

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA  
CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA**

**LETICIA DARLLA CORDEIRO**

**ANÁLISE DE HORMÔNIOS EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS E  
NATURAIS, DERIVADA DA EXTRAÇÃO COM PONTEIRAS  
DESCARTÁVEIS E DETECÇÃO POR HPLC-FL**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**CAMPO MOURÃO  
2018**

**LETICIA DARLLA CORDEIRO**

**ANÁLISE DE HORMÔNIOS EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS E  
NATURAIS, DERIVADA DA EXTRAÇÃO COM PONTEIRAS  
DESCARTÁVEIS E DETECÇÃO POR HPLC-FL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Superior de Licenciatura em Química do Departamento Acadêmico de Química – DAQUI – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do Título de Licenciado em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Marcilene Ferrari Barriquello Consolin.

Co-orientador: Msc. Leonardo Valderrama

**CAMPO MOURÃO**

**2018**



---

## TERMO DE APROVAÇÃO

### **ANÁLISE DE HORMÔNIOS EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS E NATURAIS, DERIVADA DA EXTRAÇÃO COM PONTEIRAS DESCARTÁVEIS E DETECÇÃO POR HPLC-FL**

por

LETICIA DARLLA CORDEIRO

Este trabalho foi apresentado em 28 de Junho de 2018 como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciada em Química. A Candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

---

Prof. Dr. Nelson Consolin Filho  
(UTFPR)

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Estela dos Reis Crespan  
(UTFPR)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcilene F. Barriquello  
Consolin  
(UTFPR)  
*Orientadora*

## RESUMO

Os meios hídricos são um meio receptor de esgotos domésticos, industriais e agropecuários, e, portanto, são o principal veículo de dispersão ambiental dos poluentes químicos. Por este motivo, a problemática do ambiente e mais concretamente, da água, continua a ser um tema atual a nível nacional e internacional. O crescimento das cidades e a grande concentração populacional nos centros urbanos, aliados a um saneamento precário e a novos hábitos de consumo, têm contribuído para lançar nos mananciais (rios, lagos e depósitos subterrâneos) milhares de substâncias conhecidas como contaminantes emergentes, resultantes das atividades humanas. Contaminantes emergentes apresentam, em ambientes aquáticos naturais, concentrações muito baixas, situando-se na faixa de  $\mu\text{g L}^{-1}$  a  $\text{ng L}^{-1}$ , em alguns casos, níveis de concentração ainda mais baixos já foram analisados, portanto, torna-se necessário que o preparo de amostras seja eficiente para concentrar e minimizar as interferências para a determinação desses contaminantes emergentes. Este trabalho envolveu um estudo em que, a partir do uso de ponteiras descartáveis (DPX) fez-se a extração dos contaminantes emergentes, no caso os hormônios femininos, a partir de águas residuárias e naturais. Após o procedimento de extração fez-se a determinação dos hormônios presentes nas amostras de água através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Acoplamento de Fluorescência (HPLC-FL). Os resultados mostraram a presença de três hormônios nas amostras, o estriol, o *B*-Estradiol e o 17- $\alpha$ -Ethinilestradiol, com concentrações na faixa de  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A extração utilizando DPX mostrou-se muito eficiente apesar do método ser relativamente novo. Trata-se de um método único no qual o solvente contido livremente no interior de uma ponteira é completamente misturado a solução de amostra por meio da aspiração de ar. Esta mistura dinâmica da fase sólida dispersiva amostra favorece o rápido equilíbrio de sorção do analito. Já a menor massa de sorvente, resulta em menores volumes de amostra e de solvente orgânico. Além disso, a extração por DPX pode ser facilmente automatizada juntamente com a detecção em HPLC-FL.

**Palavras chave:** Hormônios, preparo de amostra, DPX, HPLC-FL.

## ABSTRACT

Water resources are a means of receiving domestic, industrial and agricultural sewage and, therefore, are the main vehicle for the environmental dispersion of chemical pollutants. For this reason, the issue of the environment, and more specifically of water, remains a current issue at national and international level. Urban growth and population concentration in urban centers coupled with precarious sanitation and new consumption habits have contributed to the launching of thousands of substances known as emerging pollutants (rivers, lakes and underground deposits) human beings. Emerging pollutants present very low concentrations in natural aquatic environments, ranging from  $\mu\text{g L}^{-1}$  to  $\text{ng L}^{-1}$ , in some cases even lower concentration levels have already been analyzed, therefore, it is necessary that the preparation of samples is efficient to concentrate and minimize interference for the determination of emerging contaminants. This project involved a study in which, from the use of disposable tips (DPX), the emergent contaminants were extracted, in this case the female hormones, from wastewater and natural waters. After the extraction procedure, the hormones present in the water samples were analyzed by Fluorescence Coupling High-Performance Liquid Chromatography (HPLC-FL). The results showed the presence of three hormones in the samples, estriol, B-Estradiol and 17- $\alpha$ -Ethinyl estradiol, with concentrations in the  $\mu\text{g L}^{-1}$  range. Extraction using DPX proved to be very efficient despite the relatively new method. It is a single method in which the sorbent contained freely within a tip is thoroughly mixed with the sample solution through the aspiration of air. This dynamic mixture of the solid dispersive-sample phase favors the rapid equilibrium sorption of the analyte. The lower sorbent mass results in lower sample and organic solvent volumes. In addition, DPX extraction can be easily automated along with HPLC-FL detection.

**Keywords:** Hormones, sample preparation, DPX, HPLC-FL.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus por me dar a vida e força para alcançar meus objetivos.

Aos meu pais Ivete e José que me insentivaram em todos os momentos da minha vida e abdicaram de muitas coisas para que eu pudesse estar aqui.

As minhas irmãs Marciele, Tatiane, Priscila e Talita por todo companheirismo. E a Talita e Priscila que me deram dois presentes: Vinicius e Gabriel. Ao Lucas por todo carinho e compreensão nessa caminhada. Ao meu tio José por todas as palavras de incentivo no inicio do curso. Ao meu cunhado Junior que sempre se dispôs a me ajudar nas disciplinas de cálculo.

Aos meus amigos que estiveram presentes em todos os momentos da graduação me ajudando em todos os momentos: Vitória, com quem eu pude compartilhar os melhores e piores momentos, sempre juntas. Bruno e Edson e Pamela pela amizade. E todos os outros que estiveram presentes nessa caminhada.

Aos meus professores que contribuíram imensamente para a realização de um sonho, agradeço a todos.

A Profa. Dra. Marcilene Ferrari Barriquello Consolin e ao Msc. Leonardo Valderrama pela orientação, ajuda e compreensão durante a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

A Profa. Dra. Patrícia Valderrama, Prof. Dr. Oldair Leite, Dra. Daneysa Lahis Kalschne, Dra. Aline Coqueiro, Profa. Msc. Vanessa Jorge dos Santos, Profa. Dra. Estela dos Reis Crespan e Prof. Dr. Nelson Consolin Filho pela valiosa colaboração na realização deste trabalho.

Aos técnicos por sua valiosa e prestativa ajuda no laboratório de química.

Ao Departamento Acadêmico de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Campo Mourão.

