	150 x 2 mm, 4 µm	Metanol (0,1% Ác.Fórmico): Ác. Fórmico 0,1% (pH 3,0)	0,2
4	Hidro RP Phenomenex®	150 x 2 mm, 4 µm	Metanol/água 0,05% Ác. Fórmico (15:85, v:v): Acetato Amônio, 5 mMol.L ⁻¹ , pH 7,5/MeOH (20:80, v:v)	0,2

As análises por LC-MS/MS foram realizadas em sistema de cromatografia a líquido (Agilent 1290) acoplado a espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (Agilent, Triplo Quad. 6460) com ionização por *electrospray*. O método 4 da Tabela 7 Tabela 7foi otimizado com objetivo de se adequar a detecção simultânea em modos de ionização positivo (amoxicilina e cafeína) e negativo (interferentes endócrinos). Em seguida, o gradiente cromatográfico foi alterado com objetivo de se reduzir o tempo total de análise sem que houvesse perda de sensibilidade. Foram utilizadas soluções-padrão contendo AMX, cafeína, BPA, 17 α -etinilestradiol e 4-nonilfenol (100 µg.L⁻¹) preparadas em Metanol:Água (1:1, v/v) e em Metanol:Ác. Húmico 5 mg.L⁻¹ (1:1, v/v).

Os seguintes parâmetros de espectrometria de massas foram otimizados: capilar (4000 V), gás de dessolvatação (vazão 12 L.min⁻¹ a 300 °C), gás nebulizante (45 psi), gás de bainha (250 °C a 5 L.min⁻¹) e, utilizando o software Optimizer (Agilent MassHunter) as transições e energias de colisão a serem utilizadas puderam ser determinadas. As análises LC/MS foram realizadas em modo scan (50-500 m/z) e MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas).

Foram construídas curvas analíticas em MeOH:H₂O (1:1, v/v) para cada composto com concentrações de 1 ng.mL⁻¹ a 200 µg.mL⁻¹. O volume de injeção foi de 2 µL para todas as análises. Cada concentração foi analisada em triplicata. Para construção das curvas analíticas foram utilizados como padrões internos amoxicilina (fenil ¹³C₆), cafeína (trimetil ¹³C₃) e bisfenol-*d*₁₂ na concentração de 5 µg.mL⁻¹, que foi utilizado como padrão interno para os três interferentes endócrinos analisados. As curvas foram construídas em termos da razão entre as áreas do analito e do padrão interno dos analitos *versus* a razão entre suas concentrações. Foram realizadas três injeções de cada concentração e calculadas as médias das injeções e o desvio padrão relativo.

4.5.2. Extração em fase sólida

A extração em fase sólida utiliza uma coluna contendo um sorvente apropriado para adsorver o analito que é então eluído com solvente específico. A SPE envolve etapas de condicionamento do cartucho com solvente adequado para disponibilizar os sítios ativos e para ajustar as forças dos solventes de eluição com o solvente da amostra, extração dos analitos da amostra, lavagem do cartucho para eliminar possíveis interferentes e eluição dos analitos de interesse para posterior análise (SILVA e COLLINS, 2011).

Foram avaliados três procedimentos de extração em fase sólida descritos na literatura (Hilton e Thomas, 2003; LOPEZ DE ALDA e BARCELÓ, 2000; Chen et al., 2002) sendo o ajuste de pH, com o objetivos de aumentar a afinidade dos analitos pela fase estacionária e a utilização do cartucho OASIS HLB (WATERS), que possui fase estacionária constituída de revestimento polimérico com equilíbrio hidrofílico-lipofílico, que permite a análise de compostos com diferenças de polaridade (Waters®). A Tabela 8 descreve as principais diferenças entre os métodos.

As extrações foram realizadas a vácuo por meio da fixação dos cartuchos em um sistema 12-Port Vacuum Manifold, marca PrepSep. As amostras foram eluídas pelo cartucho com o auxílio de uma bomba peristáltica (Ismatec IPC), à vazão de 10 mL.min⁻¹.

Tabela 8. Descrição procedimentos de SPE avaliados para concentração de amoxicilina, cafeína e interferentes endócrinos em amostras de água

Etapa	Método 1	Método 2	Método 3
Cartucho	OASIS HLB	C ₁₈	Oasis HLB
1ª etapa (ativação cartucho)	6 mL metanol 5 mL água 5 mL água (pH 7,5)	7 mL de acetonitrila; 5 mL metanol; 5 mL de água deionizada	5 mL metanol 7 mL acetonitrila 7 mL água MilliQ®
2ª etapa (amostra)	400 mL	2000 mL	1000 mL
3ª etapa (secagem do cartucho)	5 min vácuo	5 min vácuo	15 min com N ₂
4ª etapa (clean-up)	-	5 mL de água	-
5ª etapa (secagem)	Secagem por 10 min vácuo	Secagem por 5 min vácuo 5 min fluxo N ₂	-
6ª etapa (eluição analito)	2 x 4 mL metanol	10 mL acetonitrila	4 x 3 mL de acetonitrila
7ª etapa (secagem amostra)	Fluxo N ₂	Fluxo N ₂	Fluxo N ₂
8ª etapa (Ressuspensão amostra eluída)	200 µL MeOH:H ₂ O, (1:1, v/v)	500 µL metanol	500 µL metanol

A eficiência da extração em fase sólida foi avaliada pelo teste de recuperação estimado pela análise de amostras de água destilada, amostras sintéticas e amostras coletadas no Reservatório do Guarapiranga fortificadas com quantidades conhecidas dos compostos de interesse e calculada segundo a expressão:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{concentração obtida}}{\text{concentração adicionada}} \times 100$$

Os intervalos aceitáveis de recuperação de acordo com a RE 899 da ANVISA estão entre 70 e 120%.

4.6. Ensaios de Jarros (BALLARD e MACKAY, 2005; HYUNG e KIM, 2009)

A eficiência de remoção dos compostos orgânicos pelo tratamento convencional (coagulação-floculação) foi avaliada através de ensaios de bancada realizados no equipamento *jar-test* (ensaios de jarros). O *jar-test* é um equipamento de reatores estáticos constituído de 6 jarros com volume de 2 L. com gradiente de velocidade entre 10 e $2000.s^{-1}$ que simula os processos de tratamento de água como ocorre em uma ETA. As fases do ensaio de jarros correspondem na prática as três etapas do processo: dispersão rápida do coagulante (coagulação), floculação e decantação.

Para avaliação da remoção dos compostos orgânicos de interesse neste trabalho foram otimizados os seguintes parâmetros: concentração de oxidante (1-10 ppm de Cl^- , na forma de $NaClO$), tempo de pré-oxidação (5-30 min), concentração de coagulante (10-100 $mg.L^{-1}$ de $FeSO_4$) e pH ótimo de coagulação (3-11). Levou-se em conta ainda, como limitante para a concentração do oxidante a concentração máxima de cloro residual permitida na água para consumo humano de $2 mg.L^{-1}$ (Brasil, 2014). Os parâmetros de execução dos *jar-test* foram adotados e não foram modificados, pois o objetivo do trabalho não era a otimização dos parâmetros de mistura rápida, floculação e sedimentação.

Amostra de água coletada no reservatório do guarapiranga, soluções de ácido húmico 5 e $20 mg.L^{-1}$ tanto fortificadas com os analitos em duas concentrações ($2,5 mg.L^{-1}$ e $50 \mu g.L^{-1}$) quanto sem fortificação e o branco preparado em água destilada tanto fortificado quanto sem fortificação na mesma concentração da amostra foram utilizadas para avaliação da remoção dos compostos orgânico. Os ensaios foram realizados utilizando-se cloro, na forma de $NaClO$ como pré-oxidante e desinfetante (ao final do tratamento) e $Fe_2(SO_4)_3$ como coagulante. Além disso, foram realizados ensaios com carvão ativado em pó em concentração de $20 mg.L^{-1}$. São os valores normalmente utilizados nas estações de tratamento para águas com essa qualidade (WESTERHOFF *et al.*, 2005). Antes do uso o CAP foi hidratado em água ultrapura e seco em estufa por 24h.

O pH da água foi monitorado em todos os procedimentos dos ensaios de jarros foi monitorado e, após a adição do pré-oxidante, a água foi deixada sob forte agitação (250 rpm) por 10 min. O coagulante foi então adicionado, e, após esta etapa, a água permaneceu sob agitação de 220 rpm por um período de 1 min (mistura rápida), seguida de 40 rpm por 10 min (1ª fase da floculação), mais 10 min a 30 rpm (2ª fase da floculação) e, consecutivamente, a 15 rpm por mais um período de 10 min (mistura lenta). Após o

período destinado a coagulação-floculação, as amostras permaneciam sedimentando por 30 min, sem agitação nenhuma. Decorrido o período de sedimentação, o sobrenadante foi submetido à filtração em filtros qualitativos (0,8 – 8 μm). Após cada etapa do tratamento foram feitas medidas de cor, turbidez, absorção em $\text{UV}_{\lambda_{254} \text{ nm}}$ de acordo com os procedimentos descritos no item 4.4. Ao final do ensaio, foram realizadas medidas para determinação de cloro residual e retiradas de alíquotas para determinação de amoxicilina, cafeína e interferentes endócrinos por LC-DAD e LC-MS/MS. As amostras provenientes dos ensaios utilizando amostras fortificadas com os analitos em concentração de $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ foram analisadas diretamente e aquelas provenientes dos ensaios utilizando amostras fortificadas com os analitos em concentração de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ foram concentradas a $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (1:1, v:v) utilizando *speedvac*.

Os ensaios de otimização foram realizados apenas uma vez, com triplicatas das leituras de cor, turbidez, absorção em $\lambda_{254\text{nm}}$. Os resultados apresentados são as médias dessas três leituras. Os experimentos para avaliação da remoção dos compostos orgânicos foram realizados da seguinte forma utilizando os 6 jarros do equipamento: branco de água destilada, branco fortificado, duplicata de amostra e duplicata de amostra fortificada. Foram realizadas triplicatas das leituras de cor, turbidez, absorção em $\lambda_{254 \text{ nm}}$ e das análises por LC-DAD e LC-MS/MS. Os gráficos são apresentados em termos das médias dos resultados encontrados para essas análises. A Figura 6 apresenta a realização do ensaio de jarros.

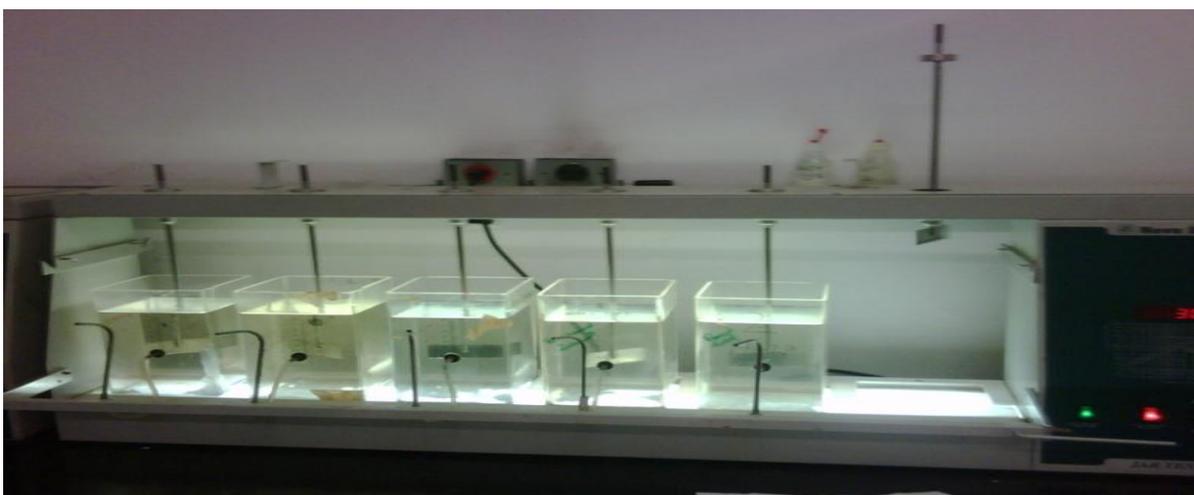


Figura 6. Foto da realização do ensaio de jarros

4.6.1. Análise estatística dos dados

A análise estatística dos dados foi feita utilizando o software Prism 5.0. Os dados de cada etapa (inicial, pré-cloração, coagulação-floculação-sedimentação, final) foram comparados pela análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni.

5. Resultados e Discussão

5.1. Caracterização físico química das amostras

O pH das amostras coletadas foi determinado cerca de 2 horas após a coleta e das amostras sintéticas cerca de 30 min após o preparo das soluções. Os valores encontrados encontravam-se com valores entre 6,5 e 7,0 dentro da faixa para as águas naturais de superfície, em geral, entre 6,0 e 9,0 (BRASIL,2005). Os resultados de caracterização físico química das amostras está representado na Tabela 9. Os valores encontrados encontram-se dentro do estabelecido pela Resolução CONAMA 357 do Ministério do Meio Ambiente para águas classe 2, ou seja, que podem ser destinadas ao abastecimento público após tratamento convencional (BRASIL, 2005) que é o objetivo do trabalho.

Tabela 9. Características físico-químicas das amostras sintéticas e da amostra coletada no reservatório do Guarapiranga

	CONAMA 357	5 mg.L ⁻¹	20 mg.L ⁻¹	Reservatório Guarapiranga
Turbidez	Até 100 NTU*	3,6 NTU	6,1 NTU	3,8 NTU
pH	6,0 – 9,0	7,1	6,9	7,6
Absorção UV_{254nm}	--	0,123	0,573	0,116
COT		3,23	4,1	4,6
Cor	Até 75 mg Pt-Co/L	29,8 mg Pt-Co/L	33,8 mg Pt-Co/L	46

*NTU – Unidade nefelométrica de turbidez

A determinação de turbidez permite evidenciar alterações na água. Uma turbidez alta (acima de 100 NTU) faz com que as partículas em suspensão reflitam a luz, fazendo com não chegue aos organismos aquáticos. Relata-se que as partículas suspensas podem servir de proteção contra a ação de desinfetantes a vírus e bactérias que podem alorjar-se nelas. Dessa forma, a turbidez passa a ser considerada também sob o ponto de vista sanitário (VAZ et al., 2010) e por isso é considerada um padrão de qualidade da água. A cor nas águas pode suprimir os processos fotossintéticos nos cursos d'águas e ser resultado dos processos de decomposição da matéria orgânica dissolvida. Até recentemente não eram associados inconvenientes sanitários à presença de cor na água, porém passou a chamar atenção depois da constatação de que os materiais dissolvidos, causadores da cor, são precursores de substâncias potencialmente carcinogênicas (ZHAO et al., 2012).

As medidas de carbono orgânico total e absorção em $UV_{\lambda 254nm}$ são parâmetros de monitoramento da concentração de compostos orgânicos presentes em águas naturais que indicam não somente o potencial da fase líquida para formação de THM's, mas também o sucesso do processo de coagulação responsável pela remoção de precursores dos subprodutos de desinfecção (FERREIRA FILHO E SAKAGUTI, 2008; FERREIRA FILHO E MARCHETTO, 2006).

5.2. Método analítico

5.2.1 Otimização de metodologia analítica por LC-DAD e LC-MS para determinação de amoxicilina, cafeína, bisfenol A, 17 α etinilestradiol e nonilfenol em amostras de água sintética

Inicialmente, o método desenvolvido por Montagner e Jardim e publicado em 2011 foi avaliado para separação dos analitos (Método 1, Tabela 7). O método utilizava coluna Luna C₁₈ Phenomenex® e consistia de gradiente binário de acetonitrila e água acidificada (pH 3,0) com a proporção de acetonitrila variando de 10% a 90% em 30 min. Em seguida, durante 5 min essa proporção aumenta para 92% e em 2 min para 95%. Finalmente, essa proporção diminui de 95 para 10% de acetonitrila nos últimos 3 min sendo mantida dessa maneira por mais 5 min totalizando um total de 45 min de análise (Tabela 10). O longo tempo de análise se justifica pelo fato de se tratar de compostos de diferentes classes com propriedades químicas diferentes e a possibilidade de permitir a separação de produtos de degradação que pudessem ser formados ao longo dos processos de tratamento. O cromatograma obtido para a separação dos compostos por essa metodologia está representado na Figura 7.

Tabela 10. Gradiente binário utilizado para separação cromatográfica de cafeína, AMX e interferentes endócrinos em coluna Luna C₁₈ Phenomenex® com detecção por DAD

Tempo (min)	%Acetonitrila
0	10
30	90
35	92
37	95
40	5
45	5

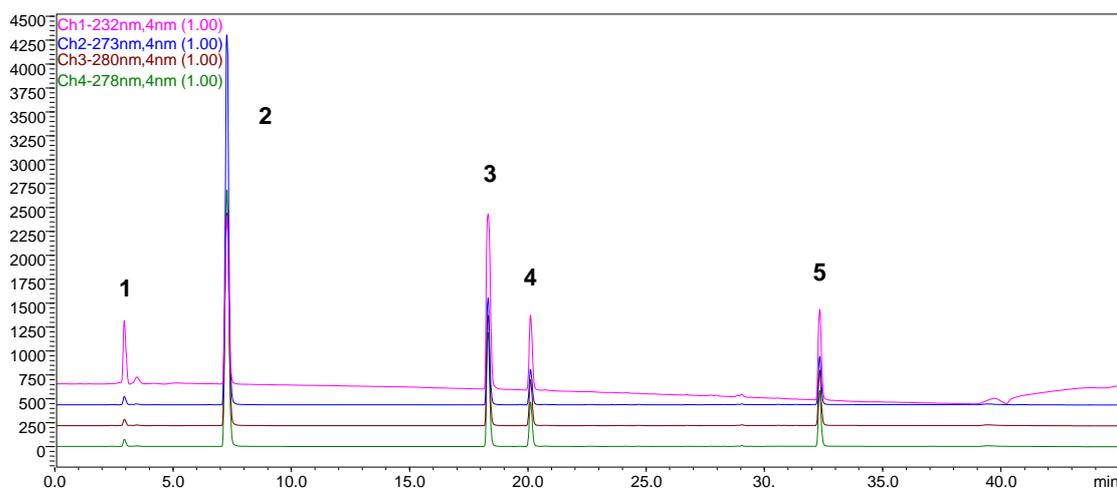


Figura 7. Cromatograma obtido nos comprimentos máximos de absorção dos compostos de interesse: **(1)** Amoxicilina, 232 nm; **(2)** Cafeína, 273 nm **(3)** Bisfenol A; 278 nm **(4)** 17 α etinilestradiol; 280 nm **(5)** 4-nonilfenol, 278 nm utilizando coluna Luna C₁₈ a 30 °C com gradiente binário de acetonitrila e água acidificada (pH 3,0)

A determinação empregando o DAD possibilita a identificação no cromatograma do pico referente ao analito de interesse pelo espectro de absorção no UV característico de cada composto. A Figura 8 apresenta os espectros de absorção de cada composto com o respectivo $\lambda_{\text{máx}}$ utilizado em todas as análises por LC-DAD.

