

RENATO MIANI GONÇALVES

Estrógenos em águas estuarinas: estudo analítico e ambiental para o estuário  
Santos-São Vicente

Tese apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, como parte  
dos requisitos para a obtenção do título de  
Doutor em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Mary Rosa  
Rodrigues de Marchi

Araraquara  
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

G635e      Gonçalves, Renato Miani  
Estrógenos em águas estuarinas: estudo analítico e  
ambiental para o estuário Santos-São Vicente / Renato Miani  
Gonçalves. – Araraquara : [s.n.], 2016  
99 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química  
Orientador: Mary Rosa Rodrigues de Marchi

1. Hormônios sexuais. 2. Estuários. 3. Santos (SP).  
4. Poluição marinha. 5. Cromatografia líquida de alta  
eficiência. I. Título.

# Renato Miani Gonçalves

Curriculum Vitae

---

## Dados pessoais

**Nome** Renato Miani Gonçalves  
**Filiação** Edison Gonçalves Corral e Sonia Maria Miani Gonçalves  
**Nascimento** 18/04/1985 - Curitiba/SP - Brasil  
**Carteira de Identidade** 338945829 SSP - SP - 28/09/1995  
**CPF** 341.564.158-99

## Endereço eletrônico

E-mail para contato: renatomiani@gmail.com

---

## Formação acadêmica/titulação

- 2012** Doutorado em Química.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil  
com **período sanduíche** em University of Rhode Island (Orientador : Rainer Lohmann)  
Título: Avaliação ambiental de estrógenos na costa do estado de São Paulo, Brasil  
Orientador: Mary Rosa Rodrigues de Marchi
- 2009 - 2011** Mestrado em Oceanografia Química e Geológica.  
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil  
Título: Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) em toninhas, Pontoporia Blainvillei (Mammalia: Cetacea), coletadas no complexo estuarino-lagunar de Cananéia-Iguape, Sudeste do Brasil, Ano de obtenção: 2011  
Orientador: Rosalinda Carmela Montone  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2004 - 2008** Graduação em Química.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil  
Título: Otimização e validação de método para extração de benzo[a]pireno de material particulado atmosférico  
Orientador: Mary Rosa Rodrigues de Marchi

## Atuação profissional

### 1. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP

---

#### Vínculo institucional

- 2014 - 2014** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista didático , Carga horária: 2, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Co-responsável pela disciplina Métodos Instrumentais de Análise para o 2 ano do curso de Farmácia Bioquímica - UNESP/Araraquara
- 2014 - 2014** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista didático , Carga horária: 6, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Co-responsável pela disciplina Química Analítica Qualitativa para o curso de Bacharelado em Química
- 2014 - 2014** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista didático , Carga horária: 6, Regime: Parcial  
Outras informações:  
Co-responsável pela disciplina Química Analítica Quantitativa para o 2 ano do curso de Farmácia Bioquímica -

UNESP/Araraquara

**2012 - Atual** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Doutorado , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

---

### Atividades

**10/2014 - Atual** Conselhos, Comissões e Consultoria, Instituto de Química de Araraquara  
*Especificação:*  
*Representante Discente Titular do Conselho do Programa de PG em Química*

**08/2014 - 12/2014** Graduação, Química  
*Disciplinas ministradas:*  
*Química Analítica Qualitativa*

**08/2014 - 12/2014** Graduação, Farmácia e Bioquímica  
*Disciplinas ministradas:*  
*Métodos de Análise Instrumental*

**03/2014 - 07/2014** Graduação, Farmácia e Bioquímica  
*Disciplinas ministradas:*  
*Química Analítica Quantitativa*

## Produção

---

### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. SOUSA, DEMÉTRIO A.; **GONÇALVES, RENATO M.**; HELENO, FERNANDA F.; DE QUEIROZ, MARIA ELIANA L.R.; DE MARCHI, MARY ROSA R.  
Chemometric optimization of solid-liquid extraction with low-temperature partition (SLE-LTP) for determination of persistent organic pollutants in Caiman yacare eggs. Microchemical Journal (Print). , v.114, p.266 - 272, 2014.

#### Apresentação de trabalho e palestra

1. CALERA, G. C.; **GONÇALVES, R. M.**; LOURENCETTI, C.  
**'Biodiesel: utilização de planejamento fatorial 2<sup>4</sup> na transesterificação dos óleos de canola e girassol**, 2014. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

### Educação e Popularização de C&T

#### Curso de curta duração ministrado

1. **GONÇALVES, R. M.**;  
**Cromatografia Líquida de Alta Eficiência: Princípios Básicos, Instrumentação e Aplicações**, 2015. (Especialização, Curso de curta duração ministrado)

2. **GONÇALVES, R. M.**; Toledo Netto, P.  
**Cromatografia Líquida de Alta Eficiência: Princípios Básicos, Instrumentação e Aplicações**, 2014. (Especialização, Curso de curta duração ministrado)

3. **GONÇALVES, R. M.**; Toledo Netto, P.  
**Cromatografia Líquida de Alta Eficiência: Princípios Básicos, Instrumentação e Aplicações**,

2014. (Especialização, Curso de curta duração ministrado)

4. **GONÇALVES, R. M.**; Toledo Netto, P.

**Cromatografia Líquida de Alta Eficiência: Princípios Básicos, Instrumentação e Aplicações**, 2013. (Especialização, Curso de curta duração ministrado)

## **Bancas**

### **Bancas**

#### **Participação em banca de comissões julgadoras**

#### **Outra**

1. **Comissão de Bolsas do Programa de Pós-Graduação em Química, para analisar a solicitação de bolsa do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior - PDSE/CAPES, 2015**

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

2. **Comissão de Bolsas do Programa de Pós-Graduação em Química, para analisar a solicitação de bolsa do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior - PDSE/CAPES, 2015**

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

3. **Comissão de Bolsas do Programa de Pós-Graduação em Química, para analisar a solicitação de bolsa do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior - PDSE/CAPES, 2015**

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

4. **Comissão de Bolsas do Programa de Pós-Graduação em Química, para analisar a solicitação de bolsa do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior - PDSE/CAPES, 2015**