A todos que de alguma forma fizeram parte desses cinco anos que estive na Universidade.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

17-EE - 17 $\alpha$ -etinilestradiol, do inglês *17  $\alpha$ -ethinylestradiol*

betaETS - 17 $\beta$ -estradiol

CE – Contaminantes Emergentes

DAD - Detector por arranjo de diodos, do inglês *Diode Array Detection*

DE – Desreguladores Endócrinos

DPX – Extração com ponteira descartável, do inglês *disposable pipette extraction*

D-SPE - extração em fase sólida dispersiva, do inglês *solid phase dispersive extraction*

EST – Estriol

ETR – Estrona

ETE – Estação de Tratamento de Esgoto

FL – Fluorescência, do inglês *Fluorescence*

GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas, do inglês *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

LC-FL - Cromatografia Líquida acoplado a Fluorescência, do inglês *Liquid Chromatography - Fluorescence*

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas, do inglês *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*

SPE – Extração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

SPME – Microextração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Microextraction*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>12</b>
2.1 CONTAMINANTES EMERGENTES .....	12
2.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS .....	16
2.3 DETECÇÃO DOS CONTAMINANTES EMERGENTES .....	17
2.4 EXTRAÇÃO COM PONTEIRAS DESCARTÁVEIS .....	20
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>4 MATERIAL E METODOS</b> .....	<b>23</b>
4.1 COLETA DE AMOSTRAS .....	23
4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES .....	23
4.3 PREPARO DE AMOSTRAS .....	23
4.3.1 LIMPEZA .....	24
4.3.2 EXTRAÇÃO .....	24
4.3.3 DESSORÇÃO .....	24
4.4 ANÁLISE DOS CONTAMINANTES EMERGENTES .....	24
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	25
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>26</b>
5.1 DETERMINAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS HORMÔNIOS .....	26
5.2 AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE PONTEIRAS DESCARTÁVEIS .....	30
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>34</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O crescimento das cidades e o conseqüente adensamento populacional, aliados ao saneamento precário e a novos hábitos de consumo, têm contribuído para lançar nos mananciais (rios, lagos e depósitos subterrâneos) centenas de substâncias conhecidas como contaminantes emergentes (CE) resultantes de contaminação antrópica. Os contaminantes que estão presentes na água em baixas concentrações, segundo Valderrama (2018) os sistemas de tratamento de esgoto ainda são ineficientes contra os CE, permitindo assim a passagem de alguns contaminantes, como os desreguladores endócrinos.

Essas substâncias denominadas desreguladores endócrinos são uma categoria recente de poluentes ambientais que interferem nas funções do sistema endócrino.

Os CE são encontrados no meio ambiente em concentrações da ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$  e  $\text{ng L}^{-1}$  e são suspeitas de causarem efeitos adversos à saúde humana e animal. As substâncias classificadas como DE, incluindo substâncias naturais e sintéticas, podem ser agrupadas em duas classes: 1. substâncias sintéticas, utilizadas na agricultura e seus subprodutos, como pesticidas; utilizadas nas indústrias e seus subprodutos, como dioxinas. Compostos farmacêuticos, como os estrogênios sintéticos (DE) e 17 $\alpha$ -etinilestradiol e, 2. substâncias naturais - fitoestrogênios, tais como, genisteína e metaresinol e estrogênios naturais 17 $\beta$ -estradiol, estrona e estriol (BILA; DEZZOTI 2007).

Inúmeras atividades contribuem para o aporte de substâncias químicas no ambiente. Entretanto, o descarte de esgoto bruto e de efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) são consideradas fontes majoritárias de contribuição de inúmeros contaminantes emergentes para sistemas aquáticos. (FEITOSA; SODRÉ; MALDANER, 2013, p.1170)

Devido à complexidade das matrizes investigadas e aos baixos níveis de concentração das substâncias de interesse, o desenvolvimento de métodos analíticos destinados à determinação de diversas substâncias em matrizes

ambientais é, atualmente, um dos mais importantes desafios da Química Analítica.

De um modo geral amostras complexas (alimentos, fluidos biológicos, amostras ambientais) necessitam de um método de preparo de amostra antes da análise Cromatográfica de Alta Eficiência (HPLC). O preparo pode ir desde uma simples etapa de limpeza ou até mesmo na utilização de métodos mais elaborados.

Segundo Lanças (2004) os mais comuns são Extração em Fase Sólida e Extração em Fase Líquida, recentemente a técnica analítica mais usada no preparo de amostras complexas para análise era a Extração Líquido-Líquido que baseia-se na solubilidade relativa dos analitos presentes na amostra em dois solventes idealmente imiscíveis. A Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) é uma técnica baseada nos mecanismos de separação da Cromatografia Líquida de Baixa Pressão, também conhecida como Cromatografia Clássica. Porém essas duas técnicas requerem o uso de muito solvente, além do uso também de solventes tóxicos e isso seria uma das limitações das técnicas.

Por esse motivo vem crescendo o uso de técnicas de microextração, uma das mais comuns é a Microextração em Fase Sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Microextraction*) que baseia-se na adsorção dos analitos em uma fibra de sílica coberta com uma camada de solvente. A fibra é introduzida diretamente na amostra aquosa ou gasosa, e, por partição, concentrando o analito em sua superfície. Posteriormente, os analitos são dessorvidos termicamente em um cromatógrafo a gás. É uma técnica que em vista das outras já citadas não requer o uso de solventes orgânicos, porém ela apresenta um custo elevado e é relativamente demorada (LANÇAS, 2004).

Como alternativa a essas técnicas de extração citadas surgiu a Extração em Ponteiros Descartáveis (DPX, do inglês *Disposable Pipette Extraction*), que supera os problemas encontrados nas demais técnicas. A DPX é uma modificação da SPE convencional desenvolvida pelo Dr. William Brewer (University of South Carolina, EUA) para reduzir significativamente o tempo de extração e a quantidade de solventes. O aparelho para a extração DPX consiste em uma ponta de pipeta padrão com uma capacidade de 1 ou 5 mL, preenchida com estirenodivinilbenzeno (BORDIN; ALVES; CAMPOS; MARTINIS; 2016)

Além dos vários benefícios da técnica de DPX, a mesma possui potencial para ser utilizada *in situ* e *in loco* na determinação de micropoluentes emergentes em estações de tratamento de água e esgoto. (FEITOSA; SODRÉ; MALDANER, 2016, p.1172).

Dentro deste contexto, este trabalho apresenta um estudo dos contaminantes emergentes, ou seja, os micropoluentes em águas naturais e residuárias, objetivando a caracterização destes contaminantes emergentes no ambiente, envolvendo o método analítico de extração em ponteiras descartáveis. É importante salientar que uma vez em que forem detectados esses contaminantes existe a possibilidade de utilizar as informações obtidas como indicadores de interesse para a área de preparo de amostra para a determinação de hormônios presente no ambiente.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CONTAMINANTES EMERGENTES

Independentemente das discussões que cercam o tema da água, é possível fazer uma afirmação segura e indiscutível: a água é um bem natural, vital, insubstituível e comum. Nenhum ser vivo, humano ou não humano, pode viver sem a água. A ONU no dia 21 de julho de 2010, aprovou esta resolução: “a água potável e segura e o saneamento básico constituem um direito humano essencial” (BOFF, 2015).

Os meios hídricos são um meio receptor de esgotos domésticos, industriais e agropecuários e, portanto, são o principal veículo de dispersão ambiental dos poluentes químicos. Por este motivo, a problemática do ambiente e, mais concretamente, da água, continua a ser um tema atual a nível nacional e internacional (GAFFNEY, 2014).

Dentro desse tema envolvendo poluentes químicos em águas, podemos citar os contaminantes emergentes. Os contaminantes emergentes são compostos que têm sido detectados nos diferentes compartimentos ambientais, tanto os de origem antrópica como aqueles de ocorrência natural, que podem apresentar algum risco ao ecossistema e que não estão incluídos nos programas de monitoramento de rotina, ou seja, ainda não são legislados. Estes são candidatos a uma futura regulamentação dependendo dos resultados obtidos em estudos de ecotoxicidade, efeitos à saúde humana e animal, potencial de bioacumulação, transporte e destino no ambiente, além da concentração e quantidade em que são lançados no meio (PETROVIC, et al., 2006). A descarga de contaminantes químicos emergentes para o meio aquático tem sido alvo de preocupação por parte da comunidade científica internacional, uma vez que, anualmente são sintetizados numerosos compostos químicos, os quais são lançados para o meio ambiente com consequências imprevisíveis, surgindo constantemente novas evidências sobre a sua toxicidade. (RICHARDSON; TERNES, 2011).