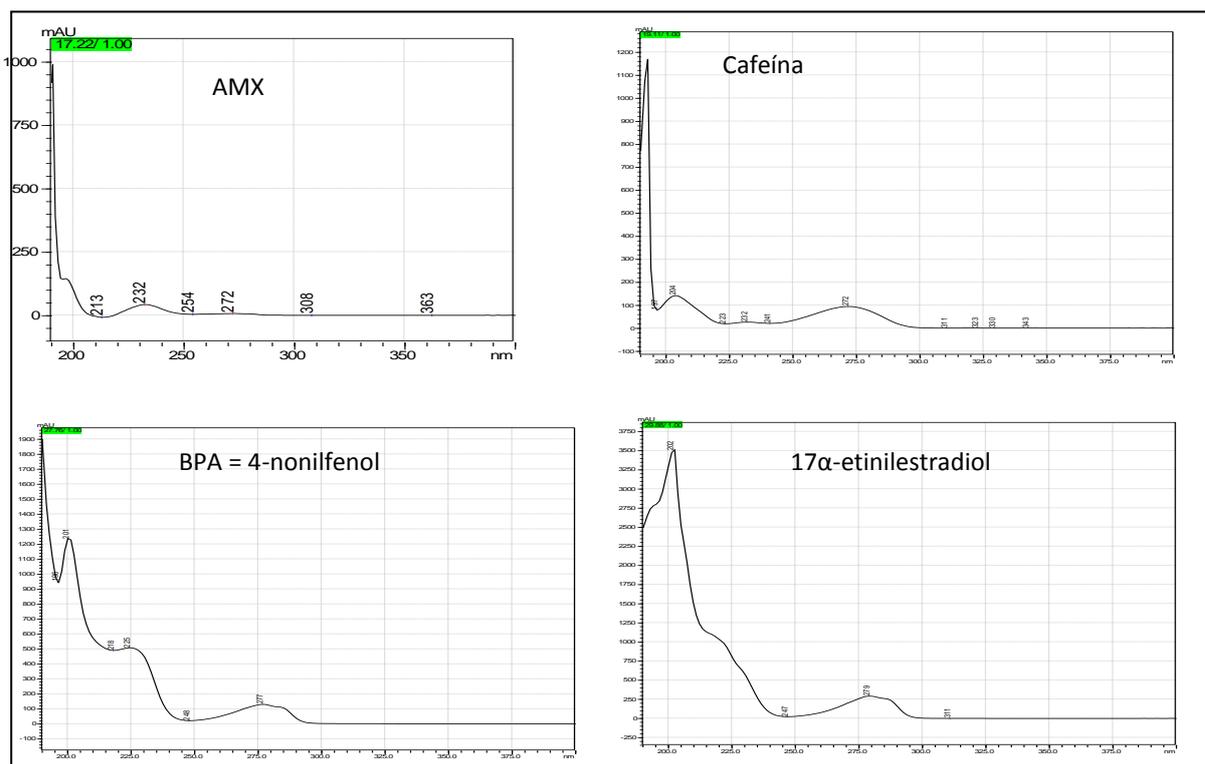


Figura 8. Espectros de absorção no UV para a amoxicilina, cafeína e interferentes endócrinos

Esse método foi adaptado em razão do baixo tempo de retenção da amoxicilina que é mais polar do que os demais compostos avaliados. Observou-se também que não havia separação entre picos próximos com absorção em 232 nm que poderiam ser possíveis produtos de degradação desse composto. O primeiro passo dessa otimização foi a troca do solvente de fase móvel para metanol e posteriormente a utilização das colunas Polar RP Phenomenex® e Hidro RP Phenomenex® que melhoram a retenção de compostos polares suportando maiores proporções de água ou tampão. Na separação utilizando coluna Polar RP Phenomenex® (método 2, Tabela 7), a amoxicilina continuou apresentando baixa retenção e os picos referentes aos demais compostos apresentavam baixa pureza de pico, calculada pelo software LabSolutions (Figura 9).

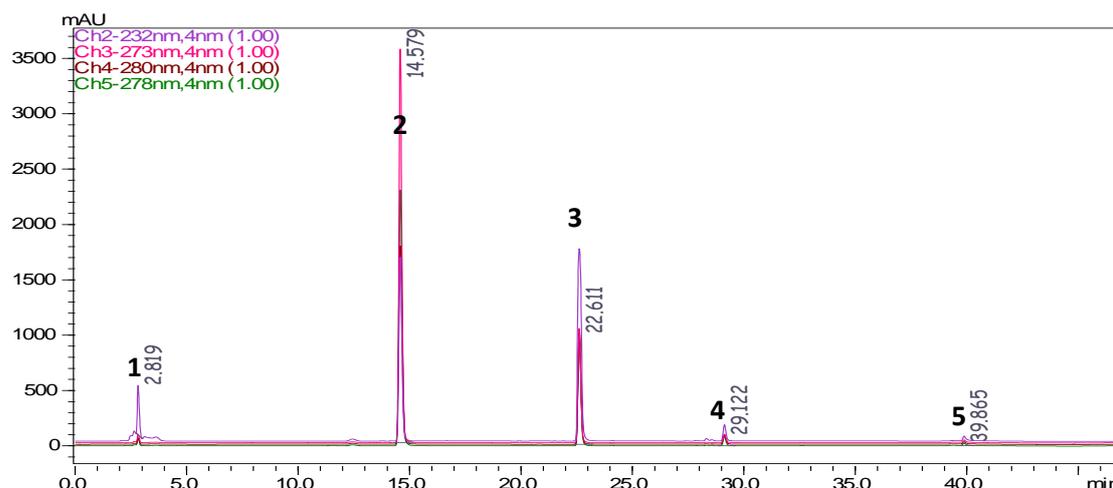


Figura 9. Cromatograma obtido nos comprimentos máximos de absorção dos compostos de interesse nos comprimentos máximos de absorção dos compostos de interesse: **(1)** Amoxicilina – Tr 2,8 min, 232 nm **(2)** Cafeína – Tr 14,6 min, 273 nm **(3)** Bisfenol A – Tr 22,6 min, 278 nm **(4)** 17 α -etilestradiol – Tr 29,122 min, 280 nm **(5)** 4-nonilfenol – Tr 39,9 min, 278 nm utilizando coluna PolarRP a 30 °C com gradiente binário de acetonitrila e água acidificada (pH 3,0)

A coluna Hidro RP Phenomenex® foi testada (método 3, Tabela 7) com gradiente binário (Tabela 11) composto por metanol e água acidificada com ácido fórmico (pH 3,0). A temperatura da coluna foi mantida a 30°C durante toda a análise. O ácido de escolha foi o fórmico por ser volátil e adequado ao acoplamento com espectrometria de massas.

Tabela 11. Gradiente binário utilizado para separação cromatográfica de cafeína, amoxicilina e interferentes endócrinos em coluna Hidro RP Phenomenex® com detecção por DAD

Tempo (min)	%MeOH
0	5
5	5
32	90
35	95
40	5
45	5

A conformidade do sistema cromatográfico foi verificada para esse método. Os parâmetros: tempo de retenção (Tr), comprimento de onda máximo (λ), fator de retenção (k'), resolução (R) considerando o pico de interesse e o pico anterior mais próximo e fator alargamento (Tf) foram verificados para separação dos compostos em uma solução 200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ usando o detector DAD. A análise cromatográfica foi repetida três vezes e as variações nos tempos de retenção dos compostos não ultrapassou 0,2 min e, no comprimento de

onda máximo dos compostos, quando houve variação, estas não foram maiores do que 1 nm. Os compostos foram analisados nos cromatogramas obtidos em comprimento de onda igual ao λ máximo característico de cada um. Houve separação completa e o fator de retenção condiz com os tempos de retenção obtidos. Os valores do fator alargamento estiveram entre 1,2 para o etinilestradiol e 2,5 para a cafeína. A Figura 10 apresenta o cromatograma representativo dessa análise.

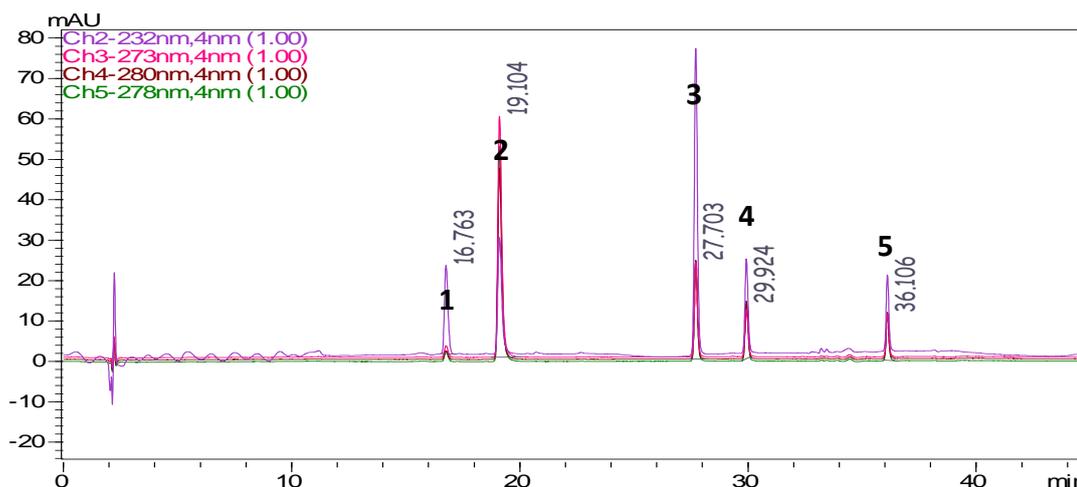


Figura 10. Cromatograma obtido nos comprimentos máximos de absorção dos compostos de interesse nos comprimentos máximos de absorção dos compostos de interesse: **(1)** Amoxicilina – Tr 2,8 min, 232 nm **(2)** Cafeína – Tr 14,6 min, 273 nm **(3)** Bisfenol A – Tr 22,6 min, 278 nm **(4)** 17 α -etinilestradiol – Tr 29,122 min, 280 nm **(5)** 4-nonilfenol – Tr 39,9 min, 278 nm utilizando coluna Hidro RP Phenomenex® a 30 °C com gradiente binário de acetonitrila e água acidificada (pH 3,0)

Tabela 12. Verificação da conformidade do sistema cromatográfico

	Tr	λ	Tf	R	k'
Amoxicilina	16.7	232	1.403	-	0,293
Cafeína	19.1	273	2.465	3.035	0,729
Bisfenol A	27.7	278	1.383	14.107	1,898
17α etinilestradiol	29.9	280	1.294	6.591	2,18
4-nonilfenol	36.1	278	1.356	46.791	4,116

As concentrações utilizadas para a construção das curvas analíticas foram: 5, 10, 50, 100, 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Foram realizadas 3 leituras de cada ponto (n=3) das curvas e a partir dos dados obtidos, foram processados os gráficos de linearidade para cada composto estudado, demonstrando a inclinação das retas, utilizando o programa PRISMA 5.0. A

Figuras de 11 a 15 mostram os gráfico de linearidade para amoxicilina, cafeína, bisfenol A, 17 α -etinilestradiol e 4-nonilfenol.

Os desvios padrão relativos calculados ficaram abaixo de 2% para todos os pontos da curva variando entre 0,14 e 1,04. Na Tabela 13 são exibidas as equações das retas para os gráficos da amoxicilina, cafeína, 17 α -etinilestradiol e 4-nonilfenol. Os coeficientes de determinação (r^2) também são apresentados e segundo a Resolução 899/2033 da ANVISA, correlações (R) 0,99 e (r^2) são aceitáveis. Assim, é possível afirmar que a linearidade do método é satisfatória.

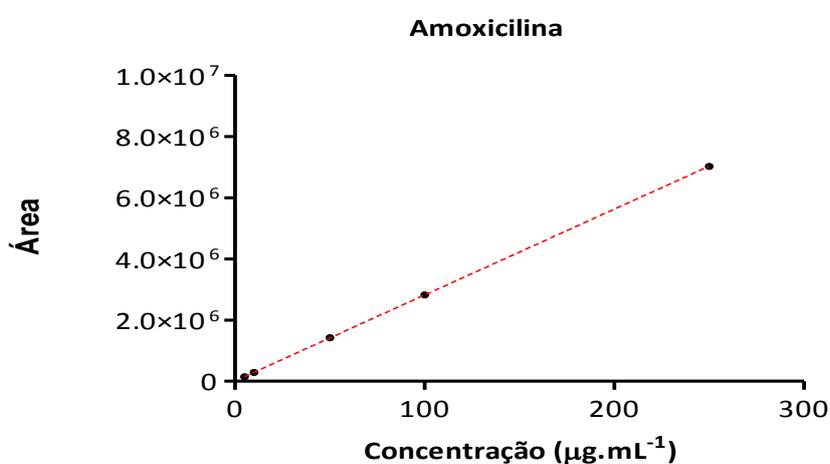


Figura 11. Gráfico de linearidade para a amoxicilina

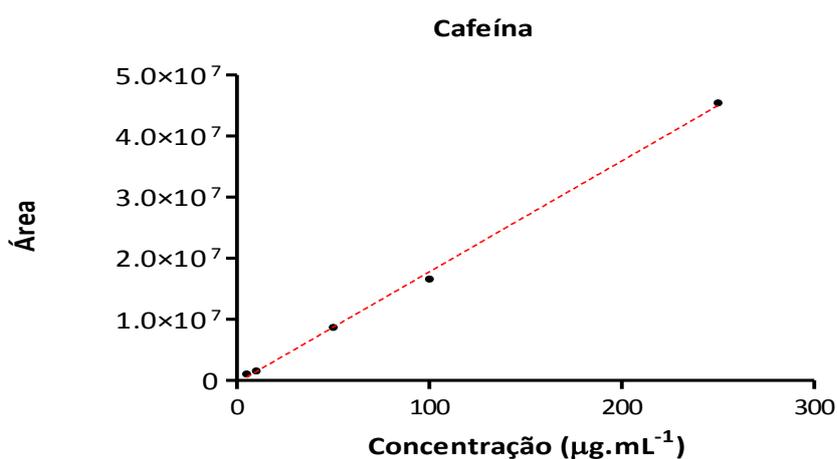


Figura 12. Gráfico de linearidade para a cafeína

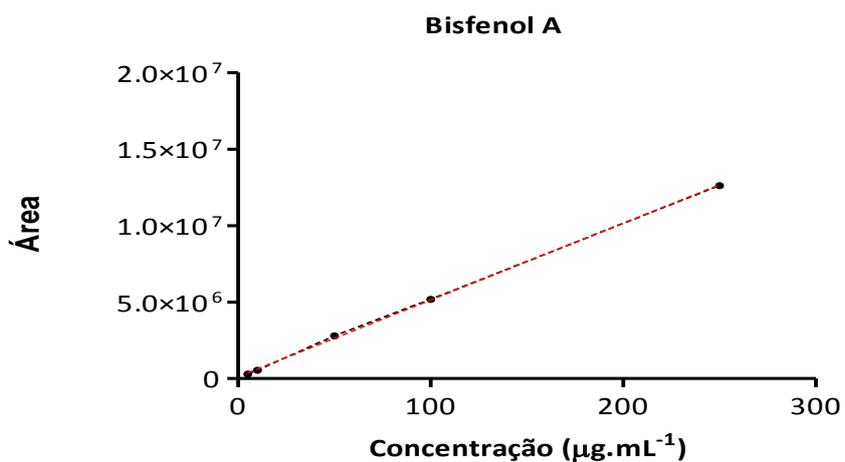


Figura 13. Gráfico de linearidade para o bisfenol A

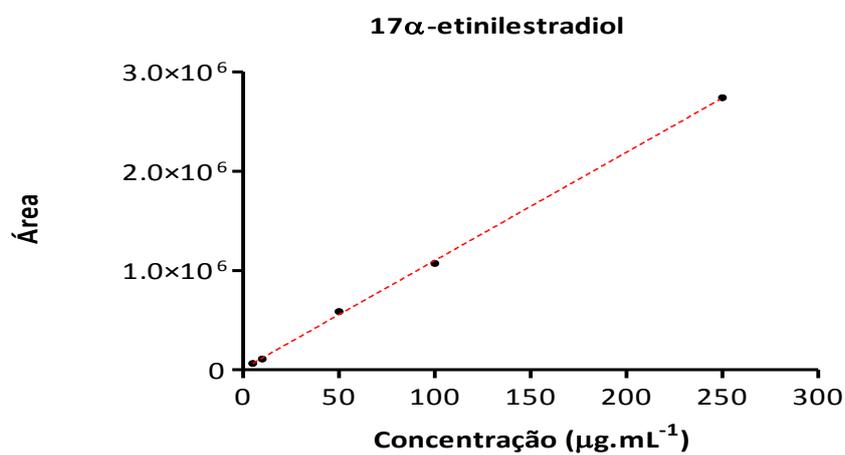


Figura 14. Gráfico de linearidade para o 17 α etinilestradiol

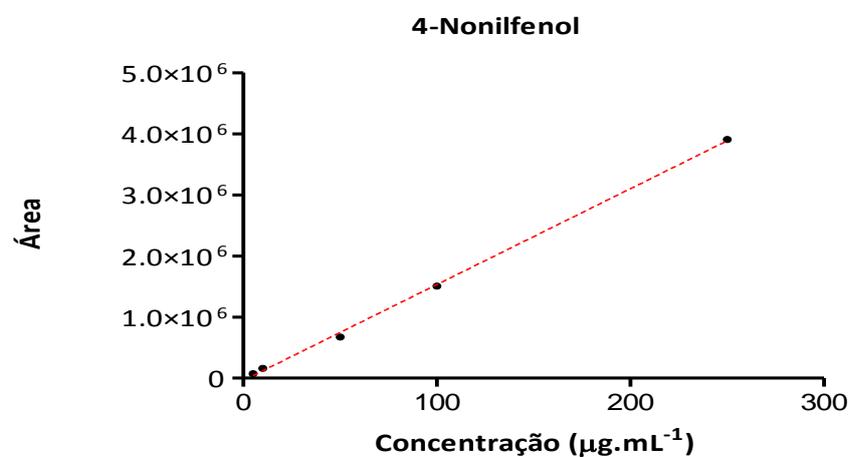


Figura 15. Gráfico de linearidade para o 4-nonilfenol

Tabela 13. Equações das retas e coeficientes de determinação do estudo de linearidade do método para determinação dos analitos por LC-DAD

Analito	Equação da reta	r^2
Amoxicilina	$y = 28063x + 8315,1$	1,00
Cafeína	$y = 18152x - 39400$	0,9987
Bisfenol A	$y = 50117x + 128589$	0,9995
17 α -etinilestradiol	$y = 16302x + 17359$	0,9997
4-nonilfenol	$y = 15669x - 36347$	0,9992

Por estarem presentes em baixas concentrações em matrizes ambientais que podem ser complexas, os acoplamentos da cromatografia a líquido com detecção por diferentes estágios de espectrometria de massas torna-se necessário. Dessa forma, foram testados gradientes de separação que se adequassem a detecção em modo de ionização positivo e negativo de ionização por *electrospray*. Uma mistura de metanol e ácido fórmico e de metanol com acetato de amônio foi testada como fase móvel em diferentes proporções. Concentrações de metanol acima de 15% no início da análise sem a utilização de ácido fórmico não resultou na obtenção de picos simétricos da AMX e da cafeína. Por outro lado, proporções de ácido fórmico acima de 0,1% mesmo que no início da análise não favoreceram a ionização em modo negativo dos interferentes endócrinos (BPA, 17 α -etinilestradiol e 4-nonilfenol). Essas análises foram realizadas em scan de 50 a 500 m/z até que um gradiente de separação adequado fosse obtido. A Figura 16 apresenta o cromatograma relativo a tentativa inicial de separação dos analitos.