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

5. **Comissão de Bolsas do Programa de Pós-Graduação em Química, para analisar a solicitação de bolsa do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior - PDSE/CAPES, 2015**

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

6. **Comissão de Bolsas do Programa de Pós-Graduação em Química, para analisar a solicitação de bolsa do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior - PDSE/CAPES, 2014**

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

7. **Comissão de Bolsas do Programa de Pós-Graduação em Química, para analisar a solicitação de bolsa do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior - PDSE/CAPES, 2014**

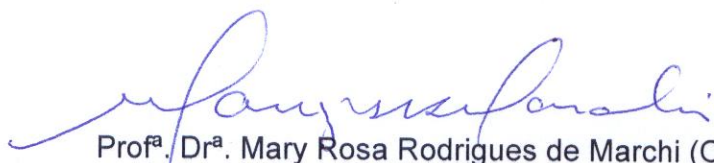
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

## RENATO MIANI GONÇALVES

Tese apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Doutor em  
Química.

Araraquara, 22 de julho de 2016.

### BANCA EXAMINADORA



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mary Rosa Rodrigues de Marchi (Orientadora)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara -SP



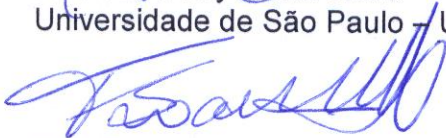
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Raquel Fernandes Pupo Nogueira  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Lucia Ribeiro  
Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, Araraquara - SP



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eny Maria Vieira  
Universidade de São Paulo – USP, São Carlos - SP



Prof. Dr. Flavio Soares Silva  
Universidade Federal de Itajubá – UNIFEI, Itajubá - MG

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Mary Rosa, não somente pela orientação durante o doutorado, mas também por realmente se preocupar com minha formação em todas esferas.

À minha família.

Aos colegas e amigos do Gresco.

Aos integrantes do NEPEA, em principal o Professor Denis Abessa.

Aos amigos do LABQOM.

Aos colegas do GSO, em principal o Professor Rainer Lohmann.

Aos funcionários do IQ-Unesp.

À Facte, Capes e CNPq.

À todos que, de forma ou outra, me auxiliaram.

## RESUMO

O sudeste brasileiro é a região mais populosa do país, estando nele o estuário de Santos-São Vicente, com aproximadamente 1,5 milhões de habitantes. Localizado nesse complexo estuarino, está o Porto marítimo mais movimentado da América Latina e um dos mais importantes pólos petroquímicos do país. Nessa região o tratamento de esgoto sanitário é praticamente inexistente (cobrindo aproximadamente 20% de toda população), não havendo estudos sobre a ocorrência ambiental e a dinâmica de estrógenos ou outros alteradores endócrinos no local. Por outro lado, frequentemente os estudos ambientais existentes sobre a ocorrência de contaminantes, negligenciam a confiabilidade analítica. Frente à esse cenário, o presente estudo apresenta a determinação de estrógenos (17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2), 17 $\beta$ -estradiol (E2) e estriol (E3)) em água do mar com alta confiabilidade, utilizando método baseado em extração em fase sólida (SPE) e análise por HPLC-FLD, com o uso de ferramentas estatísticas para a modelagem da curva analítica, avaliação do efeito matriz e estudo de conservação dos cartuchos SPE após a eluição da amostra. O processo de validação analítica mostrou valores adequados de recuperação (76-94%, para diferentes concentrações de EE2, E2 e E3), precisão (coeficiente de variação menor que 20%) e seletividade. Os limites de detecção do método para o EE2, E2 e E3 foram respectivamente de 9,7, 2,3 e 4,3 ng L<sup>-1</sup>. Cinco curvas analíticas para cada composto foram utilizadas para avaliar o efeito matriz, sendo as soluções padrões preparadas em solvente (acetonitrila), água marinha artificial (S=30) e água marinha, sendo para essas últimas, os padrões adicionados hora antes da extração, hora após a eluição da amostra no cartucho. Para o preparo de cada curva analítica foram utilizados seis concentrações diferentes dos padrões, sendo as curvas analíticas refeitas para cada amostragem realizada. O modelo teve por base a regressão linear, utilizando ajuste por mínimos quadrados, sendo o mesmo avaliado por análise de variância (ANOVA). Os resultados mostraram efeito matriz para todos os analitos. A conservação dos analitos nos cartuchos SPE foram avaliados para 6; 22; 29; 55 e 80 dias, e os resultados evidenciaram que não houve diferença significativa entre eles. Foram realizadas três amostragens no estuário de Santos-São Vicente, em março de 2014 (12 pontos amostrais de superfície), e fevereiro e junho de 2015 (com 15 pontos amostrais de superfície e 6 pontos amostrais de águas de fundo, na baía de Santos). Os valores de concentração para o estriol (mais frequentemente encontrado) variaram entre ND-354 ng L<sup>-1</sup>, para o 17 $\beta$ -estradiol de nd-18 ng L<sup>-1</sup> enquanto o 17 $\alpha$ -etinilestradiol não foi quantificado em nenhuma das amostras. Não foram observadas diferenças entre as amostragens nas diferentes estações do ano, sendo as maiores variações de concentrações observadas no âmbito de diferentes comportamentos de maré (sizígia e quadratura). No geral, os valores de concentrações encontrados para o estriol e estradiol podem acarretar riscos aos organismos aquáticos quando os mesmos são expostos à esses alteradores por longos períodos.

**Palavras-chave:** Hormônios sexuais. Estuários. Santos (SP). Poluição Marinha. Cromatografia líquida de alta eficiência.