Diversos grupos de substâncias têm sido considerados contaminantes emergentes, incluindo, novos agrotóxicos, drogas ilícitas, fármacos, produtos de higiene pessoal, protetores solares, estrogênios, alquilfenóis e seus derivados,

alguns sub-produtos provenientes de processos de desinfecção de água, retardantes de chama bromados, compostos perfluorados, siloxanos, benzotriazóis, ácidos naftênicos, percloratos, líquidos iônicos, dioxinas, o antimônio, além dos nanomateriais e alguns microorganismos e toxinas de algas (RICHARDSON; TERNES, 2011).

Porém as concentrações de muitos contaminantes emergentes em ambientes aquáticos naturais são geralmente muito baixas, situando-se na faixa de  $\mu\text{g L}^{-1}$  a  $\text{ng L}^{-1}$ . Em alguns casos, níveis de concentração ainda mais baixos já foram analisados (WEIGEL et al., 2002; KUCH; BALSCHIMITTER, 2001)

O Quadro 1 mostra alguns exemplos de contaminantes emergentes e suas referentes concentrações.

**Quadro 1** - Exemplos de ocorrência de alguns contaminantes emergentes no mundo em amostras de água superficial.

Contaminante	Uso	Concentração máxima ( $\text{ng L}^{-1}$ )	Tipo de corpo d'água	Local
Caféina	Estimulante	16,1	Mar	Alemanha
17 $\alpha$ -etinilestradiol	Anticoncepcional	831	Rio	EUA
Estrôna	Hormônio	22	Rio	Espanha
Amoxicilina	Antibiótico	17	Rio	Brasil
Diclofenaco	Antiinflamatório	266	Rio	Costa Rica
Atenolol	Anti-hipertensivo	690	Rio	Coréia do Sul

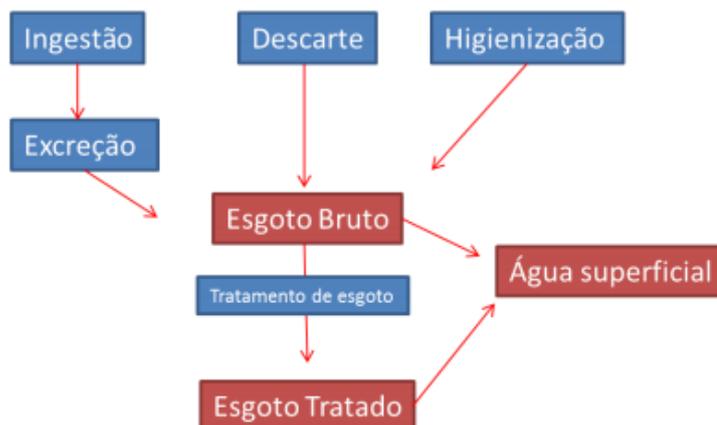
Fonte: Santana (2013)

Contaminantes como o 17  $\alpha$ -etinilestradiol são também classificados como desreguladores endócrinos. Segundo a *United States Environmental Protection Agency* (USEPA), um desregulador endócrino é “um agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento” (USEPA, 2012). Desreguladores endócrinos são capazes de minimizar ou bloquear a ação de hormônios no organismo. Estes também podem afetar a síntese, o transporte, o metabolismo e a excreção desses hormônios; desregulando, portanto, o sistema endócrino de cada indivíduo (GHISELLI; JARDIM, 2007).

A Figura 1 mostra um esquema de como esses contaminantes podem

chegar nas redes de esgotos e posteriormente em águas superficiais.

**Figura 1** - Meios de entrada de contaminantes emergentes em águas superficiais.

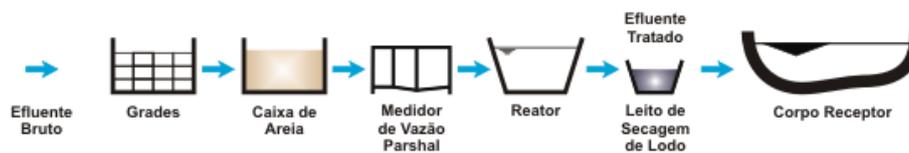


Fonte: Santana (2013, p. 4)

A partir da Figura 1 é possível analisar que contaminantes emergentes se dão por meios de descarte, seja na excreção, higienização ou mesmo no rejeitos, que são atos praticados frequentemente por toda sociedade. Esse esgoto, tratado ou não, chega às águas superficiais levando ao aparecimento de muitas espécies químicas estranhas ao meio, incluindo os contaminantes emergentes. Há também outras fontes de contaminação, que incluem a lixiviação de substâncias e o lodo proveniente das estações de tratamento de esgoto (SANTANA, 2013).

As estações de tratamentos de esgotos (ETE's) possuem quatro níveis de tratamento como podemos analisar na Figura 2.

**Figura 2** - Meios de entrada de contaminantes emergentes em águas superficiais.



**Fonte:** Sanep (2018)

O tratamento preliminar objetiva apenas a remoção dos sólidos grosseiros, enquanto o tratamento primário visa a remoção de sólidos sedimentáveis e em decorrência, a parte da matéria orgânica. Em ambos predominam os mecanismos físicos de remoção de poluentes. Já no tratamento secundário, no qual dominam mecanismos biológicos, o objetivo é principalmente a remoção de matéria orgânica e eventualmente nutrientes (nitrogênio e fosforo). O tratamento terciário objetiva a remoção de poluentes específicos (usualmente tóxicos ou compostos não biodegradáveis) ou ainda a remoção complementar de poluentes não suficientemente removidos no tratamento secundário (SPERLING, 2017).

Entretanto o destino e os efeitos de contaminantes emergentes em águas brasileiras ainda tem sido pouco discutido na literatura. Lembrando que a principal via de aporte deles em águas superficiais não está relacionada à contribuição dos efluentes de ETE, mas sim ao aporte de esgoto bruto, uma vez que aproximadamente 67% dos domicílios brasileiros não possuem rede coletora de esgoto e, apenas de 33% dos municípios tem acesso a esgoto tratado. Muitos municípios, apesar de coletar, descartam o esgoto bruto diretamente nos rios, mesmo aqueles que são utilizados como fonte de água para abastecimento público da região (IBGE, 2010).

Portanto tendo-se em vista esses níveis de concentração, é possível perceber a necessidade do uso de técnicas e métodos analíticos que apresentem limites de detecção baixos o suficiente para detectar a presença de contaminantes emergentes no ambiente.

## 2.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

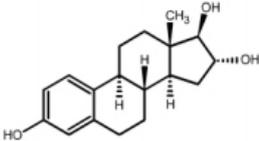
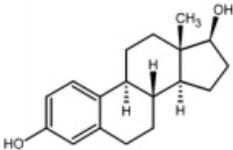
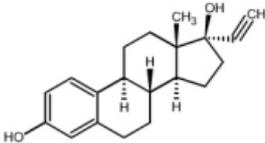
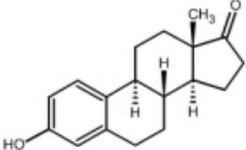
A toxicidade de diversos poluentes ambientais tem sido habitualmente investigada quanto a sua teratogenicidade e carcinogenicidade em seres humanos e demais espécies. Nas últimas décadas, entretanto, o interesse de pesquisadores vem sendo despertado para os efeitos adversos sobre o sistema endócrino observados em alguns ecossistemas e animais de laboratório expostos a químicos ambientais. (FONTANELE et al., 2010).

Desreguladores endócrinos são moléculas pequenas que possuem a capacidade de mimetizar alguns hormônios esteroidais ou da tireóide, comprometendo os processos reprodutivos, de desenvolvimento e de manutenção da homeostase celular (SODRÉ et al., 2007). Os desreguladores endócrinos podem perturbar o funcionamento do sistema endócrino, mimetizando hormônios naturais, estimulando a formação de mais receptores hormonais, bloqueando sítios receptores em uma célula, acelerando a síntese e a secreção de hormônios naturais, desativando enzimas responsáveis pela secreção de hormônios e/ou destruindo a habilidade dos hormônios em interagir com os receptores celulares (SODRÉ et al., 2007).