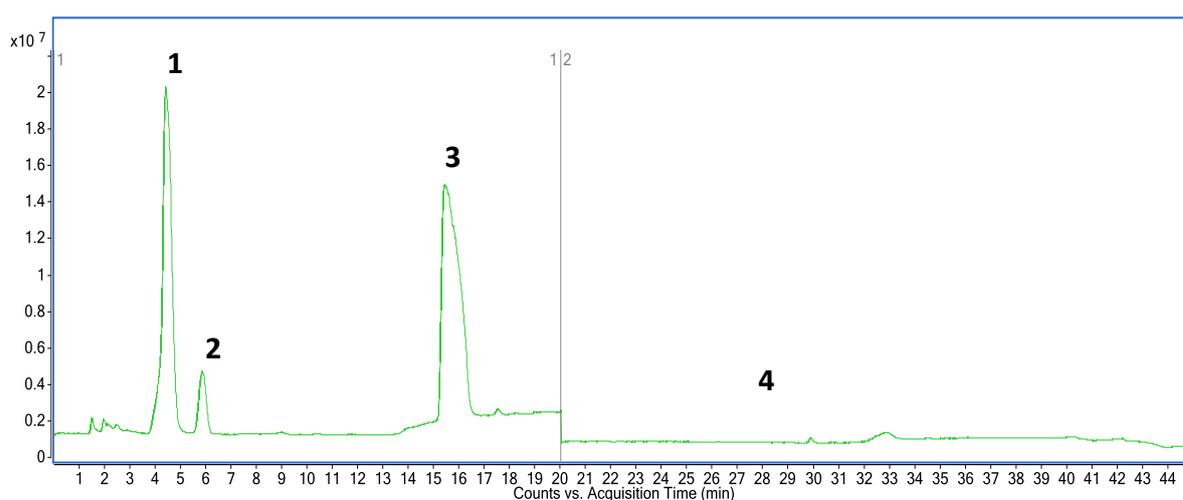


Figura 16. Cromatograma de separação da AMX (1), ácido amoxilóico (2) e cafeína (3) em modo positivo de ionização por *electrospray* e interferente endócrinos (4) que deveriam ter sinal a partir de 20 min em modo negativo de ionização por *electrospray*, scan 50-500 m/z

O método 4 da Tabela 7 foi então otimizado. A melhor separação foi obtida com gradiente que consistia em mistura A e B conforme descrito na Tabela 14 e o gradiente de separação encontra-se descrito na Tabela 15. O cromatograma obtido nessa análise está representado na Figura 17.

Tabela 14. Composição da fase móvel para análise dos analitos por LC-QqQ

A	Metanol: 0,05% Ác. Fórmico (15:85)
B	Acetato Amônio, 5 mMol.L ⁻¹ , pH 7,5:MeOH (20:80)

Tabela 15. Gradiente binário utilizado para separação cromatográfica de cafeína, AMX e interferentes endócrinos com detecção por espectrometria de massas

Tempo (min)	% B
0	0
5	0
32	100
35	100
40	0
45	0

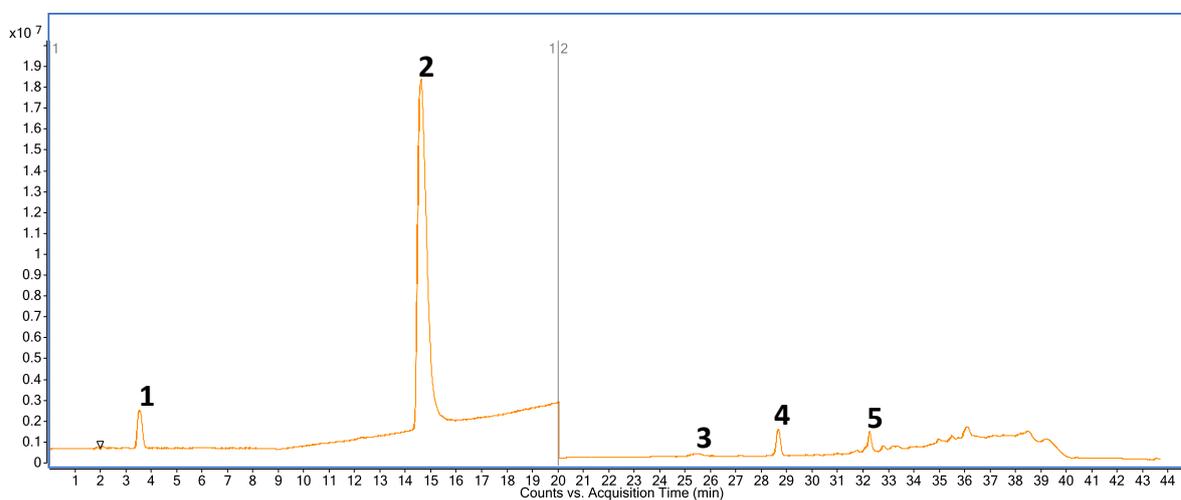


Figura 17. Cromatograma de separação de AMX (1) Amoxicilina (2) Cafeína em modo positivo de ionização (3) BPA (4) 17 α -etinilestradiol (5) 4-nonilfenol, em modo negativo de ionização por eletrospray, scan 50-500 m/z.

Para cada pico cromatográfico foi obtido o espectro de massas em scan de 50-500 m/z. Os íons $[M+H]^+$ foram observados nos espectros de massas da cafeína (195 m/z), representado na Figura 18, e da amoxicilina (366 m/z). No espectro de massas da

amoxicilina, representado na Figura 19 ainda se observa o íon de 349 m/z que corresponde a perda de NH_3 , característica dessa molécula (LAMM et al., 2009).

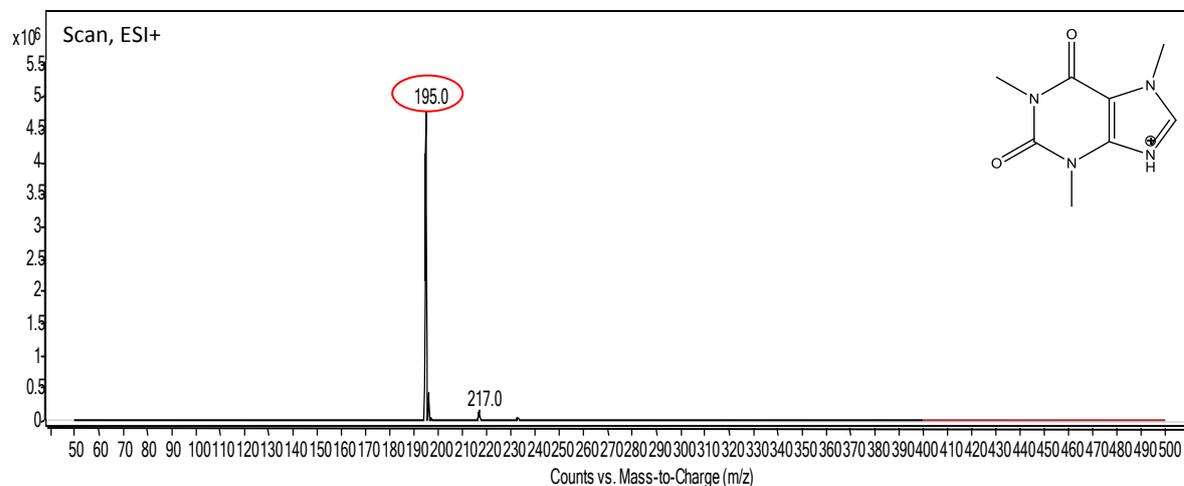


Figura 18. Espectro de massas da cafeína (Tr 14,2 min), $[\text{M}+\text{H}]^+$ 195 m/z, ESI-QqQ em modo positivo de ionização

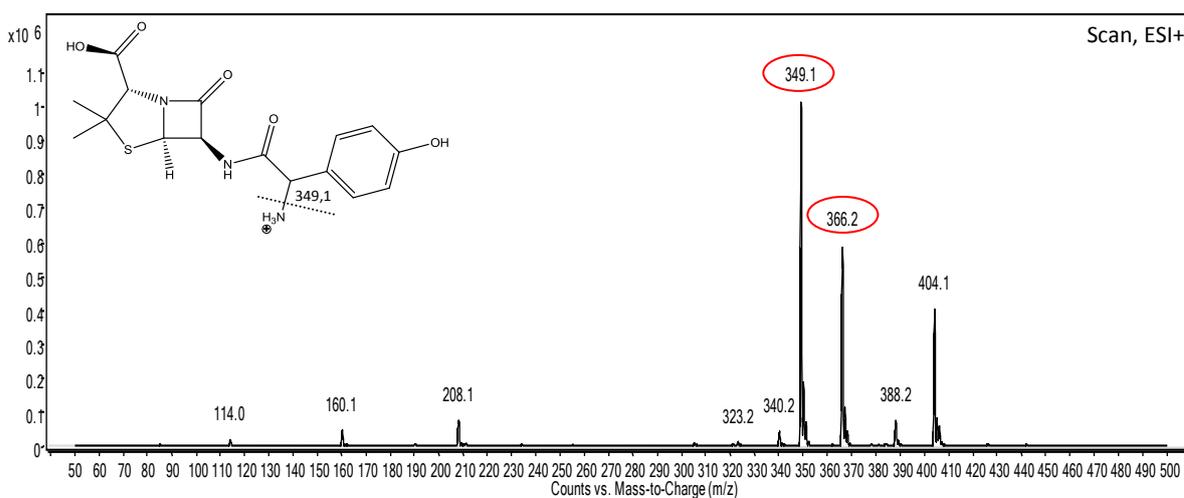


Figura 19. Espectro de massas da amoxicilina (Tr 3,4 min), ESI-QqQ em modo de ionização positivo; $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 366 m/z e $[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_3]^+$ = 349 m/z

Devido à instabilidade do anel β -lactâmico que degrada rapidamente mediante pequenas variações de pH, podem ser observados também picos referentes a produtos de degradação da amoxicilina tais quais representados na Figura 2. Esses produtos de degradação são caracterizados pelos íons de 340 m/z seguido da perda de NH_3 que leva ao íon 323 m/z referentes ao ácido penilóico como pode ser observado na Figura 20. É descrito na literatura que os produtos de degradação da amoxicilina obtidos em meio ácido ou básico são os mesmos, o que muda é a ordem em que eles são formados devido à

mudança no mecanismo de degradação (NÄGELE, 2005; LAMM *et al.*, 2009; PEREZ-PARADA, 2011). Tal fato foi comprovado em experimentos preliminares a este trabalho.

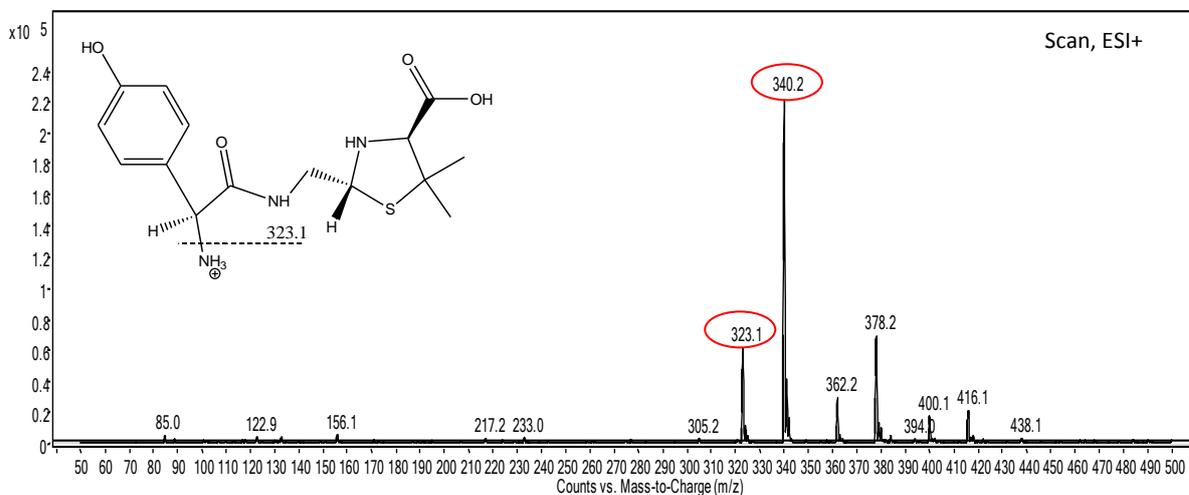


Figura 20. Espectro de massas do produto de degradação da amoxicilina, Tr 4,5 min ESI-QqQ em modo de ionização positivo

Outros íons observados de m/z 398 e 381 (Figura 21) são resultado da metilação da molécula de amoxicilina que ocorre devido a utilização de metanol como diluente e na fase móvel (GRUJIC *et al.*, 2008). Como não se trata de um degradado produzido em condições que possam ocorrer naturalmente no ambiente aquático este composto não será monitorado nas próximas etapas do trabalho.

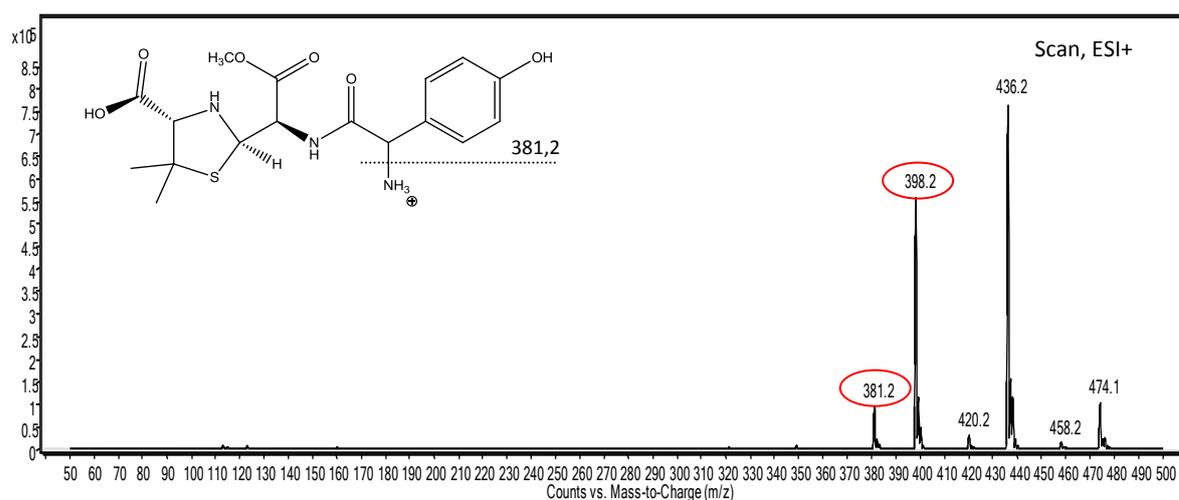


Figura 21. Espectro de massas do produto do metil-éster de amoxicilina, Tr 11,8 min, ESI-QqQ em modo de ionização positivo

Os interferentes endócrinos BPA, 17α -etinilestradiol e 4-nonilfenol foram identificados em modo negativo de ionização pelos respectivos íons $[M-H]^-$. Os espectros de massas dessas substâncias são representados nas Figuras 22 a 24.

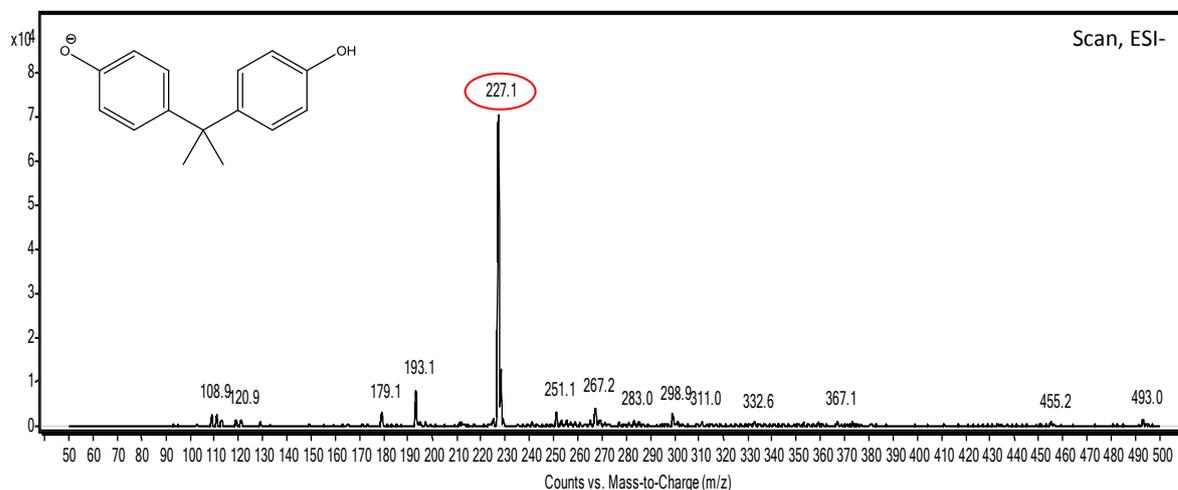


Figura 22. Espectro de massas do BPA (Tr 25,5 min), $[M-H]^- = 227$ m/z, ESI-QqQ em modo negativo de ionização

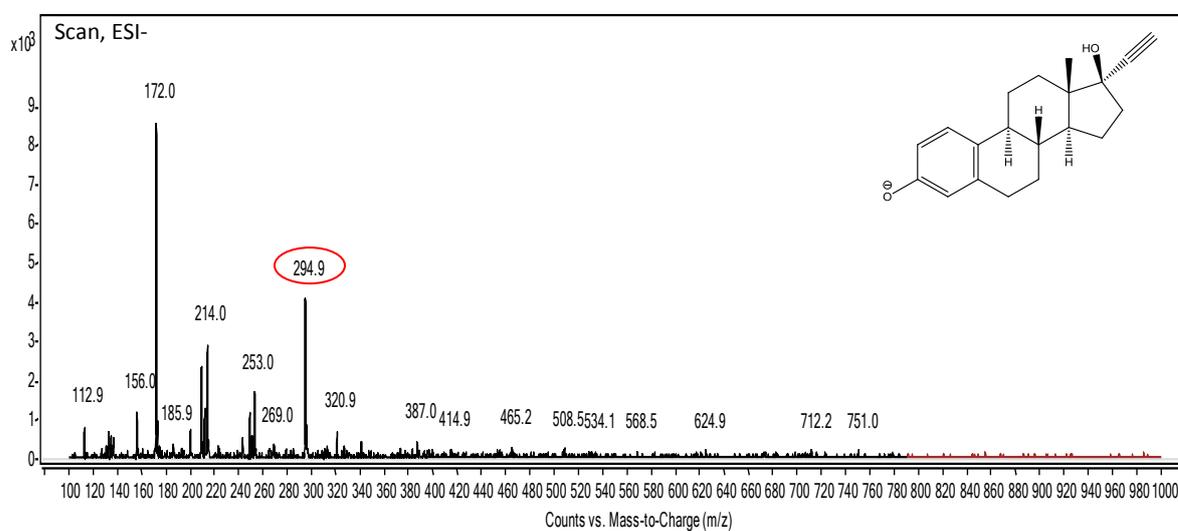


Figura 23. Espectro de massas do 17α -etinilestradiol (Tr 28,5 min), $[M-H]^- 295$ m/z, ESI-QqQ em modo negativo de ionização