## ABSTRACT

Southeast is the Brazilian most populated region. Santos-São Vicente estuary, located there, includes c.a. 1.5 million inhabitants, one of the most important Brazilian petrochemical sites and the bigger harbor from Latin America. In this region, the sewage treatment is almost inexistent (covers c.a. 20% of all population), nevertheless there are not studies about the occurrence and environmental dynamics of estrogens or others endocrine disruptors there. On the other hand, the analytical reliability in environmental studies have been frequently neglected. Thus, this work presents a reliability evaluation for estrogens (EE2, E2 and E3) determination in marine water, using a method based in solid phase extraction (SPE) and HPLC-FLD analysis, statistical tools were used to accomplish the calibration curve, storage time of SPE cartridges after sample elution and matrix effects. The analytical validation process showed adequate selectivity, recovery (76-94%, for different concentrations of EE2, E2 and E3) and precision (RSD below 20%). The method detection limit for EE2, E2 and E3 was 10, 2 and 4 ng L<sup>-1</sup>, respectively. Five analytical curves for each compound were used to evaluate the matrix effect wherein the standard solutions were prepared in solvent (acetonitrile, or on the SPE extract from artificial seawater (S=30) or in natural seawater). Additionally, for artificial and natural seawater, the standards were spiked to matrix before the SPE. All standard solution contained all the studied estrogens, at the same concentration, for each curve it was used six standards concentrations. Model fitting was done by linear regression models, using ANOVA to evaluate the fittings. The results showed matrix effects for all analytes, thus matrix-matched (natural seawater) analytical curves were used at the following method validation steps. SPE cartridges storage time (after sample loading) was studied for 6, 22, 29, 55 and 80 storage days, data demonstrated no significant differences for these storage times. Three sampling was made at Santos estuary, in march 2014, february 2015 and june 2015, with 15 samples collected each. Estriol (E3) concentrations ranging ND-354 ng L<sup>-1</sup>, estradiol (E2) ND-18 ng L<sup>-1</sup> while 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) were not detectable in any samples (below method LOQ). Overall, estriol concentration are above no-observed-effect concentrations from long-term exposition, which can lead to risk for aquatic organisms.

**Keywords:** Sexual hormones. Estuaries. Santos (SP). Marine Pollution. High performance liquid chromatography.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática da zona de mistura na descarga do efluente. ....	18
Figura 2. Os dezesseis municípios que compõem o litoral do Estado de São Paulo, com destaque para os que possuem emissários submarinos.....	19
Figura 3. Complexo estuarino Santos-São Vicente. ....	20
Figura 4. Estruturas dos estrógenos de interesse no presente trabalho. (a) 17 $\beta$ -estradiol (E2); (b) 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2); (c) estriol (E3).....	22
Figura 5. Definição e validação da metodologia analítica para a determinação de estrógenos em água do mar.....	25
Figura 6. (a) Área de estudo, complexo estuarino de Santos/São Vicente. (b) Vila dos Pescadores. (c) Palafitas no Rio dos Bugres. ....	28
Figura 7. Médias pluviométricas mensais históricas para a Baixada Santista. ....	29
Figura 8. (a) Canais artificiais existentes em Santos e São Vicente. (b) Canal de Santos (sentido estuário de Santos, sentido Baía e comportas) .....	31
Figura 9. Pontos com maior influência de esgotamento sanitário.....	33
Figura 10. Garrafa de Van Dorn utilizada nas amostragens. ....	34
Figura 11. Localização dos pontos amostrais. "*" referem-se aos pontos amostrados na baía em 2014, e "o" referem-se aos pontos amostrados na baía em 2015. Os pontos dentro dos canais e no estuário de Santos foram iguais para todas amostragens.....	35
Figura 12. Extração de estrógenos em água superficial utilizando cartuchos de extração em fase sólida. ....	40
Figura 13. Aparato utilizado na extração via SPE dos estrógenos da água do mar. ....	41
Figura 14. Amostras utilizadas durante o estudo de validação da extração dos analitos.....	42
Figura 15. Estudo de conservação da amostra nos cartuchos de extração em fase sólida. ....	44
Figura 16. Procedimento utilizado no preparo das amostras inseridas nos estudos sobre as curvas analíticas. ....	46
Figura 17. Fluxograma da construção das curvas analíticas. ....	47

Figura 18. Cromatograma obtido nas condições da Tabela 6. a) Estriol, 17 $\beta$ -estradiol e 17 $\alpha$ -etinilestradiol na concentração de 100 ng mL <sup>-1</sup> , em acetonitrila b.) Cromatogramas individuais dos padrões analíticos .....	52
Figura 19. Modelo empírico construído a partir da análise de regressão das áreas resultantes de diferentes concentrações do padrão de estriol, injetadas em triplicata. No detalhe, e equação de correlação. ....	57
Figura 20. Modelo empírico construído a partir da análise de regressão das áreas resultantes de diferentes concentrações do padrão de 17 $\beta$ -estradiol, injetadas em triplicata. No detalhe, e equação de correlação. ....	58
Figura 21. Modelo empírico construído a partir da análise de regressão das áreas resultantes de diferentes concentrações do padrão de 17 $\alpha$ -etinilestradiol, injetadas em triplicata. No detalhe, e equação de correlação. ....	58
Figura 22. Concentrações encontradas, juntamente com o erro da falta de ajuste, utilizando o modelo empírico quadrático para o Estriol, 17 $\beta$ -estradiol e 17 $\alpha$ -etinilestradiol. ....	59
Figura 23. Comportamento dos analitos no teste de conservação. Amostra de água do mar sintética fortificadas com 0,2 ng mL <sup>-1</sup> de cada analito. Extração efetuada de acordo com o explicitado na Figura 12. ....	60
Figura 24. Diagrama de caixas da distribuição dos fatores de conservação normalizados (FExtn) .....	61
Figura 25. Resíduos e intervalos de confiança (limites superior e inferior) da curva extraída na matriz do Estriol. ....	63
Figura 26. Resíduos e intervalos de confiança (limites superior e inferior) da curva extraída na matriz do 17 $\beta$ -estradiol. ....	63
Figura 27. Resíduos e intervalos de confiança (limites superior e inferior) da curva extraída na matriz do 17 $\alpha$ -etinilestradiol. ....	64
Figura 28. Gráfico de normalidade (normal inversa vs resíduos) para o estriol, R <sub>c</sub> =0,942. ....	66
Figura 29. Gráfico de normalidade (normal inversa vs resíduos) para o 17 $\beta$ -estradiol, R <sub>c</sub> = 0,942. ....	66
Figura 30. Gráfico de normalidade (normal inversa vs resíduos) para o 17 $\alpha$ -etinilestradiol, R <sub>c</sub> = 0,939. ....	67