Esses efeitos prejudiciais podem levar ao desenvolvimento de doenças como câncer, desenvolvimento sexual anormal, como por exemplo, a redução da fertilidade masculina ou aumento nas chances de a mulher desenvolver ovário policístico. Essas substâncias também são prejudiciais ao desenvolvimento e reprodução de animais. Os estrógenos vêm sendo alvo de várias pesquisas pois são compostos extremamente ativos biologicamente e estão relacionados a vários tipos de câncer. (SCHIAVINI; CARDOSO; RODRIGUES, 2011).

Os hormônios são amplamente utilizado como método contraceptivo e em terapias de reposição hormonal, os naturais são produzidos pelo corpo humano e encontrados em rios e mananciais por meio da excreção da urina e fezes (OTOMO, 2010). A persistência da atividade dos estrógenos em ambientes aquáticos é devido, na maioria dos casos, à disposição inadequada de esgoto sanitário e industrial, pelo déficit de infraestrutura em saneamento, coleta ou tratamento. A Tabela 1 mostra a estrutura química de alguns estrógenos que serão utilizados no trabalho.

**Tabela 1** – Estrutura dos hormônios

Analito	Fórmula estrutural
Estriol	
17β-estradiol	
17α-etinilestradiol	
Estrona	

**Fonte:** Adaptado de Valderrama (2018)

Os estrógenos são usualmente analisados em água através das técnicas analíticas: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD, do inglês *High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detection*), com Detector de Espectrometria de Massas (LC-MS, do inglês *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*), com Detector de Fluorescência (LC-FL do inglês *Liquid Chromatography - Fluorescence*) e Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*). (VALDERRAMA, 2018).

### 2.3 DETECÇÃO DOS CONTAMINANTES EMERGENTES

A cromatografia pode ser conceituada como um método físico-químico de separação, no qual os constituintes da amostra a serem separados são particionados entre duas fases, uma estacionária geralmente de grande área, e a outra um fluído insolúvel, na fase estacionária que flui através da primeira. Por

esse conceito a fase estacionária empregada pode ser um sólido ou um líquido, enquanto que a fase móvel poderá ser um fluido líquido, um gás ou um gás em condições supercríticas (acima da temperatura crítica e a altas pressões). Se a fase móvel for um líquido, a cromatografia será cromatografia a líquido ou cromatografia em fase gasosa. Se a fase móvel for um gás ou um vapor, a cromatografia será a gás ou cromatografia em fase gasosa (CIOLA, 1998).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) é nos dias de hoje, a técnica analítica de separação mais utilizada, por ser um método muito sensível capaz de determinações quantitativas, adequado para separações de espécies não-voláteis, espécies termicamente frágeis e por ser aplicável a diversas substâncias de interesse para a indústria, medicina, ciência, entre outros. Os materiais que podem ser analisados por este método são diversos, e entre estes estão: as proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarbonetos, drogas, pesticidas, antibióticos, várias substâncias inorgânicas (CIOLA, 1998).

Junto ao HPLC tem-se acoplados os detectores de fluorescência que medem as mudanças da fluorescência no efluente das colunas quando este for exposto a comprimentos de onda selecionados. Os detectores de fluorescência oferecem uma maior sensibilidade e seletividade, que permite quantificar e identificar compostos e impurezas em matrizes complexas em níveis extremamente baixos. Os detectores de fluorescência detectam apenas substâncias que apresentam fluorescência (JARDIM, 2010).

O princípio da fluorescência molecular baseia-se na absorção da radiação eletromagnética de um determinado comprimento de onda e a emissão da radiação de menor energia, portanto, de comprimento de onda maior. Moléculas cuja estrutura são formadas por anéis aromáticos, ligações duplas conjugadas e grupos ácidos favorecem esse fenômeno e podem ser identificadas usando o detector por fluorescência. Cada composto possui energias de emissão e excitação características (SODRÉ et al., 2007).

Porém é necessário realizar um preparo da amostra antes de injetá-lo no HPLC-FL. Assim existem alguns métodos que são muito utilizados, como a extração em fase sólida (SPE) que foi introduzida em 1976, e, hoje, consiste no método mais popular de preparo de amostra, sendo muito utilizada em laboratórios para análises de rotina e possui um vasto campo de aplicação como análises de fármacos, alimentos e meio ambiente e nas áreas de bioquímica e

de química orgânica (JARDIM, 2010).

As vantagens apresentadas pela SPE em comparação com a Extração Líquido-Líquido Clássica são: menor consumo de solvente orgânico, não formação de emulsões, facilidade de automação, altas porcentagens de recuperação do analito, volumes reduzidos de resíduos tóxicos, capacidade de aumentar seletivamente a concentração do analito e disponibilidade comercial de muitos equipamentos e sorventes para SPE. Em comparação com técnicas de microextração a SPE apresenta como desvantagens a grande quantidade do uso de solvente, os altos custos dos cartuchos e dos dispositivos comerciais multivias, e, eventualmente a dificuldade em selecionar o sorvente adequado para a aplicação desejada. Além disso, os cartuchos são utilizados uma única vez e, geralmente, há baixa reprodutibilidade de lote para lote de cartucho (BARRIONUEVO; LANÇAS, 2011).

A SPE deu origem a algumas técnicas de microextração, como a Microextração por Fase Sólida (SPME), que é uma promissora técnica de extração e baseia-se originalmente na adsorção dos analitos em uma fibra de sílica coberta com uma camada de sorvente. A fibra é introduzida diretamente na amostra aquosa e, por partição, concentra o analito em sua superfície. Posteriormente, os analitos são dessorvidos termicamente em um cromatógrafo a gás. É um método rápido, que não requer o uso de solventes. A técnica não requer grande uso de solventes orgânicos, porém é considerada uma técnica de alto custo e de grande demora (VALENTE; AUGUSTO, 2000)

As tendências atuais apontam no sentido da utilização de menores quantidades de amostras, até mesmo para análises de traços; obtenção de maior seletividade e especificidade na extração; aumento no potencial para automação ou utilização de métodos “online”, reduzindo assim a operação manual; desenvolvimento de métodos menos agressivos ao meio ambiente, com menor desperdício e, o uso de quantidade mínima ou nenhuma de solventes orgânicos.

Sendo assim podemos destacar a técnica de Extração em Ponteiros Descartáveis (DPX), permite rápida extração de amostras em soluções, porém é utilizado ponteiros descartáveis ao invés de cartuchos ou tubos de ensaio.

## 2.4 EXTRAÇÃO COM PONTEIRAS DESCARTÁVEIS

A extração em ponteira descartável (DPX), surgiu como uma alternativa a SPE convencional. Fruto de uma patente (n° US6566145 B2) de 2003 desenvolvida pelo Dr. William Brewer (Universidade da Carolina do Sul, EUA) de maneira original e simples, a DPX trata-se de uma ponteira padrão de pipeta (1 ou 5 mL), modificada, na qual uma pequena quantidade de sorvente está contido livremente em seu interior entre dois filtros. Um dos filtros é colocado na extremidade inferior e outro na extremidade superior da ponteira. O primeiro (que pode ser uma tampa de vidro sintetizado, de lã de vidro, de polímero poroso, ou de metal), tem como finalidade proporcionar uma barreira permeável que permita a passagem livre dos fluídos em qualquer direção (aspiração/dispensação), ao mesmo tempo em que retém a fase extratora. O segundo, colocado na extremidade superior, impede a passagem de qualquer material sólido ou fluído para o interior da pipeta, assegurando a não contaminação da mesma e a retenção do sorvente. Este segundo filtro é de preferência constituído de vidro sintetizado, de um polímero poroso, ou de uma membrana semipermeável (Figura 3) (PINTO et al., 2015).