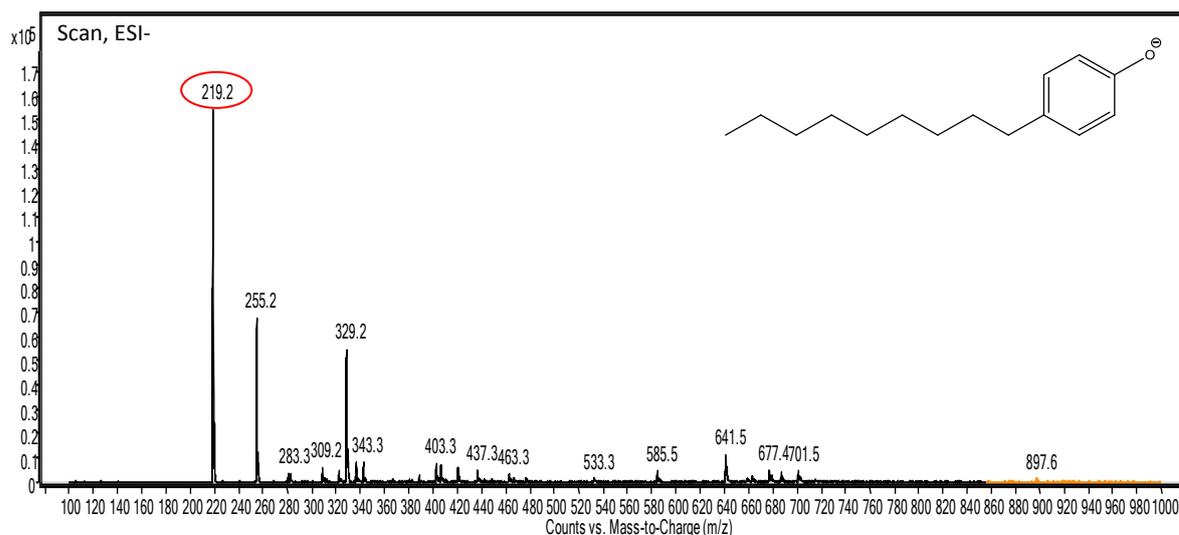


Figura 24. Espectro de massas do 4-nonilfenol, Tr 32 min, $[M-H]^-$ 295 m/z, ESI-QqQ em modo negativo de ionização

A utilização de mais de um estágio de espectrometria de massas (MS^n) permite o aumento da seletividade e sensibilidade do método possibilitando que limites de detecção mais baixos sejam alcançados já que transições específicas de cada composto são monitoradas. A otimização dos parâmetros para utilização do modo MRM foi inicialmente realizada, baseada no artigo (MAGI et al., 2010) através da injeção dos padrões individuais em concentração $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ dissolvidos em MeOH:Água (1:1, v/v) e confirmada pelo software Optimizer (Agilent MassHunter) que determina automaticamente as voltagens ótimas de *fragmentor* e energia de colisão para cada fragmento obtido. Essas condições ótimas foram confirmadas pelo método clássico (passo a passo). Os resultados são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Parâmetros de espectrometria de massas utilizados em modo MRM

Analito	Íon precursor	Íon produto	Energia de colisão	Fragmentor	Modo de ionização
Amoxicilina	366	349	0	70	Positivo
Ác. Penilóico	340	323	0	70	Positivo
Amoxicilina metil ester	398	160	0	70	Positivo
Cafeína	195	135	10	130	Positivo
Bisfenol A	227	212	13	138	Negativo
17 α -etinilestradiol	295	145	33	176	Negativo
4-nonilfenol	219	106	17	134	Negativo

A análise dos valores de *fragmentor* e energia de colisão obtidos para os interferentes mostra que condições mais energéticas do que as aplicadas para amoxicilina são necessárias para obtenção dos fragmentos necessários a caracterização dessas moléculas. O mecanismo de fragmentação desses compostos foi descrito em artigo publicado por MAGI e colaboradores em 2010 e está representado na Figura 25.

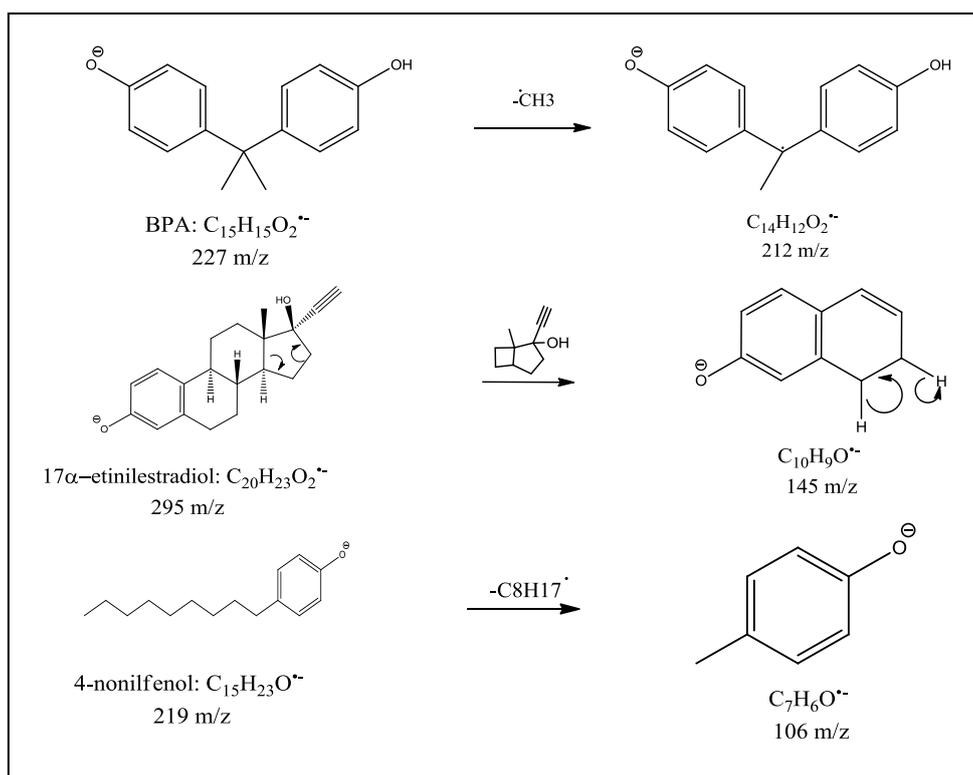


Figura 25. Mecanismos de fragmentação propostos para o BPA, 17 α -etinilestradiol e 4-nonilfenol propostos por Magi et al., 2010

Os demais parâmetros otimizados e apresentados na parte experimental seguiram os seguintes intervalos: capilar 3000-4500 V, gás de dessolvatação 250 – 350 °C e 9-12 L.min⁻¹, gás nebulizante 35-55 psi e gás de bainha 200 – 300 °C e 4 a 9 L.min⁻¹. Os valores finais (250 °C a 5 L.min⁻¹) foram escolhidos em termos de intensidade e estabilidade do sinal (durante a injeção da solução individual de cada padrão). A Figura 26 mostra a otimização dos valores de vazão e temperatura do gás de bainha. O gráfico foi construído com a média de 3 replicatas e os dados são apresentados em termos de intensidade relativa do sinal. As barras de erros não são apresentadas no gráfico, pois os desvios das medidas ficaram em torno de 0,5%. O cromatograma representativo da separação dos compostos com detecção em modo MRM é apresentado na Figura 27.

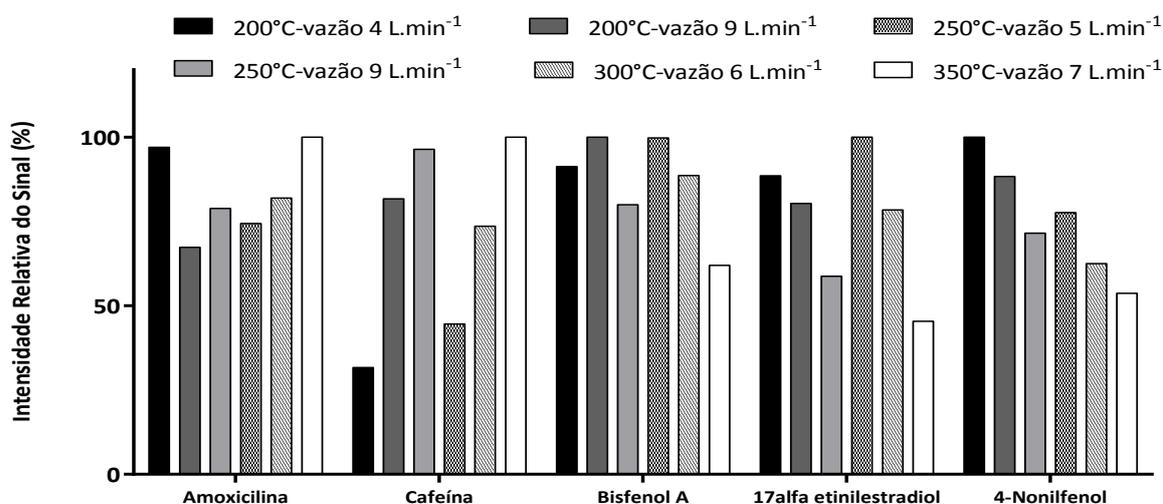


Figura 26. Otimização dos valores vazão e temperatura do gás de bainha

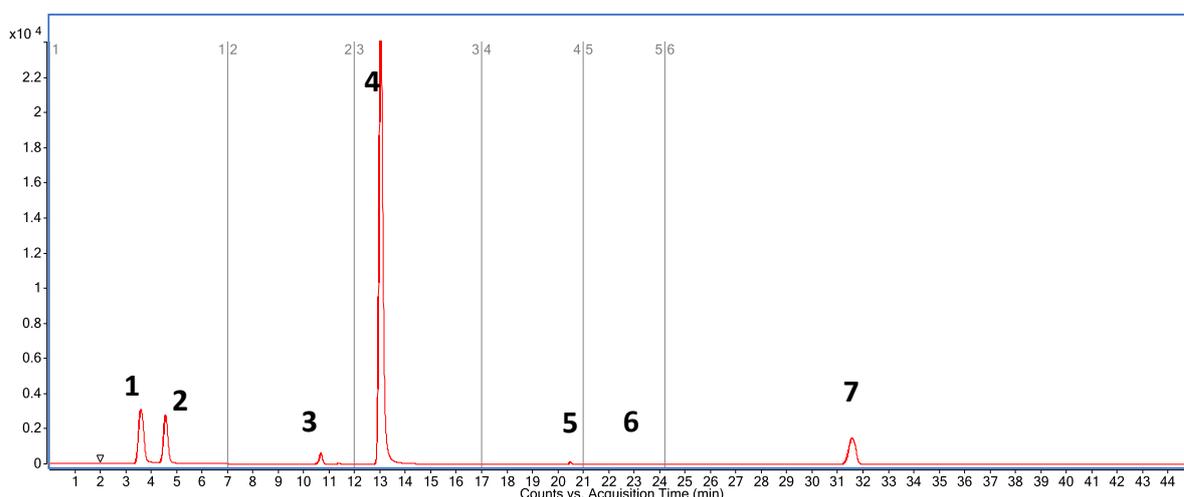


Figura 27. Cromatograma de íons totais da separação de (1) Amoxicilina, (2) Ác. Amoxilóico, (3) Amoxicilina metil éster, (4) Cafeína em modo positivo de ionização e (5) Bisfenol A (6) 17 α -etinilestradiol (7) 4-nonilfenol em modo negativo de ionização por *electrospray* em modo MRM das transições descritas na Tabela 15.

A partir dessa análise, diversas proporções entre as fases A e B foram testadas até que se reduzisse o tempo de análise para 20 min, sem que houvesse perda de intensidade no sinal de cada uma das transições monitoradas. A proporção da mistura B da fase móvel (Tabela 14) foi alterada para 90% de metanol. Essa mistura não foi utilizada por 5 min favorecendo a ionização em modo positivo e a retenção da amoxicilina utilizando apenas o componente A (metanol e ácido fórmico) da fase móvel. Em 1 min a proporção de B passa a 70% chegando a 100% em 3 min e sendo mantida dessa forma por 6 min. O gradiente retorna a proporção inicial em 2 min e são necessários mais 3 min para equilíbrio. O tempo

total de análise é de 20 min. O volume de injeção foi de 2 μ L e a coluna mantida a 30 $^{\circ}$ C durante toda a análise. Esse gradiente otimizado é apresentado na Tabela 17. Os cromatogramas representativos da separação obtida são representados na Figura 28 e na Figura 29.

Tabela 17. Gradiente Cromatográfico para separação dos analitos de interesse

Tempo (min)	%B
0	0
5	0
6	70
9	100
15	100
17	0
20	0

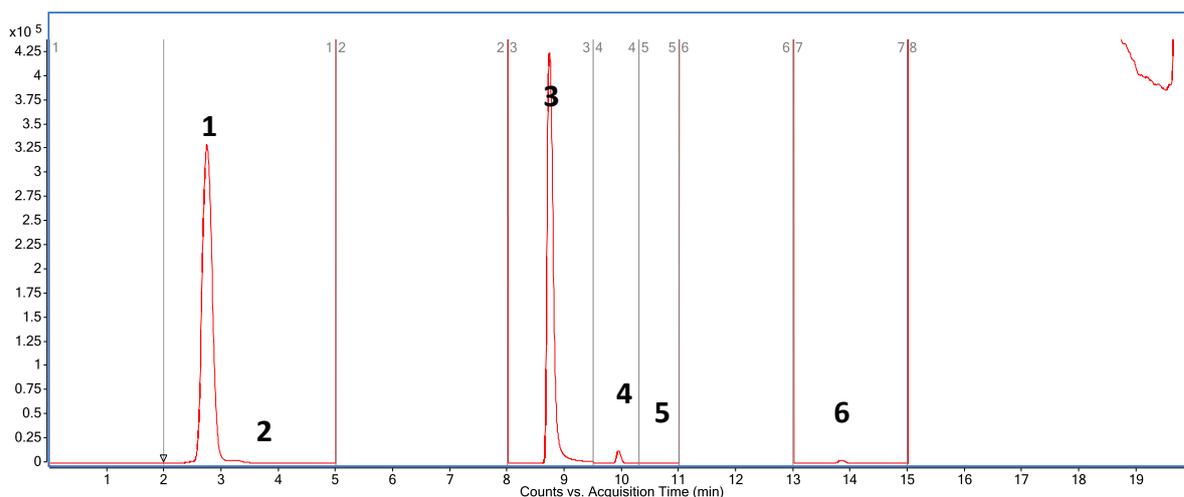


Figura 28. Cromatograma de íons totais da separação de (1) Amoxicilina (2) Ác. Amoxilóico (3) Cafeína em modo positivo de ionização por *electrospray* e (4) BPA (5) 17 α -etinilestradiol; (6) 4-nonilfenol em modo negativo de ionização *electrospray* utilizando gradiente da Tabela 17, detecção em modo MRM

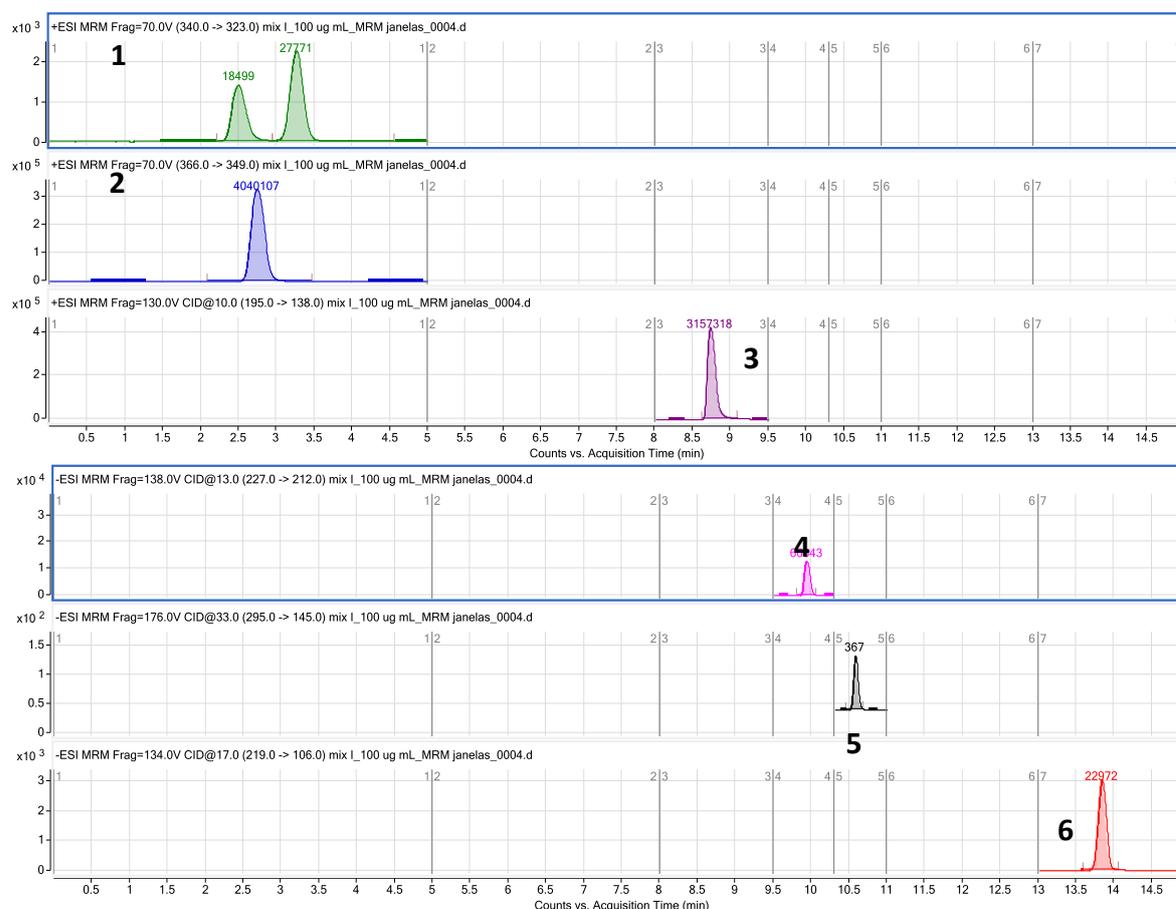


Figura 29. Cromatograma MRM da separação de **(1)** Ác. Amoxilóico - 340 m/z > 323 m/z **(2)** Amoxicilina – 366 m/z > 349 m/z **(3)** Cafeína - 195 m/z > 138 m/z em modo positivo de ionização por *eletrospray* e **(4)** BPA - 227 m/z > 212 m/z **(5)** 17 α -etinilestradiol – 296 m/z > 145 m/z; **(6)** 4-nonilfenol – 219 m/z > 106 m/z em modo negativo de ionização *eletrospray* utilizando gradiente da Tabela 6, detecção em modo MRM

A Figura 29 evidencia os picos referentes a transição 340 m/z > 323 m/z que se explica pela presença dos isômeros R e S do ácido amoxilóico nas soluções (PEREZ-PARADA, et al. 2011; NAGELE e MORITZ, 2005). Como a amoxicilina se degrada rapidamente com a abertura do anel β lactâmico, a presença desses compostos no ambiente aquático não representa risco à biota, mas pode ser usada como indicativo do aporte de efluentes contendo concentrações consideráveis de amoxicilina e outros medicamentos utilizados em terapia combinada.