Figura 31. Curvas analíticas do estriol, resultantes dos procedimentos apresentados na Figura 16 e Figura 17. ....	69
Figura 32. Curvas analíticas do 17 $\beta$ -estradiol, resultantes dos procedimentos apresentados na Figura 16 e Figura 17. ....	69
Figura 33. Curvas analíticas do 17 $\alpha$ -etinilestradiol, resultantes dos procedimentos apresentados na Figura 16 e Figura 17. ....	70
Figura 34. Concentrações de estriol (em ng L <sup>-1</sup> ) determinadas em água dos pontos amostrais referente a campanha realizada em 26 de março de 2014. ....	74
Figura 35. Diagrama de caixas relativas às concentrações de estriol nas amostras do Estuário de Santos. ....	75
Figura 36. Diagrama de caixas relativas às concentrações de estriol nas amostras do Canal de São Vicente. ....	76
Figura 37. Diagrama de caixas relativas às concentrações de estriol nas amostras do Canal de Santos. ....	77
Figura 38. Diagrama de caixas relativas às concentrações de estriol e nas amostras do Emissário Submarino. ....	78
Figura 39. Concentrações de estriol (em ng L <sup>-1</sup> ) determinadas em água dos pontos amostrais referente a campanha realizada em 10 de fevereiro de 2015. ....	80
Figura 40. Concentrações de 17 $\beta$ -estradiol (em ng L <sup>-1</sup> ) determinadas em água dos pontos amostrais referente a campanha realizada em 17 de junho de 2015. ....	82
Figura 41. Concentrações de estriol (em ng L <sup>-1</sup> ) determinadas em água dos pontos amostrais referente ao esforço amostral realizado em 17 de junho de 2015. ....	83
Figura 42. Concentrações de 17 $\beta$ -estradiol em água superficial estuarina (ng L <sup>-1</sup> ). (a) Singh et al., 2010. South Florida, EUA. (b) Zuo et al., 2006. Acushnet, EUA. (c) Pojana et al., 2007. Veneza, Itália. (d) Aydin & Talinli, 2013. Istambul, Turquia. (e) Lei et al., 2009. Tianjin, China. (f) Zhou et a., 2011. Quingdao, China. (g) Chen et al., 2007. Taipei, Taiwan. (h) Ying et al., 2009. Queensland. Austrália. ....	85
Figura 43. Concentrações de estriol em água superficial estuarina (ng L <sup>-1</sup> ). (a) Kuster et al., 2009. Rio de Janeiro, Brasil. (b) Aydin & Talinli, 2013. Istambul, Turquia. (c) Peng et al., 2008. Guangzhou, China. (d) Chen et al., 2007. Taipei, Taiwan. (e) Zhou et a., 2011. Quingdao, China. (f) Lei et al., 2009. Tianjin, China. ...	86
Figura 44. Concentrações médias do estriol (ng L <sup>-1</sup> ) determinadas no estudo. ....	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos estrógenos de interesse nesse trabalho. ....	26
Tabela 2. Informações sobre a infra-estrutura de saneamento básico da região do complexo estuarino de Santos/São Vicente. ....	32
Tabela 3. Tábuas de maré para os dias das campanhas de amostragem. Porto de Santos, Torre Grande (Centro de Hidrografia da Marinha). ....	34
Tabela 4. Coordenadas dos pontos amostrais das campanhas realizadas em 2013 e 2014. ....	36
Tabela 5. Algumas metodologias de análise para determinação de estrógenos no ambiente marinho. ....	37
Tabela 6. Condições cromatográficas (HPLC/FLU, Varian LC-920) adaptadas de Zocolo (2010). ....	38
Tabela 7. Concentração de sais majoritários presentes na água do mar, utilizados para preparo da água marinha artificial. ....	40
Tabela 8. Análise de variância completa para o modelo empírico linear do Estriol. ....	53
Tabela 9. Análise de variância completa para o modelo empírico linear do 17 $\beta$ -estradiol. ....	54
Tabela 10. Análise de variância completa para o modelo empírico linear do 17 $\alpha$ -etinilestradiol. ....	54
Tabela 11. Análise de variância completa para o modelo empírico quadrático do Estriol. ....	55
Tabela 12. Análise de variância completa para o modelo empírico quadrático do 17 $\beta$ -estradiol. ....	55
Tabela 13. Análise de variância completa para o modelo empírico quadrático do 17 $\alpha$ -etinilestradiol. ....	56
Tabela 14. Valores de F calculado (MQR/MQr e MQfaj/MQep), F tabelado e coeficientes de determinação para as modelagens utilizando regressão linear e quadrática para o Estriol, 17 $\beta$ -estradiol e 17 $\alpha$ -etinilestradiol. ....	57
Tabela 15. Valores de recuperação média (n=9) obtidos do método de extração em fase sólida dos estrógenos em água do mar artificial. ....	60

Tabela 16. Resultados obtidos no teste de conservação das amostras (n=18) .....	61
Tabela 17. Valores de Je <sub>i</sub> calculados para os resíduos da curva extraída na matriz para o estriol, 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol. ....	65
Tabela 18. Valores de t de Levene e t crítico do teste de Brown-Forsythe e valores de dU, dL e dW do teste de Durbin-Watson para o estriol, 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol. ....	67
Tabela 19. Curvas analíticas usadas na quantificação do estriol, 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol, para cada campanha amostral, com destaque para os coeficientes com significado estatístico.....	68
Tabela 20. Curvas analíticas para os analitos estriol, 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol preparadas pelo procedimento apresentado na Figura 16 e Figura 17. .....	70
Tabela 21. Diferença percentual entre os coeficientes angulares das curvas preparadas com a matriz extraída e as demais.....	72
Tabela 22. Limites de deteção instrumental e do método e limite de quantificação do método para os estrógenos de interesse para cada amostragem..	72
Tabela 23. Concentrações médias dos analitos (n=9) (ng L <sup>-1</sup> ) encontradas na primeira campanha de amostragem, realizada no dia 26 de março de 2014. ....	73
Tabela 24. Concentrações médias dos analitos (n=6) (ng L <sup>-1</sup> ) encontradas na segunda campanha de amostragem, realizada no dia 10 de fevereiro de 2015. ....	79
Tabela 25. Concentrações médias dos analitos (n=6) (ng L <sup>-1</sup> ) encontradas na terceira campanha de amostragem, realizada no dia 17 de junho de 2015. ....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