**Figura 3** - Esquema de uma ponteira DPX.



Fonte: Pinto e Queiroz (2015)

A técnica DPX, quando comparada SPE, requer menor massa de

material sorvente, além de dispensar a utilização de vácuo. Em geral, esta técnica minimiza as etapas necessárias de condicionamento, e, portanto, acelera o processo de preparo de amostra. Trata-se de um método único no qual o sorvente contido livremente no interior de uma ponteira é completamente misturado a solução de amostra por meio da aspiração de ar. Esta mistura dinâmica da fase sólida dispersiva- amostra favorece o rápido equilíbrio de sorção do analito. Já a menor massa de sorvente, resulta em menores volumes de amostra e de solvente orgânico. Além disso, a extração por DPX pode ser facilmente automatizada. A principal vantagem da extração por DPX, especialmente quando se utiliza um aparelho semi- automatizado simples, é alta frequência analítica (GUAN et al., 2009).

A extração por DPX tem sido utilizada em diversas aplicações. Li et al. (2012) trabalharam com a determinação de pesticidas em grãos; Chaves et al. (2015) analisaram a presença de antidepressivos no plasma; Guan et al. (2010) estudaram a presença de pesticidas em frutas e vegetais; Scheidweiler et al. (2016) conseguiram determinar drogas de abuso presentes no sangue.

No entanto, mais recentemente, a DPX vem sendo descrita como uma ferramenta essencial para a purificação e concentração de proteínas e peptídeos em genômica, proteômica, metabolômica. E embora, a literatura científica sobre a utilização da DPX na determinação de fármacos em fluidos biológicos seja ainda limitada, sua simplicidade na operação, variedade de sorventes disponíveis e capacidade de automatização geram várias vantagens também a este seguimento (KOLE et al., 2011).

As técnicas de extração miniaturizadas, como a DPX, têm se tornado uma importante ferramenta na etapa de preparo de amostra. Esta inovadora técnica, baseada nos princípios de sorção da Extração em Fase Sólida Dispersiva (D- SPE) e nas etapas da SPE miniaturizada, minimiza o tempo de extração, pois necessita de apenas poucos minutos para a obtenção de eficiente extração e favorece o emprego de pequenos volumes de amostra e de solvente orgânico. Estas vantagens explicam a crescente aplicação da técnica DPX na etapa de preparo de amostras para a determinação de diferentes analitos, especialmente pesticidas, na área ambiental e drogas de abuso, nas análises forenses (PINTO et al., 2015).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBEJTIVO GERAL

O trabalho teve como finalidade caracterizar os micro poluentes emergentes em águas naturais, no esgoto bruto e nos efluentes tratados em Estações de Tratamento de Esgoto (ETE).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Determinar micro poluentes emergentes em águas naturais, no esgoto bruto e efluentes tratados em ETE's;
- ii) Avaliar a variação da concentração dos micro poluentes emergentes em águas naturais, no esgoto bruto e efluentes tratados em ETEs;
- iii) Aplicar a técnica DPX para a extração dos micro poluentes emergentes.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA DE AMOSTRAS

Para a determinação dos contaminantes emergentes, hormônios femininos, coletou-se amostras de esgoto bruto e tratado. Essa coleta foi realizada em uma Estação de Tratamento de Esgoto. Depois de coletadas, as amostras foram preservadas sob refrigeração (0°C) até a extração e análise.

As amostras analisadas são de cinco pontos diferentes da Estação de Tratamento de Esgoto, Afluente: esgoto bruto; Reator: esgoto em tratamento; Efluente: esgoto que sai tratado do reator; Montante: água do rio antes do despejo de efluente tratado e Jusante: água do rio, corpo receptor, da efluente tratado.

### 4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES

Soluções estoque com concentrações de 1250, 1210, 1000 e 1000 mgL<sup>-1</sup> foram preparadas para cada um dos hormônios incluindo 17β-estradiol (betaEST), estrona (ETR), estriol (EST) e 17α-etinilestradiol (17-EE) respectivamente. A partir destas soluções preparou-se uma solução de trabalho incluindo todos os hormônios, na concentração de 250 mg L<sup>-1</sup> em metanol (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA). Nas ponteiras de 1 mL, continham 20 mg de Estireno-divinilbenzeno. (VALDERRAMA, 2018).

### 4.3 PREPARO DE AMOSTRAS

Valderrama (2018) realizou estudos de otimizações a fim de determinar a melhor condição para extração dos hormônios em água por DPX. Realizou estudos envolvendo, solvente extrator e dispersor, tempo de extração e dessorção, números de ciclos de extração, dessorção e limpeza, massa de solvente extrator e força iônica. A otimização dos parâmetros que afetam a técnica de DPX, como as melhores condições adquiridas por Valderrama (2018) foram adaptadas visando menores limites de quantificação. Realizou-se o

preparo das amostras em triplicata, para que assim fosse possível obter um resultado mais preciso.

#### 4.3.1 LIMPEZA

A escolha do solvente de lavagem é feita com base no tipo/natureza química do sorvente, no caso do trabalho o solvente escolhido foi acetonitrila. A lavagem com solvente é também realizada por meio da entrada de ar na ponteira, é feita em 8 ciclos de 10 segundos com 200  $\mu\text{L}$  de acetonitrila, trocando o solvente a cada sucção, de acordo com o que está descrito na literatura.

#### 4.3.2 EXTRAÇÃO

A amostra é aspirada para o interior da ponteira, seguido da aspiração de ar, nessa fase realizou-se 5 ciclos de extração de 200  $\mu\text{L}$  permanecendo em aproximadamente 50 segundos na ponteira

#### 4.3.3 DESSORÇÃO

Realizou-se a dessorção em 8 ciclos de 10 segundos com o solvente acetonitrila, repetindo o mesmo solvente para a concentração do analito ficar mais alta, e pode ser diretamente injetado em um sistema cromatográfico, visando maior detectabilidade analítica. Todas as etapas envolvidas na extração por DPX são válidas para ambos os sistemas, manual e automatizado.

### 4.4 ANÁLISE DOS CONTAMINANTES EMERGENTES

A análise se restringiu a quatro compostos diferentes, estriol,  $\beta$ -estradiol, 17 etinil estradiol, estrôna. De acordo com a literatura Raimundo (2011), as concentrações dos hormônios são muito baixas, considerando essas condições, é necessário que o equipamento utilizado para as análises tenha alta sensibilidade, portanto a detecção foi realizada por meio de análises cromatográficas utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com

Detector de Fluorescência, pertencente ao Departamento de Química da UTFPR- Câmpus Medianeira.

As amostras foram analisadas em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Prominence Shimadzu LC-20AT) com injetor manual (Rheodyne 7725i), sendo utilizado um detector de arranjo diodos (DAD) e Fluorescência (FL). A separação foi realizada empregando uma coluna em fase reversa sendo, a coluna de separação Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub> (4.6 mm d.i x 25cm c x 5 µm d.p.) e a coluna de guarda analítica Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub> (4mm d.i x 1,5 cm cx 5 µm d.p.). As condições cromatográficas utilizadas foram fase móvel gradiente com vazão de 1 mL min<sup>-1</sup> composta de água:acetonitrila (65:35, v/v), por 6 min, passando para (20:80, v/v) até 9 min, retornando então para condição inicial e finalizando a corrida em 15 min. O detector de fluorescência foi ajustado em comprimento de onda de excitação de 280 nm e comprimento de onda de emissão de 310 nm. Os dados cromatográficos foram analisados pelo software LC Solution (Shimadzu, Kyoto, Japan). UHPLC: Ultimate 3000 Thermofisher (ultra-high performance liquid chromatography (Ultimate 3000, Thermo Scientific, Germering, Germany), equipado com um injetor automático de amostras, bomba quaternária, forno e conjunto de diodos (DAD) detector e fluorescência (FLD), e, controlado por Chromeleon 7.0 software).