As curvas analíticas construídas em termos da razão entre a área média de três leituras das concentrações estudadas (1, 10, 100, 100 ng.mL⁻¹, 100 e 200 μ g.mL⁻¹) e a área do padrão interno (amoxicilina (fenil ¹³C₆) e cafeína (trimetil ¹³C₃), para modo positivo e bisfenol-*d*₁₂ para o BPA em modo negativo) *versus* a razão entre suas concentrações

(padrão interno $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) resultaram em coeficientes de determinação adequados a métodos analíticos de acordo com a Resolução 899/2003 da ANVISA (BRASIL, 2003). Não foi possível a utilização do e bisfenol- d_{12} como padrão interno para análise de 17α -etinilestradiol e 4-nonilfenol. Os desvios padrões relativos de cada ponto das curvas são apresentados na forma de barra de erros nos gráficos de linearidade. Os limites de quantificação e detecção calculados são superiores aos obtidos com o método utilizando HPLC-DAD sendo mais adequado à análise de amostras com concentrações mais baixas desses analitos. Outra vantagem associada a técnica encontra-se na seletividade do modo MRM evitando que outros compostos interfiram na determinação dos analitos de interesse. As Figuras de 30 a 34 apresentam os gráficos de linearidade da AMX, cafeína, BPA, 17α -etinilestradiol e 4-nonilfenol e a Tabela 18 as figuras de mérito obtidas.

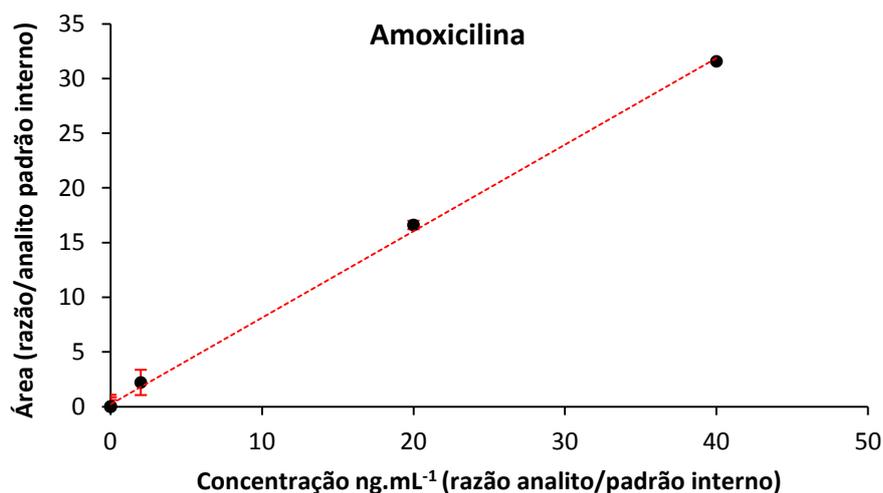


Figura 30. Gráfico de linearidade para a AMX

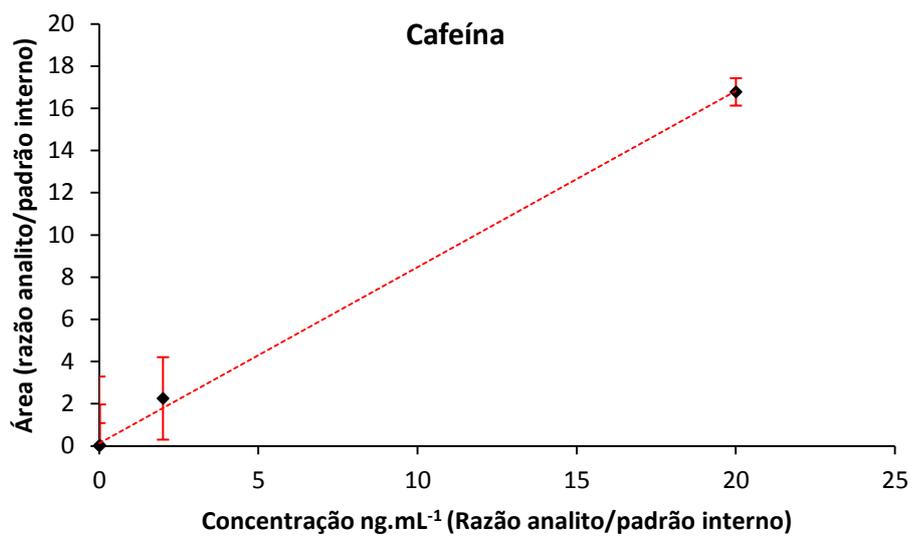


Figura 31. Gráfico de linearidade para a cafeína

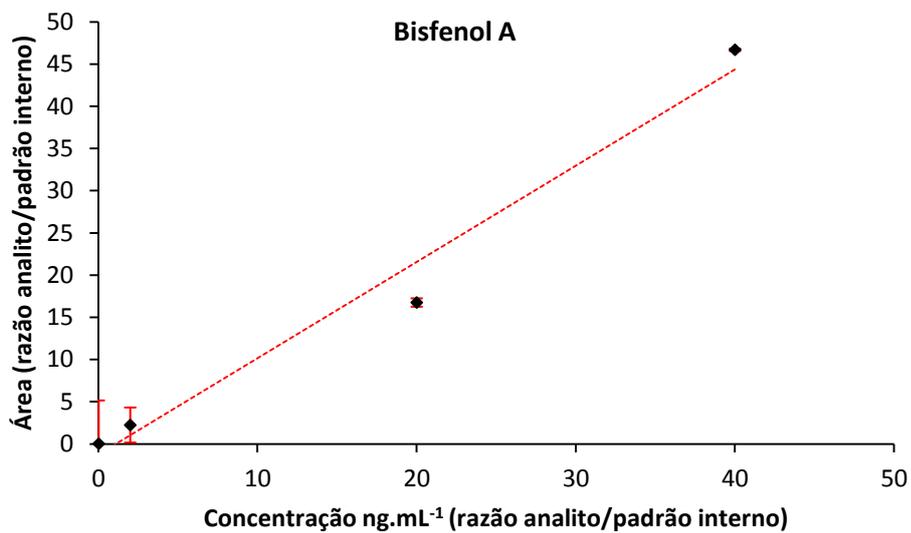


Figura 32. Gráfico de linearidade para o BPA

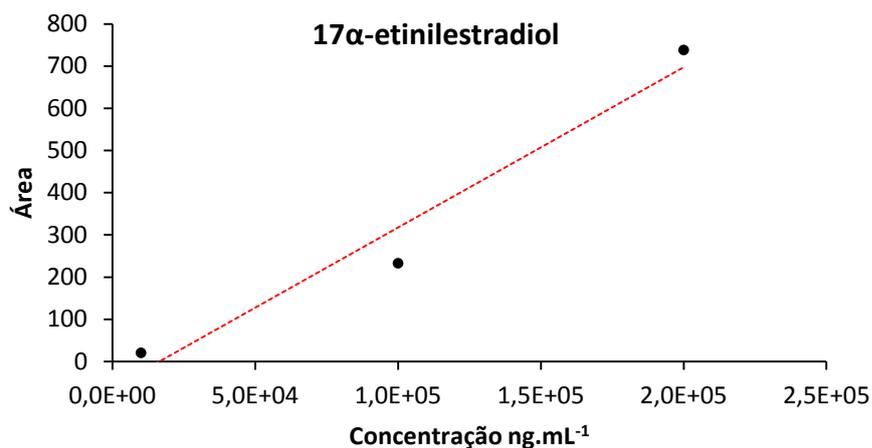


Figura 33. Gráfico de linearidade para o 17α-etinilestradiol

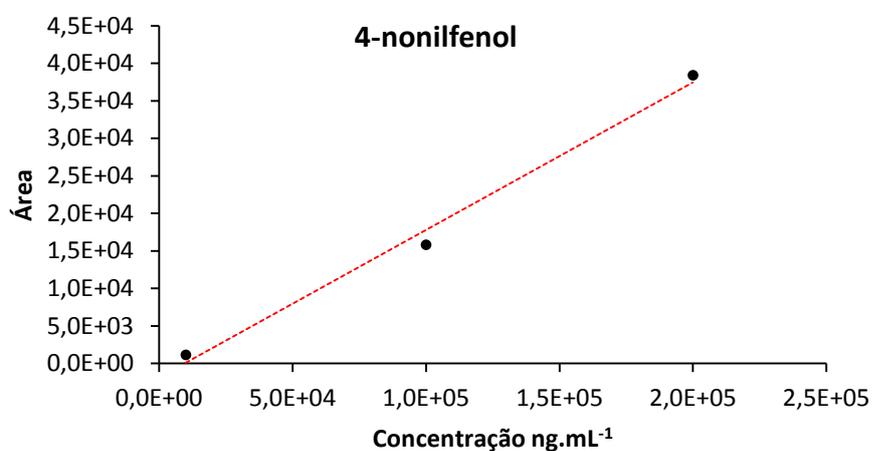


Figura 34. Gráfico de linearidade para o 4-nonilfenol

Tabela 18. Equações das retas, coeficientes de determinação, LD e LQ do estudo de linearidade do método para determinação dos analitos por LC-MS/MS

Analito	Equação da reta	r ²	LD	LQ
Amoxicilina	$y = 0,7911x + 0,2252$	0,9992	32,8*	110*
Cafeína	$y = 0,0008x + 0,1362$	0,9988	11,9*	40,0*
Bisfenol A	$y = 0,0011x - 1,2551$	0,9773	15,14**	47,8**
17α-etinilestradiol	$y = 0,0038x - 62,41$	0,9601	22,9**	70,28**
4-nonilfenol	$y = 0,1966x - 1867$	0,9916	77,8**	118,5**

*ng.mL⁻¹ **μg.mL⁻¹

5.2.2. Testes de Recuperação – Extração em fase sólida

A escolha do método mais adequado à concentração dos analitos foi realizado por LC-DAD. A capacidade de recuperação do método analítico, foi avaliada através da fortificação de amostras coletadas do Reservatório Guarapiranga em concentração $500 \mu\text{g.L}^{-1}$. Antes do procedimento de extração 1 L de amostra teve seu volume reduzido a aproximadamente 400 mL em liofilizador. O método que apresentou maior recuperação foi o método 1 da Tabela 8 utilizando cartuchos OASIS HLB (Waters) que contém 500 mg de fase sólida indicados para adsorver simultaneamente compostos polares e apolares do meio aquoso. Os cartuchos foram condicionados com 6 mL de metanol, 5 mL de água deionizada e 5 mL de água deionizada em pH 7,5. Em seguida, as amostras com pH ajustado a 7,5 com ácido fórmico e/ou hidróxido de amônio foram passadas pelo cartucho e secas sob vácuo por aproximadamente 15 min. A eluição foi realizada com 2 x 4 mL de metanol e o volume final seco em fluxo de N_2 e ressuspensas em 1 mL de $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (1:1, v/v). Antes da análise cromatográfica foram filtradas em membrana com poro $0,45 \mu\text{m}$. As recuperações obtidas variaram entre 65-90%. As amostras submetidas ao processo de SPE sem fortificação não resultaram em concentrações detectáveis de nenhum dos compostos estudados.

Volumes de 500 mL de água sintética (5 mg.L^{-1}) e de água destilada fortificadas com concentrações 50 ng.L^{-1} , $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ e de $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ foram utilizadas para avaliar a capacidade de extração dos analitos de interesse em diferentes concentrações. O procedimento de SPE foi o mesmo, mas o volume final de ressuspensão foi de 200 μL devido às concentrações utilizadas. Apesar das taxas de recuperação nessas concentrações serem baixas principalmente para amoxicilina e para o 4-nonilfenol, os resultados obtidos são similares para água destilada e para soluções de ácido húmico, e, associados às taxas de recuperação obtidas quando uma concentração mais alta dos analitos foi avaliada em amostras coletadas do Reservatório Guarapiranga comprovam que o método utilizado é capaz de eliminar possíveis interferentes da matriz sendo adequado para limpeza e extração de amostras ambientais. A Tabela 19 e a Tabela 20 resumem os resultados obtidos. Observa-se que recuperações mais altas foram obtidas quando amostras mais concentradas foram utilizadas.

Tabela 19. Testes de recuperação (%) em água destilada fortificada e solução de ácido húmico fortificada após extração em cartucho OASIS HLB e análise por LC-DAD

Analitos	Água destilada fortificada (500 µg.L ⁻¹)	Amostra reservatório guarapiranga fortificada (500 µg.L ⁻¹)
Amoxicilina	60	62
Cafeína	83	88
Bisfenol A	85	78
17α etinilestradiol	78	78
4-nonilfenol	60	71

Tabela 20. Testes de recuperação (%) em água destilada fortificada e solução de ácido húmico fortificada após extração em cartucho OASIS HLB e análise por LC-MS/MS

Analitos	Água destilada fortificada			Sol. ácido húmico 5 mg.L ⁻¹		
	50 ng.L ⁻¹	50 µg.L ⁻¹	500 µg.L ⁻¹	50 ng.L ⁻¹	50 µg.L ⁻¹	500 µg.L ⁻¹
Amoxicilina	10,7	0,02	1,0	23,4	14,8	10,26
Cafeína	-	40,1	72,0	65,5	65,16	74,84
Bisfenol A	-	17,6	61,0	84,7	48,61	62,34
17α etinilestradiol	-	43,9	93,2	80	82,15	96,83
4-nonilfenol	-	8	13,8	10,7	9,1	12,37

5.3 Ensaios de Jarros

5.3.1 Otimização dos parâmetros operacionais para realização dos ensaios de jarros

A eficiência dos processos de tratamento de água varia de acordo com a qualidade da água bruta. Como características como pH e quantidade de matéria orgânica podem variar sazonalmente, os parâmetros como a utilização de pré-oxidantes, tipo e concentração do coagulante e o pH ótimo para que ocorra o processo de coagulação são alterados de acordo com a qualidade da água que chega à estação. A presença de matéria orgânica natural e da liberação de subprodutos metabólicos de algas e demais microorganismos, e de elevadas concentrações de ferro e manganês levam a necessidade da utilização de um oxidante assim que a água chega a ETA (FERREIRA FILHO e MARCHETTO, 2006). Historicamente, o agente oxidante mais empregado em processos de tratamento de água tem sido o cloro, na forma de cloro gasoso (Cl₂), hipoclorito de sódio

(NaOCl) e hipoclorito de cálcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$). Neste trabalho, o oxidante utilizado foi o cloro na forma de hipoclorito de sódio.

Os agentes coagulantes comumente usados são cloreto férrico (FeCl_3), sulfato férrico clorado (FeClSO_4) e sulfato férrico [$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$] devido a possibilidade de se trabalhar em ampla faixa de pH resultado da insolubilidade dos hidróxidos formados. Neste trabalho, o coagulante utilizado foi o $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ e avaliado o pH ótimo de coagulação para este coagulante.

A escolha das faixas a serem testadas, do coagulante e oxidante utilizados neste trabalho foi baseada em relatos da literatura e em conversas com técnicos especializados realizadas durante visita a Estação de Tratamento do Alto da Boa Vista (ETA ABV) que recebe água aduzida do Reservatório do Guarapiranga em janeiro de 2012. As condições ótimas foram escolhidas de acordo com a maior porcentagem de remoção de cor e turbidez desde que os valores finais obtidos ficassem dentro dos padrões de potabilidade preconizados na Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011) que determina cor de até 15 mg Pt.Co^{-1} e turbidez de até 5 NTU para águas destinadas ao abastecimento público. A Tabela 21 apresenta os resultados otimizados e a Figura 35 um esquema da realização dos ensaios de otimização.

Tabela 21. Parâmetros otimizados para realização do ensaio de jarros

	Sol. ác. húmico 20 mg.L⁻¹	Sol. ác. húmico 5 mg.L⁻¹
Concentração de Cl^-	1 ppm	1 ppm
Tempo de Pré-oxidação	10 min	10 min
pH de coagulação	6-7	6-7
Concentração de [$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$]	23 mg.L ⁻¹	6 mg.L ⁻¹

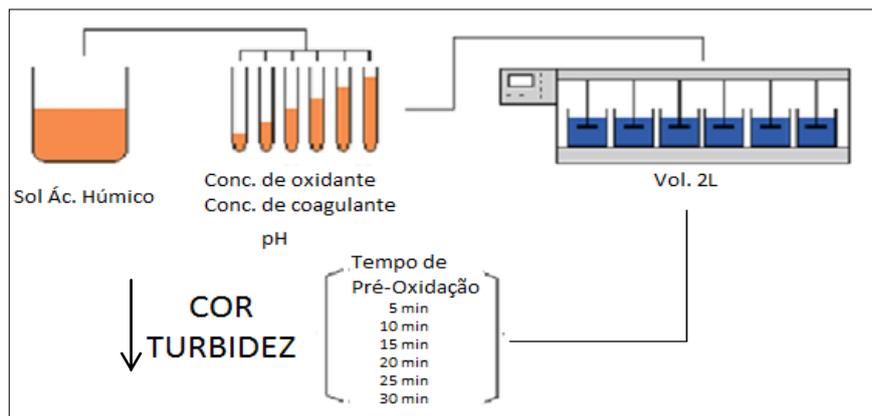


Figura 35. Representação esquemática dos ensaios de otimização dos parâmetros operacionais dos ensaios de jarros

5.3.2 Avaliação da remoção de AMX, cafeína, BPA, 17 α -etinilestradiol e 4-nonilfenol em amostras de água por tratamento convencional simulado através de ensaios de jarros

Estes ensaios foram conduzidos para se avaliar a eficácia de remoção dos compostos estudados frente ao processo de tratamento de água proposto no Brasil. A solução de ácido húmico utilizada encaixa-se nos parâmetros de água Classe II segundo a resolução CONAMA 357 de 17 março de 2005 que “Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências” (BRASIL, 2005). Segundo essa resolução, as águas classificadas como padrão II destinam-se ao abastecimento humano após tratamento convencional. No Brasil, os padrões de potabilidade da água são determinados pela Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011). Dessa forma, o que se buscou nessa etapa do trabalho foi avaliar se o tratamento convencional, preconizado pela CONAMA 357, para este tipo de água é realmente eficaz para que a água final obtida esteja dentro dos padrões de potabilidade estabelecidos pela Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde. Para isso, foram comparadas a redução dos parâmetros turbidez, cor, pH e absorção em $UV_{\lambda 254nm}$ que são os parâmetros químicos operacionais monitorados ao longo do dia em uma ETA com a remoção dos compostos orgânicos escolhidos. A Tabela 22 mostra os valores para os parâmetros físico-químicos estabelecidos pela Portaria 2914, WHO, EPA e pela Comunidade Européia.