E3 - Estriol

E2 - 17 $\beta$ -estradiol

EE2 - 17 $\alpha$ -etinilestradiol

HPLC - High performance liquid chromatography

MeCN - Acetonitrila

GC - Gas chromatography

EPC - Estação de pré-condicionamento

ETE - Estação de tratamento de esgoto

SPE - Solid phase extraction

PSU - Practical salinity unit

GLSM - Generalized least squares method

OLSM - Ordinary least squares method

## SUMÁRIO

1	Introdução .....	17
2	Objetivos .....	24
3	Materiais e Métodos .....	25
3.1.	Escolha da matriz de estudo .....	26
3.2.	Área de estudo .....	26
3.3.	Campanha Amostral .....	33
3.4.	Análise Química .....	36
3.5.	Validação do método de análise cromatográfica .....	38
3.6.	Validação do método de extração .....	39
3.7.	Conservação das amostras nos cartuchos de extração em fase sólida	43
3.8.	Curvas Analíticas e efeito matriz .....	45
3.9.	Limites de detecção e quantificação .....	50
4	Resultados e discussão .....	52
4.1.	Análise cromatográfica .....	52
4.2.	Validação da análise cromatográfica .....	53
4.2.1.	Definição do modelo .....	53
4.2.2.	Validação do modelo empírico .....	59
4.3.	Extração em cartuchos de fase sólida .....	59
4.4.	Conservação dos analitos nos cartuchos SPE .....	60
4.5.	Curvas analíticas e efeito matriz .....	62
4.6.	Limites de detecção instrumental e do método e limite de quantificação	72
4.7.	Resultados obtidos na primeira amostragem (março/2014) .....	73
4.8.	Resultados obtidos na segunda amostragem (fevereiro/2015) .....	79
4.9.	Resultados obtidos na terceira amostragem (junho/2015) .....	81
4.10.	Ocorrência dos estrógenos .....	84



4.11. Efeitos da sazonalidade .....	88
5 Considerações finais e Conclusões .....	89
6 Perspectivas futuras .....	91
Referências.....	92

## 1 Introdução

As zonas costeiras são regiões com grandes concentrações populacionais, que por meio de atividades antrópicas modificadoras do meio tornaram-se aptas à ocupação. Todavia, essas atividades envolvem a produção de resíduos nesses locais, como: lixões nas proximidades de mananciais hídricos, atividades industriais, atividades portuárias, exploração de recursos minerais, sendo no entanto, as maiores fontes de contaminação do ambiente marinho os esgotos sanitários descarregados diretamente em praias, rios ou emissários sem nenhum tratamento prévio (WEBER, 2003).

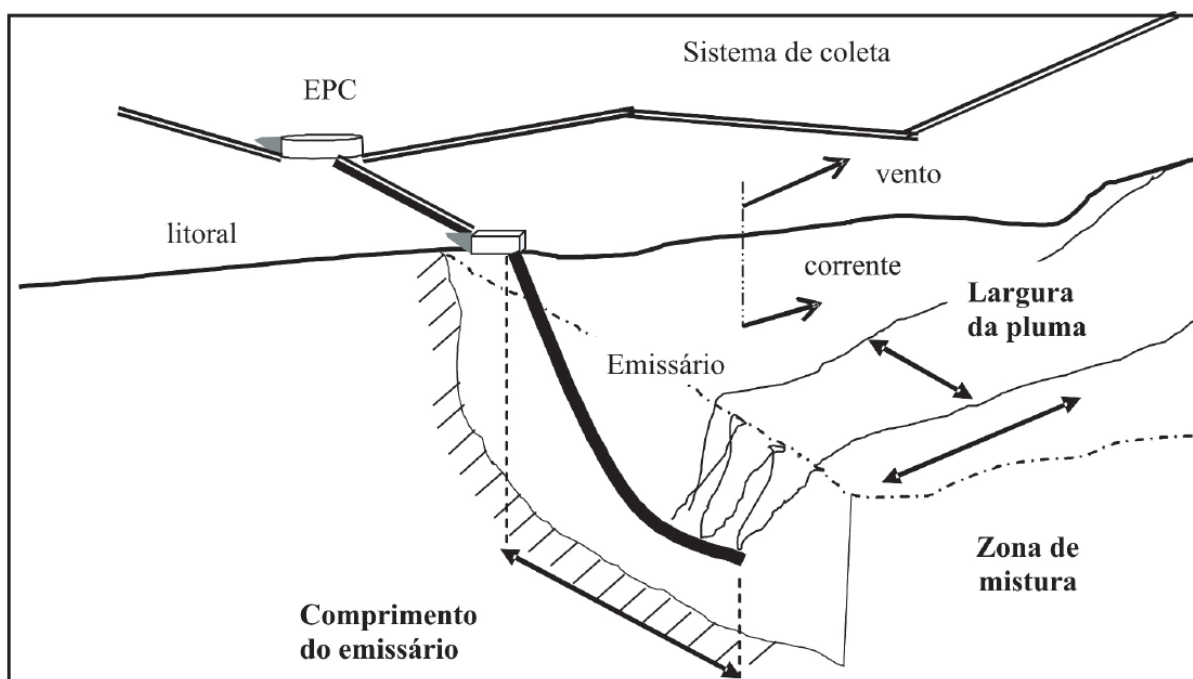
Majoritariamente, a contaminação do ambiente marinho ocorre em águas costeiras onde os estuários são particularmente afetados (KENNISH, 1997). Essas regiões podem ser definidas como corpos d'água parcialmente fechadas, localizados na interface entre o ambiente terrestre e o oceânico e representam áreas de transição, onde a interação com os oceanos faz com que estes sistemas sejam afetados pelas marés (BIANCHI, 2007).

A característica principal desse ecótono é a variabilidade ambiental, com intensa alteração dos parâmetros físico-químicos: salinidade, substrato, temperatura, turbidez e oxigênio dissolvido, além das ondas e correntes (VALENTIN; MUELBERT, 2015). Devido à hidrodinâmica, as águas estuarinas apresentam elevadas concentrações de nutrientes, algas e outros organismos, tendo alta importância biológica, uma vez que sustentam comunidades eurialinas em pelo menos algum estágio de sua vida. (AZEVEDO, 2008).