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

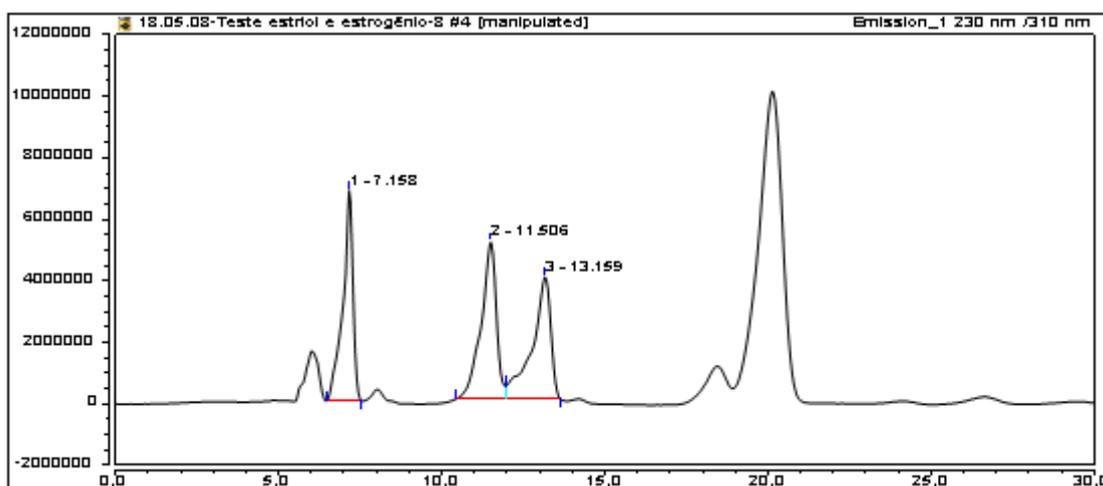
Os dados foram submetidos a uma análise estatística, utilizando o teste de Tuckey, a nível de significância 5%, para a comparação das médias. O software utilizado foi o Portable Statistica 8.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 DETERMINAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS HORMÔNIOS

Para fazer as análises do HPLC-FL foi injetado um mix contendo quatro hormônios, porém, apesar de todos os hormônios utilizados terem anéis aromáticos e ligações duplas somente três foram identificados no HPLC-FL como mostra a Figura 4. Pode-se observar pela Figura 3 a identificação desses hormônios como se segue: o hormônio Estriol apresentou tempo de retenção em 7 min representado como Composto 1, o hormônio  $\beta$ -Estradiol com tempo de retenção em 11 min representado como Composto 2, e, por fim o hormônio 17- $\alpha$ -Etinilestradiol com tempo de retenção de 13 min representado pelo Composto 3, o pico maior com tempo de retenção em aproximadamente 20 minutos pode ser considerado com um interferente. O fluxo foi de  $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ , contendo quatro compostos, com excitação de 230 nm e de emissão 310 nm obtidos com as condições cromatográficas estabelecidas para o métodos.

**Figura 4** - Cromatograma do mix de hormônios



Fonte: Autoria própria (2018).

**Tabela 2** - Concentração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) dos hormônios presentes em cada amostra.

Amostras	Estriol	$\beta$ -Estradiol	17- $\alpha$ - Etinilestradiol.
Afluente	ND	381,84 $\pm$ 73,00 <sup>c</sup>	754,85 $\pm$ 69,29 <sup>b</sup>
Reator	786,64 $\pm$ 3,138 <sup>a</sup>	1295,34 $\pm$ 215,69 <sup>b</sup>	4441,25 $\pm$ 571,83 <sup>a</sup>
Efluente	ND	1631,91 $\pm$ 124,55 <sup>a</sup>	ND
Montante	ND	ND	ND
Jusante	315,76 $\pm$ 25,57 <sup>b</sup>	136,55 $\pm$ 2,225 <sup>c</sup>	313,84 $\pm$ 39,05 <sup>bc</sup>

**Fonte:** Aurtoria Própria (2018)

ND (não detectado). Média dos valores  $\pm$  desvio padrão; n=3. Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. \*ND= Não Detectado.

Pelo teste de Tuckey, Tabela 2, foi observado que em todas as amostras a concentração dos hormônios diferiu de forma significativa. Esses resultados podem estar relacionados aos pontos de coleta das amostras. As amostras analisadas são de cinco pontos diferentes da Estação de Tratamento de Esgoto.

Afluente é o esgoto bruto que chega na ETE proveniente de uma elevatória, a vazão média dessa estação é de 60 L s<sup>-1</sup>. A amostra deste ponto de coleta apresentou somente a presença dos hormônios  $\beta$ -Estradiol e 17- $\alpha$ -Etinilestradiol.

Na amostra coletada no Reator foi detectada a presença de três hormônios, o estriol, o  $\beta$ -Estradiol e o 17- $\alpha$ -Etinilestradiol, e esta amostra foi a que apresentou a concentração mais alta de hormônios quando comparada as outras amostras coletadas para os diferentes pontos de coleta. No reator anaeróbio de lodo fluetizado acontece a digestão anaeróbia da matéria orgânica existente, dentro do reator contém bactérias acidogênicas e metanogênicas produzindo assim gás sulfídrico e gás metano, após essa digestão a afluente é mandado para uma lagoa de polimento. A presença dos hormônios em concentração mais alta nesta amostra pode estar relacionada ao fato de que neste ponto existe um acúmulo de todos os efluentes recebidos e ainda em tratamento.

Na amostra relativa ao ponto onde se tem a Efluente, observa-se que foi detectado a presença de um hormônio  $\beta$ -Estradiol, em concentração elevada.

Nessa etapa, a efluente sai tratado do reator anaeróbio de manto de lodo e entra em uma lagoa de polimento e posteriormente vai para o rio, chegando no rio ele tem o ponto de despejo que é chamado de efluente tratado. A presença de somente um hormônio, pode ser resultante do processo de tratamento, já que segundo Filho et al (2006) o processo de tratamento do esgoto é responsável por eliminar cerca de 90% dos contaminantes emergentes da água.

Na amostra coletada no ponto onde se denomina montante, não foi detectada a presença de hormônios. O montante do rio é 100 m antes do despejo do efluente, o montante serve para realizar uma análise das características do corpo receptor antes que o efluente seja despejado no rio, sendo assim, este corpo receptor, ou seja, este rio, se encontra livre de contaminantes antes do despejo do efluente tratado.

Atraves dos resultados obtidos, observou-se que na amostra coletada no ponto jusante foram detectados os três hormônios o estriol, o  $\beta$ -Estradiol e o 17- $\alpha$ -Ethinilestradiol, em concentrações significativas. O ponto denominado como jusante é após a entrada do efluente no corpo receptor, a jusante serve para analisar quais foram os impactos causados pelo efluente no corpo receptor, então, é coletado 100 m para baixo da entrada do efluente no rio. O resultado encontrado para esta amostra pode estar relacionado ao fato de este corpo receptor estar a todo momento recebendo Efluentes e apesar da amostra de Efluente coletada neste estudo ter apresentado somente a presença do hormônio  $\beta$ -Estradiol, outras Efluentes lançados neste corpo receptor podem estar contaminando.

Pode-se observar pela Tabela 2 que, das 5 amostras coletadas somente uma não apresentou a presença dos hormônios, a montante, as demais amostras coletadas apresentaram altas concentrações dos hormônios estudados, apresentando concentrações mais altas do que as encontradas na literatura, como mostra Araújo (2007) em seu trabalho onde as concentrações dos hormônios estão na ordem de 0,25 à 0,50  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Uma possível explicação para esses resultados é a grande quantidade de interferentes presentes nas amostras, assim apresentando coeluições que prejudicaram a precisão da análise.

Outra possível explicação é devido a origem da amostra ser de estação de tratamento de esgoto, portanto não foram realizados tratamentos dessas amostras e os hormônios realmente se encontram em concentrações altíssimas.