Tabela 22. Parâmetros físico químicos de qualidade da água estabelecidos pelas legislações vigentes

	EPA	Comunidade Européia	WHO	Portaria 2914
pH	5-9	6,5-9,5	6,5-9,5	6,0-9,5
Cor	*15 mg Pt-Co.L ⁻¹	Sem variação significativa	-	*15 mg.Pt-Co ⁻¹
Turbidez	**0,3 NTU	**1 NTU	**5 NTU	**5 NTU
TOC	1-20 mg.L ⁻¹	-	-	-

*mg Pt-Co.L⁻¹: unidade padronizada para determinação de cor em amostras de água **NTU: Unidade nefelométrica de turbidez

Inicialmente os testes de jarros foram realizados com amostra sintética 20 mg.L⁻¹ fortificada com 2,5 mg.L⁻¹ dos analitos de forma a garantir sua determinação nas amostras provenientes dos ensaios por LC-DAD. A avaliação da redução da turbidez (Figura 36) e absorção em UV_{λ254nm} (Figura 37) e COT (Figura 37) demonstraram reduções significativas ou abaixo dos valores estabelecidos na legislação brasileira após todas as etapas de tratamento. O mesmo ocorrendo em todos os ensaios de cor, obtendo-se cor final, para todas as amostras, abaixo da faixa do equipamento que era de 5 mg Pt-Co.L⁻¹. A eficácia do tratamento foi comprovada estatisticamente pela análise de variância utilizada para demonstrar que os resultados obtidos ao final do tratamento realmente diferiram dos resultados das medidas realizadas antes dos ensaios de jarros. Somente as medidas para determinação de COT não foram realizadas em triplicata e nenhum tratamento estatístico foi realizado com esses dados. Valores máximos de UV_{λ254nm} e COT não são determinados na pela Portaria 2914, mas seu monitoramento é importante, pois caso a determinação dos analitos por LC-DAD ou LC-MS/MS aponte para eficácia de remoção, mas não haja redução desses valores tem-se um indicativo de que outros compostos estejam sendo formados.

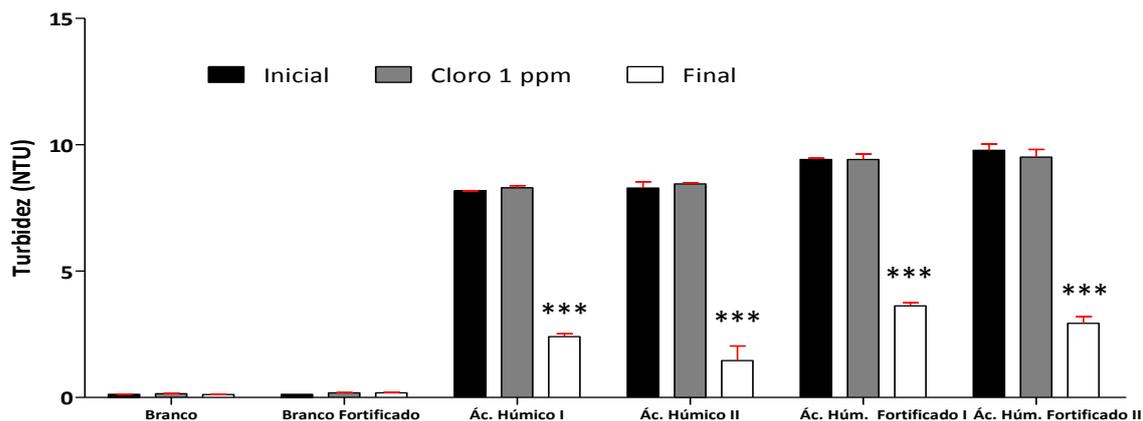


Figura 36. Avaliação da redução da turbidez após o ensaio de jarros. Os dados expressos como média de Δ NTU (n=3 por grupo, ***p<0,001 ANOVA)

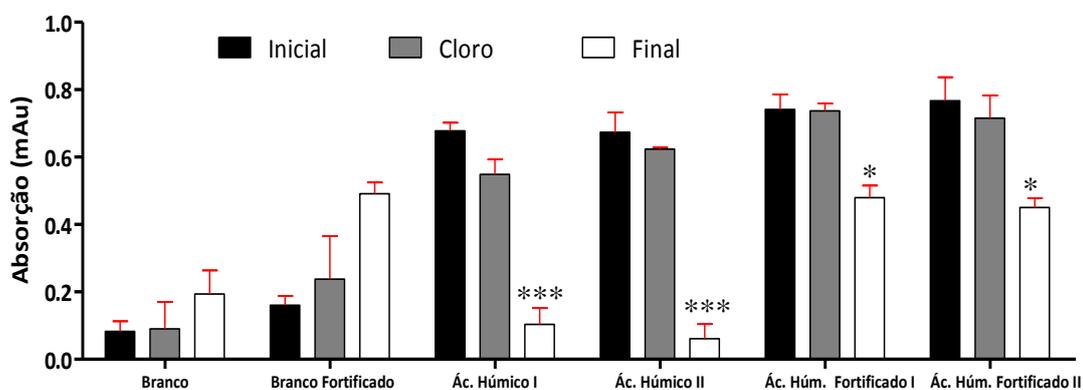


Figura 37. Avaliação da remoção de Absorção em $UV_{\lambda 254nm}$ após o ensaio de jarros dados expressos como média de Δ Abs (n=3 por grupo, ***p<0,001, *p<0,05 (ANOVA)

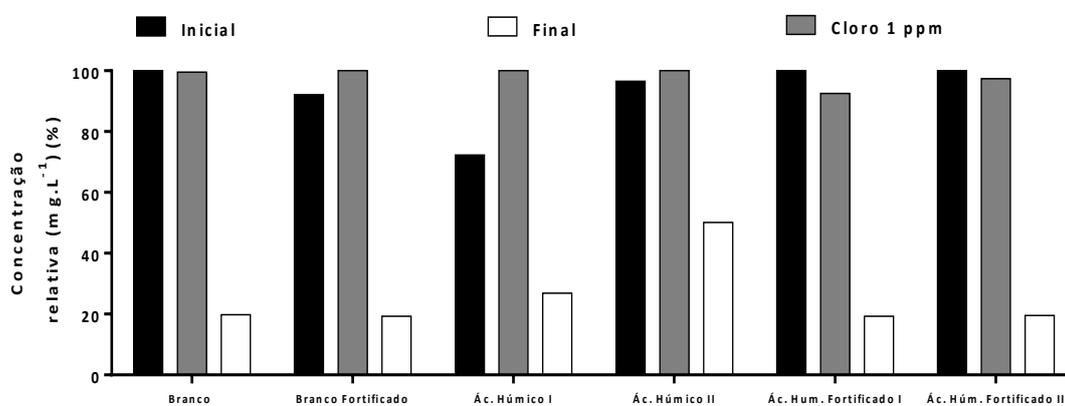


Figura 38. Avaliação da remoção de carbono orgânico total (COT) após o ensaio de jarros.

Apesar da redução de cor, turbidez, $UV_{\lambda 254 \text{ nm}}$, e COT, a análise cromatográfica não apresentou redução significativa de nenhum dos compostos estudados com a aplicação do tratamento proposto. Somente a amoxicilina apresentou percentual de redução superior a 20%, mas deve-se levar em conta a instabilidade do composto frente a pequenas variações de pH e temperatura que podem naturalmente ocorrer no ambiente aquático. Os resultados são apresentados na Figura 39 e na Figura 40. O 4-nonilfenol encontrou-se abaixo dos limites de detecção do método nos ensaios realizados.

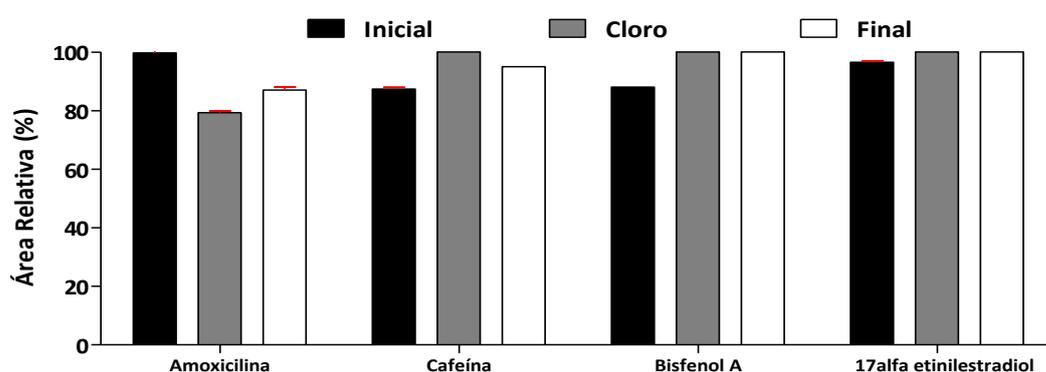


Figura 39. Avaliação da remoção dos compostos orgânicos por HPLC-DAD (Branco fortificado com $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ dos analitos). Dados expressos como média das áreas relativas ($n=3$ por grupo, ANOVA)

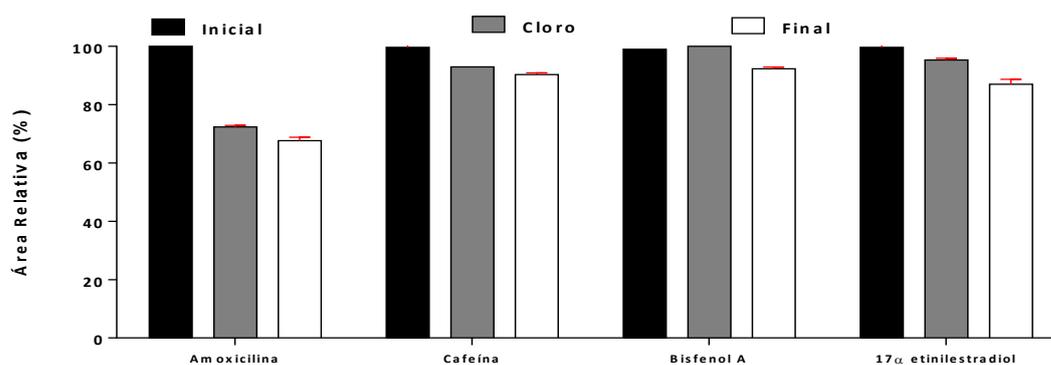


Figura 40. Avaliação da remoção dos compostos orgânicos por HPLC-DAD (Ác. Húmico 20 mg.L^{-1} fortificado com $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ dos analitos). Dados expressos como média das áreas relativas ($n=3$ por grupo, ANOVA)

Como as condições utilizadas no ensaio foram satisfatórias na adequação dos parâmetros físico químicos aos padrões de potabilidade e os resultados da avaliação da remoção por HPLC-DAD da amostra branco fortificado também não apontou para redução significativa, a concentração dos analitos foi reduzida, pois tanto a concentração de oxidante quanto a concentração de coagulante utilizadas poderiam não ser suficiente para reagir com a matéria orgânica dissolvida (representada pelo ácido húmico) e a quantidade relativamente elevada dos analitos. Não foi considerado aumentar a dosagem do oxidante devido ao potencial para formação de THM's apresentado pela reação entre o cloro e as substâncias húmicas. Dentre os inconvenientes do aumento da dosagem de coagulante, podem ser citadas aumento do volume de lodo gerado, redução nos valores de remoção de cor e turbidez já que altas concentrações de coagulante interferem na aglutinação das partículas, mantendo a matéria orgânica solúvel e aumentando os valores de cor e turbidez. E, finalmente, aumento do custo total de produtos químicos empregados na coagulação e ajuste final de pH.

As amostras provenientes de ensaios de jarros com concentrações dos analitos em $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ foram analisadas por LC-MS/MS já que o método apresentou maior sensibilidade do que o anterior. O resultado é apresentado na Figura 41 e demonstra que a redução dos compostos não foi superior a 20% em nenhum dos casos. A amoxicilina apresentou o mesmo comportamento anterior, porém com redução de aproximadamente 60% da concentração inicial. A utilização do método com detecção por espectrometria de massas permitiu a detecção do produto de degradação descrito anteriormente. O comportamento desse produto durante as etapas de tratamento foi bastante similar ao da amoxicilina. Apesar de ter sido detectado pelo método, o resultado para o 4-nonilfenol não foi consistente, apresentando altos desvios entre as replicatas e nenhuma correlação entre as áreas obtidas nas diferentes etapas do tratamento. Tal fato pode ser explicado pelo sinal extremamente baixo obtido que ficou na ordem de 10^2 para as amostras iniciais do tratamento com concentrações muito próximas ao limite de quantificação do método. Apesar das etapas de concentração de diversas alíquotas para análise dessas amostras por LC-MS/MS a determinação da eficácia de remoção não foi prejudicada, pois todas as amostras (iniciais e finais) passaram pelos mesmo processos.

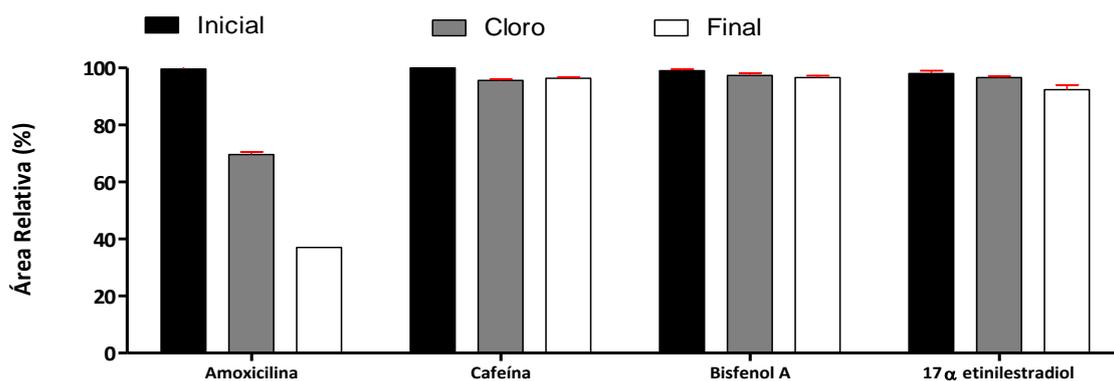


Figura 41. Avaliação da remoção dos compostos orgânicos por HPLC-DAD (Ác. Húmico 20 mg.L⁻¹ fortificado com 50 µg.L⁻¹ dos analitos). Dados expressos como média das áreas relativas (n=3 por grupo, ANOVA)

Foi avaliado também o tratamento convencional com amostra sintética representando água de melhor qualidade, com cor mais baixa, que seria mais representativa quando comparada à amostras reais. Para isso, a solução de ácido húmico em concentração 5 mg.L⁻¹ foi utilizada. Nesses ensaios, também foi avaliada a redução dos analitos utilizando uma etapa de pós-cloração, para simular a etapa de desinfecção antes da distribuição realizada na saída das estações de tratamento de água. Os resultados são apresentados na Figura 42 e na Figura 43. Observa-se que taxas de redução acima de 80% foram obtidas, superiores às obtidas anteriormente, indica interferência da matéria orgânica dissolvida na remoção de outros compostos que possam estar presentes na água e confirmam a necessidade da otimização dos parâmetros de tratamento de acordo com a variação da qualidade da água que chega à ETA.

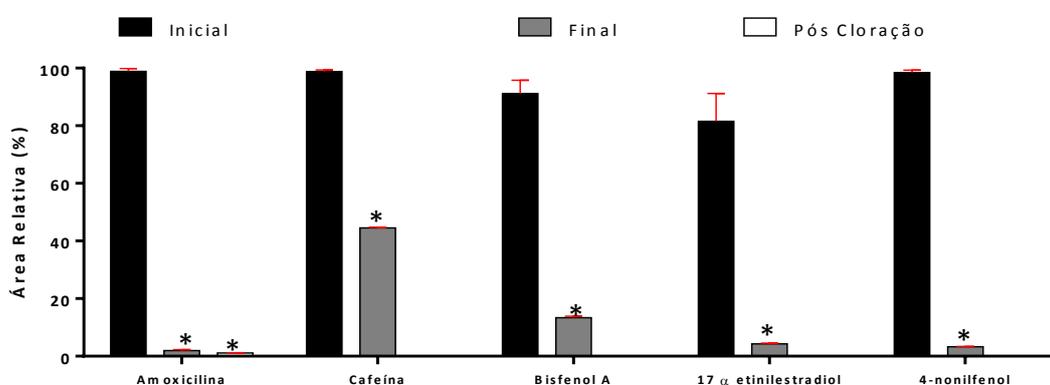


Figura 42. Avaliação da remoção dos compostos orgânicos por HPLC-MS/MS, modo positivo de ionização por *electrospray*, aquisição em MRM (Branco fortificado com 50 µg.L⁻¹ dos analitos). Dados apresentados como média das áreas relativas dos picos obticos (n=3 por grupo, ANOVA)

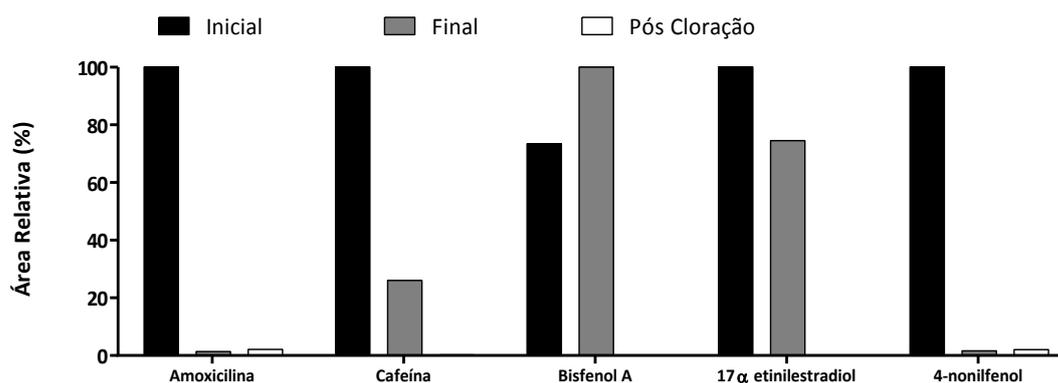


Figura 43. Avaliação da remoção dos compostos orgânicos por HPLC-MS/MS, modo positivo de ionização por electrospray, aquisição em MRM (Ác. Húmico 5 mg.L⁻¹ fortificado com 50 µg.L⁻¹ dos analitos). Dados apresentados como média das áreas relativas dos picos obticos (n=3 por grupo, ANOVA)

A avaliação da remoção dos analitos utilizando carvão ativado em pó foi realizada com solução de ácido húmico fortificada com 50 µg.L⁻¹ dos analitos. Os resultados são apresentados na Figura 44 e demonstram redução significativa e mais satisfatória do que aquelas obtidas com a utilização de cloro.