Conseqüentemente, a introdução de poluentes nessas regiões pode acarretar em efeitos subletais à biota associada ao estuário. Em algumas cidades do litoral paulista, a descarga dos esgotos sanitários ocorre no mar, com ou sem tratamento, por meio de emissários submarinos, os quais são longas tubulações assentadas no fundo marinho, onde ocorre o lançamento do efluente por meio de vários orifícios, aproveitando-se a elevada capacidade de autodepuração das águas do mar que promovem a diluição, a dispersão e o decaimento de cargas poluentes (SÃO PAULO (ESTADO), 2006).

A zona de mistura, região onde ocorre a diluição inicial dos resíduos após o lançamento do efluente, compreende duas regiões distintas. Na vizinhança imediata aos difusores a mistura é governada pela velocidade de injeção, empuxo e geometria do emissário, e inclui as interações com a superfície, fundo e pycnoclina, região essa denominada de campo próximo. Conforme o efluente se afasta do ponto de lançamento, o jato perde a quantidade de movimento inicial, comportando-se como uma pluma, a qual é controlada pela advecção e pela difusão. Essa região é chamada de campo distante, tendo uma diluição dos resíduos muito menor que aquelas no campo próximo, e pode se estender por quilômetros de distância (GREGORIO, 2009) (Figura 1).

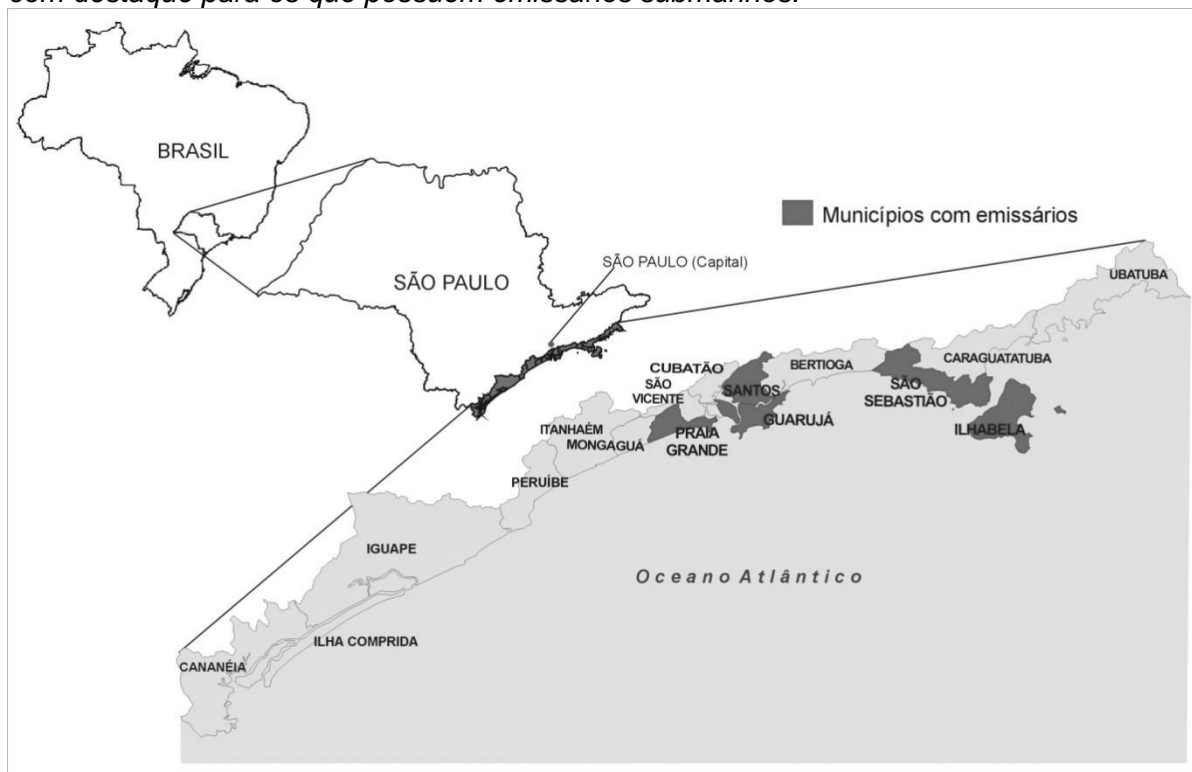
Figura 1. Representação esquemática da zona de mistura na descarga do efluente.



EPC = Estação de pré-condicionamento  
 Fonte: adaptado de UNEP/WHO 1996

A disposição do esgoto sanitário por emissários submarinos é a segunda opção de tratamento mais utilizada no litoral sendo que estão em funcionamento no Estado de São Paulo sete emissários de esgotos sanitários (Figura 2), e um emissário para lançamento de esgotos industriais no terminal aquaviário da Petrobrás (TEBAR).

Figura 2. Os dezesseis municípios que compõem o litoral do Estado de São Paulo, com destaque para os que possuem emissários submarinos.