Como pode-se analisar nos resultados obtidos a concentração desses hormônios estão em  $\mu\text{g L}^{-1}$  (partes por bilhão). O problema é que, apesar dessas concentrações serem consideradas baixas para humanos, elas podem ter efeitos tóxicos para a fauna e a flora aquáticas. Há inclusive alguns estudos de autores como Bila e Dezotti (2007) e Filho et al. (2006) que relacionam a presença de hormônios femininos e outros contaminantes na água com a feminização de peixes e a formação de óvulos em animais machos, indicando que mesmo pequenas quantidades do estrogênio usado em pílulas anticoncepcionais podem levar ao colapso de algumas espécies. Mas os problemas referentes a desreguladores endócrinos presentes na água não param por ai, Bila e Dezotti (2007) relatam ainda alguns efeitos como diminuição da eclosão de ovos de pássaros, peixes e tartarugas; problemas no sistema reprodutivo em répteis, pássaros e mamíferos e alterações no sistema imunológico de mamíferos marinhos, tem sido associados à exposição de espécies aos desreguladores. Em humanos, além da diminuição de esperma no sêmen, também câncer de mama, de testículos e de próstata, além de endometriose.

Portanto, é necessário melhorar o sistema de tratamento das ETE's, pois segundo Sodré et al. (2007) algumas ETE's que possuem sistemas de tratamentos mais inferiores, ou seja, contendo apenas três etapas (coagulação, sedimentação e filtração) são responsáveis por eliminar apenas 25% dos contaminantes emergentes, já ETE's com o sistema de lodo ativado podem reduzir até 90% desses contaminantes pelo fato de que essa remoção de estrogênios da água durante o tratamento de esgoto é se da por processos de biodegradação e adsorção nos lodos. (SODRÉ et al., 2007, p.194)

Alguns trabalhos recentes apontam que esteroides vem sendo detectados em afluentes e efluentes de ETE's de vários países. Na Itália a média de concentrações de estrogênios em ETE'S que operam com sistema de lodo ativado foram de 12, 52 e 3  $\text{ng L}^{-1}$  (BARONTI et al., 2000, p. 5060). Em ETE's britânicas essas concentrações variam de 1, 4 a 76  $\text{ng L}^{-1}$  (DESBROW et al., 1998, p.1549). No Brasil hormônios foram detectados em ETE do Rio de Janeiro com concentrações médias de 21, 40 e 6  $\text{ng L}^{-1}$  (TERNES et al., 1999, p.81).

Marques et al. (2010), comenta que ainda não existe um programa de monitoramento específico nas ETEs, impossibilitando o cálculo das quantidades de contaminantes emergentes que são removidos nas estações, principalmente porque o clima local e o regime de operação das unidades são fundamentais para se determinar o comportamento dessas substâncias durante a passagem pelas várias etapas de tratamento.

Segundo a legislação em vigor no Brasil, os parâmetros de potabilidade da água são determinados pela portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011, publicada pelo Ministério da Saúde. Essa norma discute sobre as propriedades aceitáveis da água para consumo humano, como as relacionadas à turbidez e ao pH, e as concentrações que são permitidas para várias substâncias químicas que apresentam risco à saúde, incluindo uma diversidade de agrotóxicos e pesticidas. Porém não há nenhuma previsão para fármacos ou hormônios. (PIZZOLATO, 2017)

## 5.2 AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE PONTEIRAS DESCARTÁVEIS

Neste estudo, a utilização técnica DPX mostrou-se eficiente. Como citado anteriormente, contaminantes emergentes apresentam concentrações baixas segundo Almeida (2012). Sendo assim existe uma dificuldade no momento da detecção dos mesmos quando utiliza-se amostras sem tratamento prévio.

A extração com a DPX permitiu a detecção desses contaminantes nas amostras de água residuária e natural de tal forma que foi possível não somente a identificação dos hormônios presentes como também a quantificação. A eficiência de extração com a DPX é baseada no tempo de equilíbrio de sorção entre a solução da amostra e a fase extratora. Desta maneira, o resultado encontrado mostra que quanto mais ciclos de extração forem realizados maior será a resposta de intensidade

Na etapa de extração realizada neste estudo foram feitos 5 ciclos de extração permanecendo em aproximadamente 50 segundos na ponteira. Valderrama (2018), realizou estudos de otimização com o propósito de obter a condição ideal em relação ao tempo e ao número de ciclos de extração e dessorção para a análise de hormônios. Para isso, o autor empregou um

planejamento multivariado composto central (em triplicata) do tipo Doehlert e obteve duas superfícies de resposta, sendo que a superfície de dessorção não apresentou uma situação de compromisso entre o tempo e o número de ciclos, 5 ciclos de 10 segundos ou 1 ciclo de 100 segundos. Seus resultados mostraram que a eficiência das duas condições são semelhantes, neste caso, foi escolhida a condição de 5 ciclos de 10 segundos, por apresentar um menor tempo de análise e eficiência um pouco superior para todos os analitos. Outro fator a ser considerado na aplicação da DPX é que quanto maior a afinidade entre o solvente de dessorção e o analito, maior será a eficiência com que este solvente realiza a dessorção do analito retido na fase extratora, melhorando a eficiência da extração.

É importante ressaltar que a técnica de preparo de amostra DPX foi otimizada por Valderrama (2018), onde em seu trabalho discute uma melhora significativa da técnica, otimizando as etapas de limpeza, extração de dessorção. Algumas das vantagens da técnica é que a extração do analito é utilizada uma pequena quantidade de sorvente. Esta técnica, como já citado, minimiza o tempo de extração, pois necessita de apenas poucos minutos para a obtenção de eficiente extração e favorece a ocupação de pequenos volumes de amostra e de solvente orgânico.

A técnica de DPX pode ter aplicação como ferramenta de baixo custo, podendo ser utilizada *in situ* no preparo de amostra para posterior determinação dos contaminantes para tratamento e qualidade de água em ambientes aquáticos e de abastecimento público. Essa possibilidade de uso tem uma importância imensa por causa do seu impacto ambiental, ao auxiliar na identificação de contaminantes encontrados em águas naturais que abasteçam diferentes comunidades, numa época em que a previsão para a qualidade da água potável no mundo neste século não é nada favorável.

## 6 CONCLUSÃO

Visando os resultados obtidos considera-se que o método DPX foi eficiente na determinação de hormônios juntamente com a detecção do HPLC-FL. Foi possível identificar os hormônios em quatro das cinco amostras coletadas, no afluente detectou-se os hormônios  $\beta$ -Estradiol e 17- $\alpha$ -Ethinilestradiol. No reator de loto detectou-se os três hormônios, Estriol,  $\beta$ -Estradiol e 17- $\alpha$ -Ethinilestradiol. No efluente foi possível detectar apenas o  $\beta$ -Estradiol, no montante não foi detectado nenhum dos hormônios, mostrando assim que o rio estava limpo antes do efluente ser despejado, entretando, na amostra do jusante detectou-se os três hormônios, toda via, o rio que estava estava limpo no momento em que o esgoto tratado é despejado em seu curso acaba sendo contaminado com os hormônios que estavam presente no efluente, gerando consequências para a fauna e flora presentes na natureza, e posteriormente sendo re-injerida pelo ser humano através de centros de captação de água, causando assim mais danos a saúde humana.

O método de preparo de amostra além de ser simples, tem um tempo reduzido de trabalho. Também apresenta como vantagens o baixo custo do material e a praticidade devido o uso da fase extratora comercial. Por outro lado o HPLC-FL são ferramentas analíticas de alto custo. As concentrações dos homônios encontradas na estação de tratamento de esgoto foram consideradas altas de acordo com o que esta descrito na literatuda, umas das possíveis explicações é que a água ainda estava em fase de tratamento, para um melhor resultado seria necessária realizar mais coletas e repetir os preparos de amostras e detecção, mas, devido ao curto prazo para a realização do trabalho não foi possível realizar mais repetições. Por fim, a combinação de métodos DPX e HPLC-FL, considerando a complexidade do sistema analisado, revelaram-se adequados e geraram resultados de interesse para a pesquisa sobre contaminantes emergentes.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C. A. A.; Identificação e determinação de fármacos ansiolíticos e antiepilépticos e seus metabólitos em efluentes hospitalar. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação, Universidade de Santa Maria,RS-BRASIL. 2012.