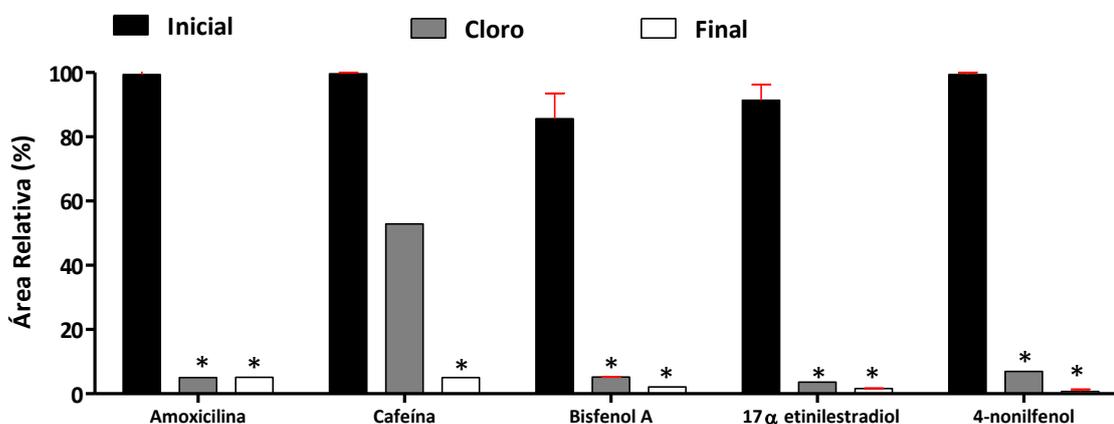


Figura 44. Ensaios com carvão ativado para avaliação da remoção dos compostos orgânicos por HPLC-MS/MS, modo positivo de ionização por electrospray, aquisição em MRM (Ác. Húmico 5 mg.L⁻¹ fortificado com 50 µg.L⁻¹ dos analitos). Dados apresentados como média das áreas relativas dos picos obticos (n=3 por grupo, ANOVA)

Observa-se nas Figuras 43 e 44 que a redução mais significativa (acima de 80%) ocorreu somente após a etapa de pós-cloração quando o teor de matéria orgânica

presente já tinha sido reduzido pelo processo de coagulação. Isto pode favorecer a depreciação da tubulação de distribuição nas estações elevando o custo do tratamento e favorecendo a degradação desses contaminantes a produtos mais tóxicos e persistentes. Com a utilização do carvão ativado, a concentração dos analitos foi reduzida em mais de 80% somente pelo processo de adsorção. Há, então, a redução da possibilidade de formação de trihalometanos sem encarecimento do tratamento. A turbidez, cor e absorção em UV_{254nm} foram removidas pelo processo de coagulação-floculação, porém em casos de piora da qualidade da água bruta ou em episódio de floração de microorganismos a utilização somente de carvão ativado pode não ser suficiente devido à saturação dos sítios ativos pela elevada concentração de matéria orgânica dissolvida. Tal fato prejudicaria o processo de coagulação-floculação afetando a qualidade da água produzida. Ressalta-se que apesar do aumento na taxa de redução dos compostos, nenhum dos tratamentos obteve 100% de sucesso. Problemas decorrentes da presença de fármacos e interferentes endócrinos na água são observados mesmo em concentrações extremamente baixas, por isso metodologias avançadas de tratamento devem ser consideradas para complementar o sistema de tratamento convencional e eliminar tais compostos e seus efeitos eficientemente.

6. Conclusão

Os métodos analíticos otimizados e desenvolvidos foram adequados para determinação de amoxicilina, cafeína, bisfenol A, 17 α -etinilestradiol e 4-nonilfenol por LC-DAD e LC-MS/MS em amostras de água quando as concentrações presentes são da ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$. Mesmo sendo uma concentração considerada elevada para as usualmente encontradas no ambiente aquático, possíveis interferentes presentes na matriz podem ser eliminados e as amostras concentradas em fatores de até 2000 vezes aumentando a capacidade do método analítico. A utilização da detecção no ultravioleta visível pode ser utilizada durante a realização de ensaios preliminares com amostras sintéticas, mas para o caso da determinação desses compostos em amostras reais a espectrometria de massas faz-se necessária por permitir a determinação inequívoca de cada um desses compostos e ser um método de maior sensibilidade. Os ensaios de jarros demonstraram que a matéria orgânica presente na água interfere tanto nos processos de oxidação quanto coagulação-floculação e adsorção por carvão ativado apresentando relação direta com a eficiência do tratamento. Dessa forma, é de extrema necessidade o monitoramento da qualidade da água dos mananciais que abastecem as estações de tratamento. Deve-se observar que muitas vezes a condição ótima de remoção de cor e turbidez não é a mesma que permite a maximização da remoção de compostos potencialmente tóxicos. Sendo assim, dependendo das condições utilizadas nos processos de pré-oxidação e desinfecção, pode ocorrer, sazonalmente, a formação de THM's em concentrações superiores ao padrão de potabilidade vigente. Os resultados dos testes de jarros mostram a necessidade de avaliação da eficácia do tratamento convencional e apontam para a necessidade para o desenvolvimento ou a aplicação de métodos de tratamento complementares que promovam a degradação completa desses contaminantes.

Torna-se, dessa forma, necessária avaliação da capacidade de biodegradação dessas substâncias em águas naturais brasileiras e a formação de derivados mais ou menos tóxicos do que os compostos originais devem ser avaliadas em estudos futuros.

Os fármacos e interferentes endócrinos são micropoluentes presentes em águas de mananciais e conseqüentemente na água tratada já que não são removidos durante os processos de tratamento. Os mesmos ainda não fazem parte dos padrões de potabilidade

estipulados pelo Ministério da Saúde no Brasil, porém, medidas preventivas, deveriam ser adotadas pelas companhias de saneamento visando à remoção destes e de outros compostos, mesmo os não que não conferem gosto e odor à água.

7. Referências Bibliográficas

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. p. 1-17, 29 de Maio de 2003.

AHEL, M.; GIGER, W.; KOCH, M. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment—I. Occurrence and transformation in sewage treatment. **Water Research**, v. 28, n. 5, p. 1131-1142, 1994.

AHRER, W.; SCHERWENK, E.; BUCHBERGER, W.. Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 910, n. 1, p. 69-78, 2001.

ALLEN, Y. et al. The extent of oestrogenic contamination in the UK estuarine and marine environments—further surveys of flounder. **Science of the Total Environment**, v. 233, n. 1, p. 5-20, 1999.

ALMEIDA, G.A.; WEBER, R.R. Fármacos na represa Billings. **Revista Saúde e Ambiente**, V. 6, n.2, pp.7-13, 2005

American Water Works Association Research Foundation. Optimizing Filtration in Biological Filters. Denver, **AWWA**, p. 268, 2000.

American Water Works Association Research Foundation. Removal of DBP Precursors by GAC Adsorption. Denver, **AWWA**, p. 248, 1998.

ANDREOZZI, R. et al. Antibiotic removal from wastewaters: the ozonation of amoxicillin. **Journal of hazardous Materials**, v. 122, n. 3, p. 243-250, 2005.

AZEVEDO, S.M.F.O. et al. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**, v.181, p. 441-446, 2002.

BABIĆ, S. et al. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 1043-1061, 2007.

BAILÓN et al. Trace determination of beta-lactam antibiotics in environmental aqueous samples using off-line and on-line preconcentration in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1185, n. 2, p. 273-280, 2008.

BALLARD, B.; MACKAY, A. Estimating the removal of anthropogenic organic chemicals from raw drinking water by coagulation flocculation. **Journal of Environmental Engineering**, v. 131, n. 1, p. 108-118, 2005.

BAUTITZ, I. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Degradation of tetracycline by photo-Fenton process—Solar irradiation and matrix effects. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 187, n. 1, p. 33, 2007.

BENTAMA, J. et al. Technological innovation for the production of drinking water by membrane processes. **Desalination**, v. 168, p. 283-286, 2004.

BEZBARUAH, A. N.; KALITA, H. Sensors and biosensors for endocrine disrupting chemicals: state-of-the-art and future trends. J. Virkutyte, R.S. Varma, V. Jegatheesan (Eds.), **Treatment of Micropollutants in Water and Waste Water**, IWA Publishing, London, p. 93–128, 2010.

BIGNERT, A. et al., Leeches as indicators of dietary mercury exposure in non-piscivorous waterfowl in central Ontario, Canada. **Environ. Pollut.**, v. 99, n.2, p.177-181, 1998

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

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

BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes; ISBN 1-56670-601-7; disponível em [www.crcpress.com]; 2003.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Portaria nº 41. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, 12 de dezembro de 2011.

BRASIL. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 357. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 18 março de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de portabilidade, e da outras providências. **Diário Oficial da União**, 14 de dezembro de 2014.

BROSÉUS et al., Ozone oxidation of pharmaceuticals, endocrine disruptors and pesticides during drinking water treatment. **Water Research**, v. 43, p. 4707-4717, 2009

BUERGE I. J. et al. Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. **Environmental science & technology**, v. 37, n. 4, p. 691-700, 2003.

BUERGE, I. J. et al. Combined sewer overflows to surface waters detected by the anthropogenic marker caffeine. **Environmental science & technology**, v. 40, n. 13, p. 4096-4102, 2006.

CARBALLA, M.; OMIL, F.; LEMA, J. M. Removal of cosmetic ingredients and pharmaceuticals in sewage primary treatment. **Water Research**, v. 39, n. 19, p. 4790-4796, 2005.

CHEN, Z. et al. Determination of caffeine as a tracer of sewage effluent in natural waters by on-line solid-phase extraction and liquid chromatography with diode-array detection. **Water Research**, v. 36, n. 19, p. 4830-4838, 2002.

CHRISTENSEN, F. M., Pharmaceuticals in the Environment - a Human Risk? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 28, n.3, p. 212-221, 1998

DAMSTRA, T. et al. Global Assessment of the State of the Science of Endocrine Disruptors, WHO, 2002. <http://www.who.int/ipcs/publications/en/ch1.pdf?ua=1>. (Acessado em março, 2014).

DAUGHTON, C. e TERNES, T., Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? **Environ. Health Perspect.**, v.107, n. 6, p. 907-938, 1999

DE BAERE, S., CHERLET, M., BAERT, K., & DE BACKER, P. Quantitative analysis of amoxicillin and its major metabolites in animal tissues by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 1393-1401, 2002

DEKANT, W.; VÖLKEL, W. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: Methods, results and assessment of environmental exposures. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 228, p. 290, 1998.

DOMÈNECH, X. et al. Eliminación de contaminantes por fotocátalisis heterogênea. **Eliminación de contaminantes por fotocátalisis heterogênea**, 2001.

DÖRR, F. A. et al. Microcystins in South American aquatic ecosystems: occurrence, toxicity and toxicological assays. **Toxicon**, n. 56, p. 1247-1256, 2010.

DREWES, J. E. et al. Fate of pharmaceuticals during ground water recharge. **Ground Water Monitoring & Remediation**, v. 23, n. 3, p. 64-72, 2003.

EERTMANS, F. et al. Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment. **Toxicology in vitro**, v. 17, n. 5, p. 515-524, 2003.

EGGEN, R. I. et al. Search for the evidence of endocrine disruption in the aquatic environment; Lessons to be learned from joint biological and chemical monitoring in the European project COMPREHEND. **Pure and applied chemistry**, v. 75, n. 11, p. 2445-2450, 2003.

EHLERT, K.A.; BEUMER, C.W.E.; GROOT, M.C.E. Migration of bisphenol A into water from polycarbonate baby bottles during microwave heating, **Food Additives and Contaminants**, v. 25, p. 904-910, 2008

ELLIS, J.B Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters. **Environ. Pollut.** v.144, p. 184–189, 2006

EPA. Membrane filtration guidance manual. Office of Water. United States Environmental

ERIKSSON, P.; JAKOBSSON, E.; FREDRIKSSON, A. Brominated flame retardants: a novel class of developmental neurotoxicants in our environment? **Environ. Health Perspect.**, v. 109, p.903; 2001

European Commission. 1997. European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and the Environment. Environment and Climate Research Programme, DG XII, European Commission, Report EUR 17549.

FARRÉ, M. et al. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography–mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischer*. **Journal of Chromatography A**, v. 938, n. 1, p. 187-197, 2001.

FARRÉ, M. et al. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 11, p. 991-1007, 2008.

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic toxicology**, v. 76, n. 2, p. 122-159, 2006.

FERREIRA, A. P.; CUNHA, C. L. N. Anthropoc pollution in aquatic environment: Development of a caffeine Indicator. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 15 (4), p. 303-311, 2005.

FERREIRA DA SILVA et al., Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain. **Chemosphere**, v. 85, p. 1331–1339, 2011.

FERREIRA FILHO, S.S.; MARCHETTO, M. Otimização multi-objetivo de estações de tratamento de águas de abastecimento: remoção de turbidez, carbono orgânico total e gosto e odor. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 7-15, 2006.

FERREIRA FILHO, S.S; SAKAGUTI, M. Comportamento cinético do cloro livre em meio aquoso e formação de subprodutos da desinfecção. **Eng. Sanit. Ambient.**, v. 13, n. 2, 2008.

FONTENELE, E. G. P. et al. Environmental contaminants and endocrine disruptors. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 54, p. 1, 2010.

FRANSE & de VOOGT, Oestrogene verbindingen in het Nederlands milieu, **MTC report**, 1997.

GARDINALI, P. R.; ZHAO, X. Trace determination of caffeine in surface water samples by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization–mass spectrometry (LC–APCI–MS). **Environment International**, v. 28, n. 6, p. 521-528, 2002.

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

GIMENO et al. Embryotoxicity of Great Lakes lake trout extracts to developing rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, v. 47, p. 77, 1998.

GLASSMEYER et al. Transport of Chemical and Microbial Compounds from known Wastewater Discharges: Potential for Use as Indicators of Human Fecal Contamination. **Environ. Sci. Technol.** v. 39; p. 5157-5169; 2005.

GOLET et al. Trace Determination of fluoroquinolone Antibacterial Agents in Urban Wastewater by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with fluorescence Detection. **Anal. Chem.**, v. 73, p. 3632-3638, 2001.

GOMES, M. L. P.; SOUZA, S. V. C. Validação de método para determinação de resíduos de amoxicilina aplicado à validação de limpeza em indústria farmacêutica de penicilínicos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 972-977, 2010.

GOODMAN, L. S; GILMAN, A. (eds.). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Rio de Janeiro: Editora McGraw Hill, 1996.

GROS, M., PETROVIC, M., AND BARCELO, D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters, **Talanta**, v. 70, p. 678-690, 2006a

GROS, M., PETROVIC, M., BARCELO, D. Multi-residue analytical methods using LC-tandem MS for the determination of pharmaceuticals in environmental and wastewater samples: A review, **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 386, p. 941-952, 2006b

GRUJIC, S.; VASILJEVIC, T.; LAUSEVIC, M.; AST, T. Study on the formation of an amoxicillin adduct with methanol using electrospray ion trap tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 22, p. 67, 2008.

GUART, A. et al. Effect of bottling and storage on the migration of plastic constituents in Spanish bottled waters. **Food Chemistry**, v.156, p. 73-80, 2014.

GUNTEN, U. Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. **Water Res.**, v. 37, n. 7, p. 1443, 2003.

GUYTON, A. C. & HALL, J. E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

HARTIG, C.; STORM, T.; JEKEL, M. Detection and identification of sulphonamide drugs in municipal waste water by liquid chromatography coupled with electrospray ionisation tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 854, p. 163-173, 1999.

HE, F. et al. Occurrence and fate of nonylphenol ethoxylates and their derivatives in Nansi Lake environments, China. **Water Environment Research**, v. 85, n. 1, p. 27-34, 2013.

HEBERER, T., Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. **J. Hydrol.** v.266, p. 175–189, 2002

HILTON, M. J.; THOMAS, K. V. Determination of selected human pharmaceuticals compounds in effluent and surface water samples by HPLC-ESI-MS. **J. Chromatogr. A**, v. 1015, p. 129-141, 2003.

HIRSCH et al. Comparison of supercritical fluid extraction and Soxhlet extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in environmental matrix standard reference materials. **J. Chromatogr. A**, v. 815, p. 213, 1998.

HIRSCH et al., Occurrence of antibiotics in the aquatic environment **Sci. Total Environ**, v. 225, n. 1-2, p. 109-111, 1999

HLADIK, M. L.; HSIAO, J. J.; ROBERTS, A. L. Are Neutral Chloroacetamide Herbicide Degradates of Potential Environmental Concern? Analysis and Occurrence in the Upper Chesapeake Bay. **Environ. Sci. Technol.**, v. 39, p. 6561, 2005.

HOFMAN et al. Enhanced surface water treatment by ultrafiltration. **Desalination**, v. 119, p. 113-125, 1998.

HUBER, M. M. et al., Oxidation of Pharmaceuticals during Ozonation of Municipal Wastewater Effluents: A Pilot Study. **Environ. Sci. Technol.**, v. 39, n. 11, p. 4290, 2005.

IGNAZ et al., Caffeine, an Anthropogenic marker for Wastewater Contamination of Surface Waters. **Environmental Science & Technology**, v. 37, p. 691-700, 2003.

INOUE et al. Determination of bisphenol A in human serum by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical detection. **J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.** v. 749, p. 17–23, 2000.

INOUE et al., Bisphenol A glucuronidation and absorption in rat intestine. **Drug. Metab. Dispos.**, v.31, p. 140–144,2003

INOUE, H.; YUKI, G.; YOKOTA, H.; Kato, S. Bisphenol A glucuronidation and absorption in rat intestine. **Drug. Metab. Dispos.** v. 31, p. 140–144, 2003.

IWATA, H. et al. Geographical distribution of persistent organochlorines in air, water and sediments from Asia and Oceania, and their implications for global redistribution from lower latitudes. **Environ. Pollut.**, n.85, n.1, p.15-33, 1994.

JACANGELO et al., Role of membrane technology in drinking water treatment in the United

States. **Desalination**, v. 113, p. 119-127, 1997.

JANEX-HABIBI, M. et al. Reduction of endocrine disruptor emissions in the environment: The benefit of wastewater treatment. **Water research**, v. 43, n. 6, p. 1565-1576, 2009.

JOBLING et al. Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. **Environ. Sci. Technol.**, v. 32, p. 2498-2506, 1998.

JOHSON, A. C.; BELFROID, A.; di CORCIA, A. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. **Science of the Total Environment**, v. 256, p. 163 – 173, 2000.

JONES, O.A.H.; LESTER, J.N.; VOULVOULIS, N. Human pharmaceuticals in wastewater treatment processes. **Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.**, v. 35, 401–427, 2005b.

JONES, O.A.H.; LESTER, J.N.; VOULVOULIS, N. Pharmaceuticals: a threat to drinking water? **Trends Biotechnol.**, v. 23, p. 163–167, 2005a.

JORGENSEN et al. Drugs in the environment. **Chemosphere**, v. 40, n. 7, p.691-699, 2000.

JOSS, A. Erratum to “Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment”. **Water Res.** v. 39, n. 18, 4585, 2005.

KASPRZYK-HORDERN, B.; DINSDALE, R. M.; GUWY, A. J. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface waters in South Wales, UK. **Water Res.** v. 42, p. 3498–3518, 2008

KATSU et al., A caffeine-sensitive membrane electrode: Previous misleading report and present approach. **Anal. Chim. Acta**, v. 620, p. 50-54, 2008

KIM et al. Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem, and six major sulfonamides and their potential ecological risks in Korea. **Environ. Int.**, v. 33, p. 370–375, 2006.

KIM, J. et al. Removal of Toxic Organic Micropollutants with FeTsPc-Immobilized Amberlite/H₂O₂: Effect of Physicochemical Properties of Toxic Chemicals. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 3 p. 1586-1592, 2009.

KIM, S. D. et al. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. **Water research**, v. 41, n. 5, p. 1013-1021, 2007.

KLAVARIOTI et al. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. **Environment International**, v. 35, p. 402–417, 2009.

KOLLE, S. N. et al. A testing strategy for the identification of mammalian, systemic endocrine disruptors with particular focus on steroids. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 259-278, 2012.

KOLPIN, D. W. et al., Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance. **Environ. Sci. Technol.**, v.36, n. 6, p. 1202-1211, 2002

KUJIBIDA et al., Saxitoxins accumulation by freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*) for human consumption **Toxicol.**, v.54, p. 891–894, 2009

Kummerer, K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. **Journal of Environmental Management** , v. 90, n. 8, p. 2354-2366, 2009

KUREBAYASHI et al., H., Harada, R., Stewart, R.K., Numata, H., Ohno, Y., Disposition of a low dose of bisphenol A in male and female cynomolgus monkeys. **Toxicol. Sci**, v. 68, p.32–42, 2002

KUSTER, M. et al. Fate of selected pesticides, estrogens, progestogens and volatile organic compounds during artificial aquifer recharge using surface waters. **Chemosphere**, v. 79, n. 8, p. 880-886, 2010.