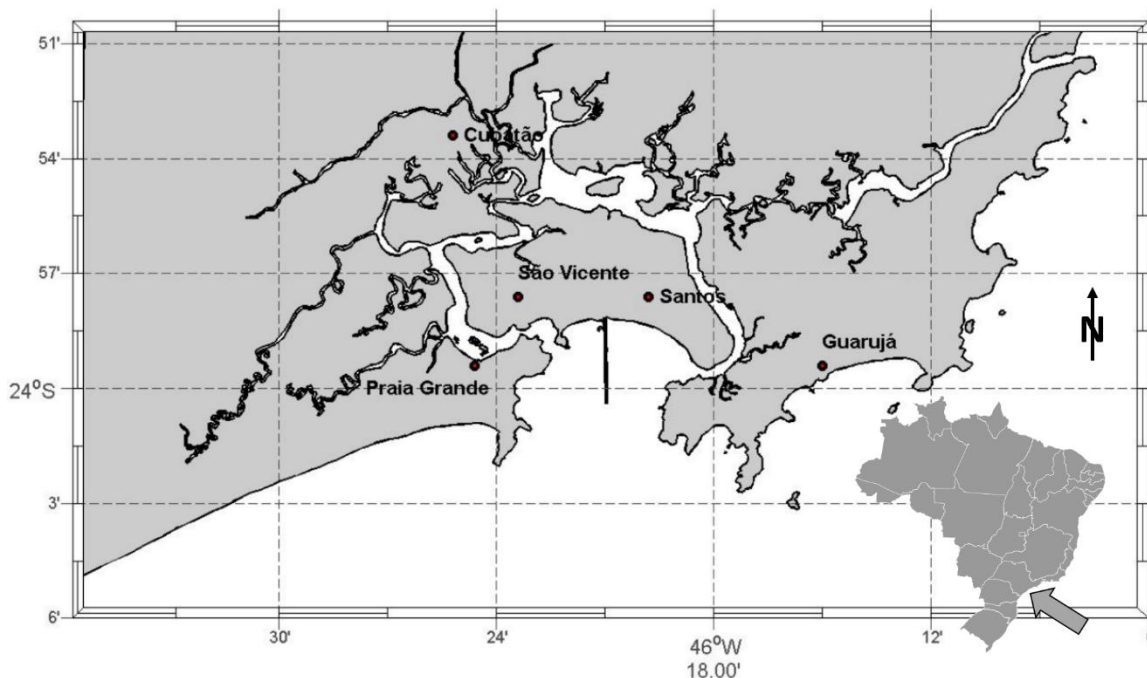
Fonte: (Companhia..., 2013)

Nesses sistemas de disposição oceânica, os efluentes sanitários e águas fluviais são submetidos a tratamento preliminar denominado pré-condicionamento, que consiste em gradeamento, peneiramento e na desinfecção por meio de cloração, todavia, tal tratamento é reconhecido como pouco efetivo na eliminação dos contaminantes presentes nos efluentes.

A disposição oceânica de efluentes urbanos por meio de emissários submarinos é motivada principalmente por motivos econômicos de curto prazo e de engenharia, ficando os aspectos ambientais em segundo plano, em especial aqueles relativos à presença de contaminantes e nutrientes (ABESSA, 2012).

O emissário submarino de Santos situa-se no complexo estuarino Santos-São Vicente (Figura 3), e além destes municípios, inclui também Cubatão, Guarujá e Praia Grande, apresentando uma população de cerca de 1,5 milhões de habitantes (IBGE, 2010), sendo um dos mais importantes polos petroquímicos do Brasil e o maior porto da América Latina.

Figura 3. Complexo estuarino Santos-São Vicente.



Fonte: Modificado de Gregório, 2009.

Dessa forma, em decorrência de sua densa ocupação populacional, principalmente em períodos de veraneio, além da presença de atividades industriais e portuárias de grande importância, a região costeira do Estado de São Paulo vem sendo objeto de diversos estudos a respeito da ocorrência e impacto de contaminantes orgânicos e inorgânicos nesse sistema (PEREIRA et al., 2016; PINTO et al., 2014; CESAR et al., 2014; ROCHA et al., 2014; BURUAEM et al., 2013; CAMPOS et al., 2012; SILVA et al., 2011).

Entre as inúmeras classes de compostos presentes nos efluentes que são lançados nessa região, estão os microcontaminantes emergentes, termo utilizado para substâncias que foram recentemente detectadas no meio ambiente e que podem afetar a biota mesmo em baixas concentrações ( $\text{ng L}^{-1}$ ), e que ainda não possuem regulamentação quanto aos níveis seguros no ambiente (devido à ausência de estudos que elucidem completamente como é a variabilidade espacial e temporal desses compostos) (LAPWORTH et al., 2012).

Tais compostos são utilizados nos mais diversos produtos, como medicamentos, produtos de cuidado pessoal, pesticidas, produtos veterinários, aditivos de alimentos, entre outros (VIDAL-DORSCH et al. 2012). Dentre eles, estão

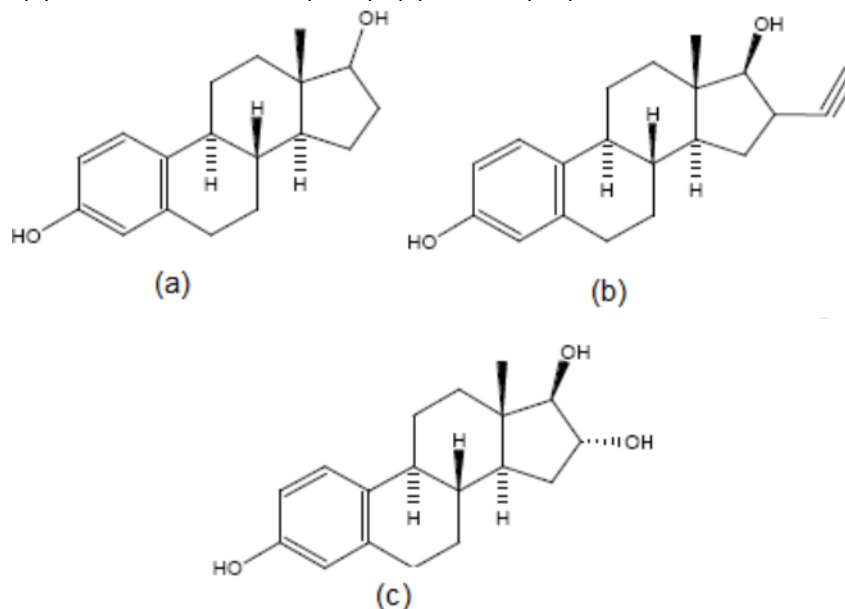
compostos naturais e sintéticos, os quais podem interferir no sistema endócrino de humanos e outros animais, afetando sua saúde, o crescimento e a reprodução. Essas substâncias são conhecidas como alteradores endócrinos, que são compostos classificados não segundo suas características estruturais, mas segundo seus efeitos nos organismos (BILA; DEZOTTI, 2007).