BARONTI, C.; CURINI, R.; D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; GENTILI, A.; SAMPERI, R. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in receiving river water. **Environmental Science & Technology**, v.24, p. 5059 –5066, 2000.

BARRIONUEVO, Wilma R; LANÇAS, Fernando M. Extração em fase solida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretroides em agua. **Química Nova**, vol. 24, nº. 2, p.172-175, 2001.

BILA, Daniele M.; DEZZOTI, Marcia. Desregulados Endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30 n. 3, 2007

BOFF, Leonardo. A Água no Mundo e sua Escassez no Brasil. Disponível em :<<https://leonardoboff.wordpress.com/2015/02/02/a-agua-no-mundo-e-sua-escassez-no-brasil/>>. Acesso em 10 out. 2017

BORDIN, Dayanne C. M.; ALVES, Marcela N. R.; CAMPOS, Eduardo G.; MARTINIS, Bruno S. Disposable pipette tips extraction: Fundamentals, applications and state of the art. **Journal Of Separation Science**. v 39, nº 6, p.1168. 2016.

BRASIL. Portaria **Nº 2.194**, de 12 de Dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12\\_2011.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html)> Acesso em: 13 de Jun. de 2018.

CHAVES, A.R.; MOURA, B.H.F.; CARIS, J. A.; RABELO, D.; QUEIROZ, M.E.C. The development of a new disposable pipette extraction phase based on polyaniline composites for the determination of levels of antidepressants in plasma samples. *Journal of Chromatography A*, 1399:1-7, 2015.

CIOLA, Remolo. Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho HPLC. Edgard Blucher; São Paulo, 1998.

DESBROW, C.; ROUTLEDGE, E. J.; BRIGHTY, G. C.; SUMPTER, J. P.; WALDOCK, M. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. Chemical fractionation and in vitro biological screening. **Environmental Science & Technology**, v.32, p.1549 –1558, 1998.

FILHO, R. W. R.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E. M.; Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 4, 817-822, 2006

FEITOSA, Rafael S.; SODRÉ, Fernando F.; MALDANER, Adriano Otávio. Drogas de abuso em Águas Naturais e Residuárias Urbanas: Ocorrência, Determinação e Aplicações Forenses. **Química Nova**, v 36, nº 2, p.291–305, 2013.

FEITOSA, Rafael S.; SODRÉ, Fernando F.; MALDANER, Adriano Otávio. Disposable pipette tips extraction: Fundamentals, applications and state of the art. **Separation Science** v. 39 p.1168-1172, 2016

Fontenele, E. G. P.; Martins, M. R. A.; Quidute, A. R. P.; Júnior, R. M. M. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* Vol. 54, 2010.

GAFFNEY, Vanessa de J.; CARDOSO, Vitor V.; RODRIGUES, Alexandre; FERREIRA, Elisabete ; BENOLIEL, Maria João; ALMEIDA, Cristina M. M. Análise de fármacos em águas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS. **Química Nova** vol.37, nº1, 2014.

GHISELLI, Gislaine.; JARDIM, Wilson F.; Interferentes endócrinos no ambiente **Química Nova**, 2007, v 30, nº 3, 2007.

GUAN, Hongxia; BREWER, Willian E.; GARRIS, Sherry T.; MORGAN Sthefen L. New approach to multiresidue pesticide determination in foods with high fat content using disposable pipette extraction (DPX) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Journal of agricultural and food chemistry**, 2009.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Censo 2010

JARDIM, Isabel Cristina F. S. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica** vol.2, nº1, p.13-25, 2010.

KOLE, Prashant L.; VENKATESH, Gantala; KOTECHAC, Jignesh; SHESHALAD Ravi; Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. **Biomedical chromatography**, v 25, p.199-217, 2011.

KUCH, Holger M.; BALLSCHMITER, Karlheinz; Determination of Endocrine-Disrupting Phenolic Compounds and Estrogens in Surface and Drinking Water by HRGC-(NCI)-MS in the Picogram per Liter Range **Environ. Sci. Tech**, v 35, p.3201, 2001.

LANÇAS, Fernando M.; Extração em Fase Sólida (SPE); **RiMa**; São Carlos, 2004

LI, Z.; LI, Y., LIU, X.; LI, X.; ZHOU, L.; PAN, C. Multiresidue analysis of 58 pesticides in bean products by disposable pipet extraction (DPX) cleanup and gas chromatography-mass spectrometry determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n.19, p.4788-98, 2012

MARQUES, D. M. L. M.; MULLER, G. T.; CENTENO, G.; ESTERÓIDES EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS – Estado da Arte e Perspectivas de Tratamento. VII Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental, 2010.

OTOMO, J. I. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação de hormônios, considerados disruptores endócrinos, nas águas destinadas ao abastecimento público na região do Rio Paraíba do Sul, SP. Dissertação de mestrado, IPEN-CNEN-SP, São Paulo, 2010.

PETROVIC M., BARCELÓ D. Liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of the emerging environmental contaminants; **Anal. Bioanal. Chem.** v 385, p 422, 2006.

PINTO, Maria Aparecida L.; QUEIROZ, Maria Eeugênica C. Extração em Ponteiros Descartáveis: Fundamentos Teóricos e Aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 2, p.101–108, 2015.

PIZZOLATO, T.; RAPOSO, C.; Resíduos de medicamento e hormônios na água preocupam cientistas. **UFRGS-Ciência**. 2017

RAIMUNDO, Cassiana. Contaminantes Emergentes em Água Tratada e Seus Mananciais: Sazonalidade, Remoção e e Atividade Estrogênica. Tese de Doutorado. **Departamento de Química Analítica. Universidade de Estadual de Campinas**. Campinas, 2011. Disponível em <

<http://biq.iqm.unicamp.br/arquivos/teses/000837191.pdf>> Acesso em 10 de out. 2017.

RICHARDSON, Susan D.; TERNES, Thomas A.; Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues; **Anal. Chem.** v 83, p 4614. 2011.

SANTANA, Joyce. Determinação de contaminantes emergentes em mananciais de água bruta e na água para consumo humano do Distrito Federal. Dissertação de Mestrado. **Programa de Pós Graduação em Química, Universidade de Brasília**, Brasília, 2013. Disponível em <[http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/13822/1/2013\\_JoyceSilvaSantana.pdf](http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/13822/1/2013_JoyceSilvaSantana.pdf)> Acesso em 10 de out. 2017

SCHEINDWEILER, K.B.; NEWMeyer, M.N.; BARNES, A.L.; HUESTIS, M.A.; Quantification of cannabinoids and their free and glucuronide metabolites in whole blood by disposable pipette extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1453, p.34-42, 2016.

SCHIAVINI, J. A.; CARDOSO, C. E.; RODRIGUES.; Desreguladores endócrinos no meio ambiente e o uso de potenciais bioindicadores. **Eletrônica**, v. 4, n.3, p. 33-48, 2011.

SODRE, F. F.; MONTAGNER, C. C.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Ocorrência de Interferentes Endócrinos e Produtos Farmacêuticos em Águas Superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil). *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 2, n. 2, 2007

SPERLING, M. V. Activated sludge and aerobic biofilm reactors. Iwa Publishing, Volume 4. 2017.

TERNES, T. A.; KRECHEL, P.; MUELLER, J. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – II. Aerobic batch experiments with activated sludge. **The Science of the Total Environment**, v.225, p.91-99, 1999.

USEPA. United States Environmental Protection Agency – Disponível em : <<http://extoxnet.orst.edu/faqs/pesticide/endocrine.htm>> acesso em 10 de out. de 2017.

VALDERRAMA, L. Aplicação de calibração multivariada com integração de técnicas de microextração e detecção ótica para determinação de

micropoluentes em matrizes complexas. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, 2018.

VALENTE, Antônio Luiz P.; AUGUSTO, Fábio. Microextração Por Fase Sólida. **Química Nova**. vol 23, nº 4, p.524, 2000.

WEIGEL, Stefan; KUHLMANN, Jan; HUHNERFUSS, Henrich. 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, 2002.