LAMM, et al. Detection of amoxicillin-diketopiperazine-2',5' in wastewater samples. **J. Environ. Science and Health Part A.**, v. 44, p. 1512-1517, 2009.

LEE, C. et al. The potential role of water quality parameters on occurrence of nonylphenol and bisphenol A and identification of their discharge sources in the river ecosystems. **Chemosphere**, v. 91, n. 7, p. 904-911, 2013.

LEE, L. E. et al. Fish cell lines as rapid and inexpensive screening and supplemental tools for whole effluent testing. **Integr. Environ. Assess. Manage.**, v. 4 , p. 372–374, 2008.

LI, Z. et al. An evaluation on combination effects of phenolic endocrine disruptors by estrogen receptor binding assay. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 6, p. 769-774, 2012.

LIAN, J.; LIU, J. X.; WEI, Y. S. Fate of nonylphenol polyethoxylates and their metabolites in four Beijing wastewater treatment plants. **Science of the total environment**, v. 407, n. 14, p. 4261-4268, 2009.

LIN, A.Y.C.; REINARD, M., Photodegradation of common environmental pharmaceuticals and estrogens in river water. **Environ. Toxicol. Chem.** v.24, p. 1303–1309.

LINDSEY, M. E.; MEYER, M.; THURMAN, E. M. Analysis of Trace Levels of Sulfonamide and Tetracycline Antimicrobials in Groundwater and Surface Water Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 73, n. 19, p. 4640, 2001.

LOOS, R.; HANKE, G.; UMLAUF, G.; EISENREICH, S.J. LC–MS–MS analysis and occurrence of octyl- and nonylphenol, their ethoxylates and their carboxylates in Belgian and Italian textile industry, waste water treatment plant effluents and surface waters. **Chemosphere**, v. 66, p. 690–699, 2007.

LÓPEZ-CASAS, P. P. et al. The effects of different endocrine disruptors defining compound-specific alterations of gene expression profiles in the developing testis. **Reproductive toxicology**, v. 33, n. 1, p. 106-115, 2012.

LOPEZ-ROLDAN, et al., Advanced Monitoring of Pharmaceuticals and Estrogens in the Liobregat River Basin (Spain) using Liquid Chromatography-Triple Quadrupole-Tandem Mass Spectrometry in Combination with Ultra Performance Liquid Chromatography-Time of Flight-Mass Spectrometry. **Chemosphere**, v. 80, n. 11, p. 1337–1344, 2010

LÓPEZ-SERNA et al., Multi-residue enantiomeric analysis of pharmaceuticals and their active metabolites in the Guadalquivir River Basin (South Spain) by chiral liquid chromatography coupled with mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 405, n.18, o. 5859-5873

LUO et al. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Sci Total Environ.**, v. 473-474, p. 619-41, 2014.

LUO, Y. et al. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of The Total Environment**, v. 473, p. 619-641, 2014.

MA et al. Application of membrane technology for drinking water. **Desalination**, v. 119, p. 127-131, 1998.

MACDONALD, R. W. et al., Contaminants in the Canadian Arctic: 5 years of progress in understanding sources, occurrence and pathways. **Sci. Total Environ.**, v.254, p.93-234, 2000

MAGI et al. Determination of endocrine-disrupting compounds in drinking waters by fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of mass Spectrometry**, v. 45, n. 9, p. 1003-1011, 2010.

MARTÍN, J. et al. Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal. **Journal of hazardous materials**, v. 239, p. 40-47, 2012.

MATAMOROS, V.; SALVADÓ, V. Evaluation of a coagulation/flocculation-lamellar clarifier and filtration-UV-chlorination reactor for removing emerging contaminants at full-scale

wastewater treatment plants in Spain. **Journal of Environmental Management**, v. 117, p. 96-102, 2013.

MATTHEWS, J.B., Twomey, K., Zacharewski, T.R., In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. **Chem. Res. Toxicol.** V. 14, p. 149–157, 2001

MATTHEWS, J.B.; TWOMERY, K.; ZACHAREWSKI, T.R. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 14, p. 149–157, 2001.

MELO et al. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Quim. Nova**, v. 32, n. 1, p. 188-197, 2009.

MELO, S. M.; BRITO, N. M. Analysis and Occurrence of Endocrine Disruptors in Brazilian Water by HPLC-Fluorescence Detection. **Water, Air and Soil Pollution.**, v. 225, p. 1783, 2014.

MEZCUA et al. Photolysis and photocatalysis of bisphenol A: identification of degradation products by liquid chromatography with electrospray ionization/time-of-flight/mass spectrometry (LC/ESI/ToF/MS). **Food Addit. Contam.**, v. 23, n. 11, p. 1242, 2006.

MIAO, X. S.; BISHAY, F.; CHEN, M.; METCALFE, C. D. Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. **Environ. Sci. Technol.**, v. 38, p. 3533–3541, 2004.

MIRANDA, C. D.; CASTILLO, G. Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater. **Sci. Total Env.**, v. 224, n. 1-3, p. 167-176, 1998.

MOL, H. G. J.; SUNARTO, S.; STEIJGER, O. M. Alkyltrimethylammonium surfactant-mediated extractions: characterization of surfactant-rich and aqueous layers, and extraction performance. **J. Chromatogr. A**, v. 879, n. 97, 2000.

MORASCH et al. Occurrence and fate of micropollutants in the vidy bay of lake Geneva, Switzerland. Part II: micropollutant removal between wastewater and raw drinking water. **Environ. Toxicol. Chem.** v. 29, p. 1658–1668, 2010

NAGELE, E.; MORITZ, R. Structure elucidation of degradation products of the antibiotic amoxicillin with ion trap MS(n) and accurate mass determination by ESI TOF. **American Society for Mass Spectrometry**, v. 16, p. 1670-1676, 2005.

NGHIEM, L. D.; SCHAFFER, A. I.; ELIMELECH, M. Pharmaceutical Retention Mechanisms by Nanofiltration Membranes. **Environ. Sci. Technol.**, v. 39, n. 19, p. 7698, 2005.

NICOLAISEN, B. Developments in membrane technology for water treatment. **Desalination**, v. 153, p. 355-360. 2002.

NOHYNEK, G. J. Endocrine disruption: Fact or urban legend? **Toxicology Letters**, v. 223, p. 295-305, 2013.

NRIAGU, J. O., PACYNA, J. M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. **Nature**, v. 333, p. 134, 1988

PAL. et al. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 24, p. 6062-6069, 2010.

PENA, A.; LINO, C., SILVEIRA, M. Survey of caffeine levels in retail beverages in Portugal. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, p. 91-96, 2005.

PEREZ, S., BARCELO, D. Application of advanced MS techniques to analysis and identification of human and microbial metabolites of pharmaceuticals in the aquatic environment, **Trends Anal. Chem.**, v. 26, p. 494-514, 2007

PEREZ-PARADA et al. Behavior of amoxicillin in wastewater and river water: identification of its main transformation products by LC/ESI-QToF. **Rapid Commun. Mass. Spectrom.**, v. 25, n. 6, p. 731-742, 2011 .

PETRIE, B.; MACADAM, M. J.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N; CARTMELL, E. Fate of drugs during wastewater treatment. **Trends in Analytical chemistry**, v. 49, p. 145–159, 2013.

PETROVIC et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. **J. Chromatogr. A**, v. 1067, p. 1-14, 2005.

PETROVIC e BACELÓ (eds.) **Analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the watercycle**, v. 50, 1ª ed., p.427, 2007.

PIOCOS, E. A.; CRUZ, A. A. Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array detection of chemical indicators of human fecal contamination in water. **J Liq Chromatogr & Rel Technol.**, v. 23, n.8, p. 1281–1291, 2000.

PISAPIA, L. et al. Effects of some endocrine disruptors on cell cycle progression and murine dendritic cell differentiation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 178, n. 1, p. 54-63, 2012.

POJANA, G. et al. Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. **Environment International**, v. 33, n. 7, p. 929-936, 2007.

PORTE, C. et al. Endocrine disruptors in marine organisms: approaches and perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 3, p. 303-315, 2006.

PRITCHETT, J. J.; KUESTER, R. K.; SIPES, I. G. Metabolism of bisphenol A in primary cultured hepatocytes from mice, rats, and humans. **Drug Metab. Dispos.**, v. 30, p. 1180– 1185, 2002.

RADJENOVIC, J., PETROVIC, M., BACELÓ, D. Complementary mass spectrometry and bioassays for evaluating pharmaceutical-transformation products in treatment of drinking water and wastewater. **Trends in Analytical Chemistry**, v.28, n.5, 2009

REYERO et al., Estrogenic Activity in Sediments from European Mountain Lakes Environ. **Sci. Technol.**, v. 39, p. 1427-1435, 2005.

RICHARDSON, M. L.; BOWRON, J. M. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 37, n. 1, p. 1-12, 1985.

RICHARDSON, S. D.; SIMMONS, J.E; RICE, G. Peer Reviewed: Disinfection Byproducts: The Next Generation. **Environ. Sci. Technol.**, v. 36, n.9, p. 198A-205A, 2002.

RICHARDSON, Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues. **Anal. Chem.**, v. 78, p. 4021-4046, 2006

RIVERA-UTRILLA, J. et al. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. **Chemosphere**, v. 93, n. 7, p. 1268-1287, 2013.

ROCHA et al. Spatial and seasonal distribution of 17 endocrine disruptor compounds in an urban estuary (Mondego River, Portugal): evaluation of the estrogenic load of the area Environ Monit Assess. V. 186, p. 3337-3350, 2014.

RODIL et al. Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain). **Chemosphere**, v.86, p. 1040–1049, 2012.

RODNEY, S. I.; TEED, R. S.; MOORE, D. R. J. Estimating the toxicity of pesticide mixtures to aquatic organisms: a review, **Hum. Ecol. Risk Assess**, v.19, p. 1557-1575, 2013.

ROUILLER-FABRE, V.; HABERT, R.; LIVERA, G. Effects of endocrine disruptors on the human fetal testis. **Annales d'Endocrinologie**, v. 75, n. 2, p. 54-57, 2014.

RYU, J. et al. Determination of micropollutants in combined sewer overflows and their removal in a wastewater treatment plant. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 5, p. 3239-3251, 2014.

SACHER et al. Pharmaceuticals in groundwaters: Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. **J. Chromatogr. A**, v. 938, p. 199, 2001.

SAIKI, J., MIYAMOTO, F., FUKATA, H., MORI, C., YONEKUBO, J., **Food Additives and Contaminants**, v.24,p. 103–112, 2007

SANKARARAMAKRISHNAN, N.; GUO, Q. Chemical tracers as indicator of human fecal coliforms at storm water outfalls. **Environment International**, v.31, p. 1133-1140, 2005.

SCHWARZENBACH et al. The challenge of micropollutants in aquatic systems. **Science**, v. 313, p. 1072–1077, 2007.

SHARMA, V. K. et al. Nonylphenol, octylphenol, and bisphenol-A in the aquatic environment: a review on occurrence, fate, and treatment. **J Environ Sci Health Part A**, v. 44, p. 423–442, 2009.

SHIMIZU et al. Sulfation of bisphenol A abolished its estrogenicity based on proliferation and gene expression in human breast cancer MCF-7 cells. **Toxicol. In Vitro**, v. 16, p. 549–556, 2002.

SILVA et al., Photodegradation of bisphenol A in aqueous medium: Monitoring and identification of by-products by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 28, p. 987–994, 2014

SILVA, P. et al. Testing the effects of ethinylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens as found in the Douro River (Portugal) on the maturation of fish gonads— A stereological study using the zebrafish (*Danio rerio*) as model. **Aquatic Toxicology**, v. 124–125, p. 1-10, 2012.

SNYDER et al. Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** V.168, P. 225–234, 2000.

SOARES, A. et al. Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. **Environment International**, v. 34, n. 7, p. 1033-1049, 2008.

SOBECKA et al. Biological activation of carbon filters. **Water Research**, v. 40, p. 355-363, 2006.

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Occurrence of Emerging Contaminants in Brazilian Drinking Waters: A Sewage-To-Tap. **Water, Air and Soil Pollution.**, v. 206, n. 1-4, p. 57-67, 2010.

SPEITEL, G. E.; DIGIANO; F. A. The bioregeneration of GAC used to treat micropollutants. **Journal of American Water Works Assoc.**, v. 79, n. 1, p. 64-73, 1987.

STACKELBERG et al. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking water treatment plant. **Sci. Total Environ.**, v. 329, p. 99-113, 2004.

STAN, H.J., HEBERER, T., 1997. Pharmaceuticals in the aquatic environment: water analysis. **Analysis** 25, M20–M23

STAPLES C. A., DORN P. B., KLECKA G. M., O'Block S. T. and Harris L. R. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. **Chemosphere**, v.36, p. 2149-73, 1998

STUMPF et al. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Sci. Total Environ.**, v. 225, p. 135–141, 1999.

SUSAN et al. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. **Anal. Chem.**, v. 83, n. 12, p. 4614-4648, 2011.

TAYLOR et al. A research strategy for investigating the ecological significance of endocrine disruption: report of a UK workshop. **Sci. Total Environ.**, v. 133, p. 181, 1999.

TERNES et al. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **Sci. Total Environ.**, v. 225, p. 81, 1999.

TERNES et al. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 938, p.175, 2001.

THUY, H. T. T.; NGUYEN, T. D. The potential environmental risks of pharmaceuticals in Vietnamese aquatic systems: case study of antibiotics and synthetic hormones. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 11, p. 8132-8140, 2013.

TIJANI, J., FATOBA, O., PETRIK, L. A Review of Pharmaceuticals and Endocrine-Disrupting Compounds: Sources, Effects, Removal, and Detections. **Water Air Soil Pollution**, v. 224, p. 1770, 2013.

TROVÓ et al. Photodegradation of the pharmaceuticals amoxicillin, bezafibrate and paracetamol by the photo-Fenton process—Application to sewage treatment plant effluent. **J. Photochem. Photobiol. A**, v. 198, n. 2-3, p. 215, 2008.

TSAI, WT. Human Health Exposure Risk on Environmental Exposure to Bisphenol A: a review. **J. Environ. Sci. Health Part C**, v. 24, p. 225-255, 2006.

TSAI, Wt., Human Health Exposure Risk on Environmental Exposure to Bisphenol A: a review, **J. Environ. Sci. Health Part C**, v. 24, p. 225-255, 2006

TSE, A. C. K. et al. A rapid screening test for endocrine disrupting chemicals using primary cell culture of the marine medaka. **Aquatic Toxicology**, v. 144–145, p. 50-58, 2013.

U.S. EPA. 1997. Special report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis. Office of Research and Development, EPA/630/R-96/012, Washington D.C.

VAZ et al. Avaliação da eficiência de diferentes coagulantes na Remoção de Cor e Turbidez em Efluente de Galvanoplastia, **Eclética Química**, v.35, n.4, 2010

VERLIEFDE, A.; Cornelissen, E.; Amy, G.; Bruggen, B. V.; Dijk, H.; **Environ. Pollut.**, v. 146, p. 281, 2007

VERBRUGGEN, E. M. J.; Van den BRINK, P. J. Review of recent literature concerning mixture toxicity of pesticides to aquatic organisms. Report 601400001/2010.

VIDAL-DORSCH, D. E. et al. Contaminants of emerging concern in municipal wastewater effluents and marine receiving water. **Environmental Toxicology and Chemistry** v. 31, n. 12, p. 2674-2682, 2012.

VÖLKEL et al. Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 15, p. 1281–1287, 2002.

WEIGEL et al. Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea. **Sci. Total Environ.**, v. 295, p. 131, 2004.

WESTERHOFF et al. Fate of endocrine disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes. **Environ. Sci. Technol.**, v.39, n. 17, p. 6649 – 6663, 2005.

WHO, Guidelines for Drinking-Water Quality (World Health Organization), Geneva, 2011 http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548151_eng.pdf acessado em junho, 2014

WILBERT et al. The desalting and water treatment manual: A guide to membranes for municipal water treatment. R-98-05. 2nd edition. U.S. Department of the Interior. Bureau of Reclamation, 1998.

XIAO et al. Analysis of estrogens in river water and effluents using solid-phase extraction and gas chromatography–negative chemical ionisation mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives. **J. Chromatogr. A**, v. 923, p. 195, 2001.

YANG et al. Effect of pH on the coagulation performance of Al-based coagulants and residual aluminum speciation during the treatment of humic acid-kaolin synthetic water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 178, n.1-3, p. 596-603, 2010.

ZHANG et al. Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. **Chemosphere** v. 73, p. 1151–1161, 2008

ZHAO et al. Coagulation performance and floc characteristics with polyaluminum chloride using sodium alginate as coagulant aid: A preliminary assessment. **Chemical Engineering Journal**, v. 183, p. 387-394, 2012.

ZORITA, S.; MÅRTENSSON, L.; MATHIASSON, L. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. **Sci. Total Environ.**, v. 407, p. 2760-2770, 2009.

ANEXO

26/5/2014

Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 7080837/1 - Natália Guimarães de Figueiredo

Email: nataliaguimaraes@usp.br
Data de Nascimento: 19/04/1984
Cédula de Identidade: RG - 20.502.914-3 - RJ
Local de Nascimento: Estado do Rio de Janeiro
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Universidade Federal Fluminense - Rio de Janeiro - Brasil - 2007
Mestrado: Mestre em Química (1) - Universidade Federal Fluminense - Rio de Janeiro - Brasil - 2009

Curso: Doutorado
Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula: 04/02/2010
Início da Contagem de Prazo: 04/02/2010
Data Limite para o Depósito: 04/06/2014
Orientador: Prof(a). Dr(a). Ernani Pinto Junior - 04/02/2010 até o presente. E.Mail: ernani@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 21/10/2010
Prorrogação: 120 dias
 Período de 04/02/2014 a 04/06/2014
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 17/04/2012
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Doutorado em 04/02/2010
 Prorrogação em 03/12/2013
 Matrícula de Acompanhamento em 10/02/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013)

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 10/02/2014

Impresso em: 26/05/14 17:43:03

26/5/2014

Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 7080837/1 - Natália Guimarães de Figueiredo

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5813-2/3	Aplicações de Cromatografia em Análises Toxicológicas	01/03/2010	04/04/2010	60	4	85	A	N	Concluída
FBF5704-5/3	Análise Espectrométrica de Fármacos	02/03/2010	14/06/2010	150	10	93	A	N	Concluída
FBC5802-2/3	Tópicos Avançados em Toxicologia I	08/03/2010	21/06/2010	30	2	95	A	N	Concluída
FBF5706-6/3	Preparação e Emprego de Padrões Farmacêuticos	02/08/2010	12/09/2010	60	4	80	A	N	Concluída
FBC5803-1/2	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	03/08/2010	16/08/2010	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5784-2/4	Tópicos Avançados em Toxicologia II	17/08/2010	14/12/2010	30	2	80	A	N	Concluída
QFL5921-6/1	Conceitos Básicos de Espectroscopia (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	02/09/2010	16/12/2010	150	0	0	-	N	Matrícula cancelada
EDM5102-2/2	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	21/09/2010	01/11/2010	60	4	80	A	N	Concluída
FBF5779-1/3	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	08/04/2011	09/06/2011	90	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBC5883-5/1	Avaliação da Toxicidade de Contaminantes em Amostras Ambientais	09/08/2012	19/09/2012	60	4	100	B	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	10	20	32
Estágios:			
Total:	10	20	32

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria nº 524, de 29.04.2008.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 10/02/2014

Impresso em: 26/05/14 17:43:03