Estão incluídos neste grupo os estrógenos, que são substâncias químicas produzidas e secretadas pelas glândulas endócrinas e que, lançadas na corrente sanguínea, coordenam o funcionamento do organismo como um todo. Algumas funções que controlam são: atividades de órgãos completos, níveis de sais, açúcares e lípidos no sangue, o uso e armazenamento de energia, o crescimento e o desenvolvimento de um determinado organismo, sua reprodução e suas características sexuais (GHISELLI; JARDIM, 2007).

Podem ser citados como exemplo de alteradores endócrinos, os estrógenos naturais 17  $\beta$ -estradiol, estrona e estriol, os quais podem simular ou impedir a atuação do sistema endócrino, causando problemas no controle de várias funções vitais à biota. Nos organismos superiores, a estrona é produzida como um metabolito do 17  $\beta$ -estradiol, enquanto que o estriol é um produto de biotransformação dos outros dois. Quanto aos estrogênios sintéticos, são exemplos o valerato de estradiol, o 17 $\alpha$ -etinilestradiol, o mestranol e o dienolestrol (RANG et al., 2001), constituintes de fármacos utilizados como contraceptivos ou para reposição hormonal.

A Figura 4 apresenta as estruturas químicas dos principais estrógenos estudados no meio ambiente, os naturais 17  $\beta$ -estradiol, estriol, e o sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol.

Figura 4. Estruturas dos estrógenos de interesse no presente trabalho. (a) 17 $\beta$ -estradiol (E2); (b) 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2); (c) estriol (E3).



Essas substâncias ocorrem na excreta humana de forma natural ou através do consumo de fármacos que as contenham e, apesar de possuírem meia-vida relativamente curta quando comparados a outros microcontaminantes orgânicos (como alguns pesticidas), os estrógenos naturais e sintéticos, são introduzidos de forma contínua no ambiente, o que lhes confere um caráter de persistência (JOHNSON, 2004).

Apesar do efeito diluidor que os emissários submarinos pressupõem, e os baixos níveis ambientais esperados, os estrógenos apresentam características alteradoras no sistema endócrino mesmo em baixas concentrações.

Outro problema decorrente desta estratégia de gerenciamento de efluentes reside no fato de que os estrógenos excretados pela biota encontram-se conjugados (ligados ao ácido glucurônico ou sulfato), forma inativa biologicamente, e durante os processos que ocorrem no reator das estações de tratamento ou mesmo na natureza, bactérias convertem a forma inativa (conjugada) para sua forma ativa biologicamente (forma livre) (D'ASCENZO et al., 2003; YOUNG ET AL., 2004).

Tarrant et al., (2001) mostraram que corais da ordem Scleractinia podem absorver estrógenos da coluna d'água em concentrações na faixa de 300 pg L<sup>-1</sup>. Casanova-Nakayama et al. (2011), afirmam que a suscetibilidade a patologias nos

peixes aumenta quando existe uma pequena exposição aos estrógenos, afetando diretamente a biota marinha. Outras evidências mostram que o 17  $\beta$ -estradiol e 17  $\alpha$ -etinilestradiol possuem efeito estrogênico em peixes em concentrações na ordem de  $\text{ng L}^{-1}$  (JOBILING et al., 2004).

Estudos em laboratório com esponjas, crustáceos, moluscos e equinodermos demonstraram que os estrógenos podem levar a diversos efeitos adversos (LEI et al., 2014; REYHANIAN et al., 2011; PARTRIDGE et al., 2010; CABAS et al., 2012).

Os mamíferos, incluindo o homem, excretam estrógenos através da urina ou fezes, os quais são lançados no ambiente, chegando aos mananciais superficiais e/ou subterrâneos (BILA; DEZOTTI, 2007; REIS FILHO et al., 2006; GHISELLI; JARDIM, 2007), e finalmente aos oceanos. A quantidade média de estrógenos excretada diariamente pelas mulheres é de 3,5  $\mu\text{g}/24\text{h}$  de estradiol e 8  $\mu\text{g}/24\text{h}$  de estriol respectivamente na idade fértil (entre a menarca e a menopausa), enquanto que durante a gravidez esses valores atingem 259  $\mu\text{g}/24\text{h}$  de estradiol 6000  $\mu\text{g}/24\text{h}$  de estriol (KOSTICH et al., 2013).

Em estudo realizado por Saravanabhavan et al. (2009), onde foram analisadas amostras de água do mar de dois portos do Canadá (Oceano Atlântico), foram encontradas concentrações médias de 1,5 e 1,8  $\text{ng L}^{-1}$  de estrona e 17  $\beta$ -estradiol, respectivamente. Ao analisar sedimento marinho do mar da Tasmânia (Oceano Pacífico), Braga et al. (2005), encontraram estrona na faixa de 0,16 a 1,17  $\text{ng g}^{-1}$ , 17  $\beta$ -estradiol entre 0,22 e 2,48  $\text{ng g}^{-1}$  e 17  $\alpha$ -etinilestradiol entre <0,05 e 0,5  $\text{ng g}^{-1}$ .

Estrógenos também foram encontrados no ambiente marinho por outros autores (POJANA et al., 2007, ISOBE et al., 2006, entre outros), porém, no Brasil, poucos são os estudos sobre a presença e efeitos dos estrógenos no ambiente, sendo que a grande maioria é feita em rios ou em ETEs (LOPES, 2007; SOUZA, 2008, JARDIM et al, 2012), ficando a área litorânea restrita a poucos estudos relacionados a esses contaminantes (FROEHNER et al., 2012; KUSTER et al., 2009).



## 2 Objetivos

O objetivo geral deste estudo foi o de contribuir para a geração de dados sobre a ocorrência e dispersão de microcontaminantes orgânicos no ambiente (estrógenos), avaliando assim as possíveis fontes de aporte dessa classe de contaminantes. Neste trabalho a região de estudo escolhida é a mais densamente habitada do litoral do Estado de São Paulo, compreendendo os municípios de São Vicente e Santos.

Como objetivos específicos, destacam-se:

-Otimização e validação de método para determinação de 17  $\beta$ -estradiol, estriol e 17  $\alpha$ -etinilestradiol em águas oceânicas e estuarinas.

-Aplicar o método validado na avaliação da ocorrência dos estrógenos estudados na região de Santos/São Vicente.

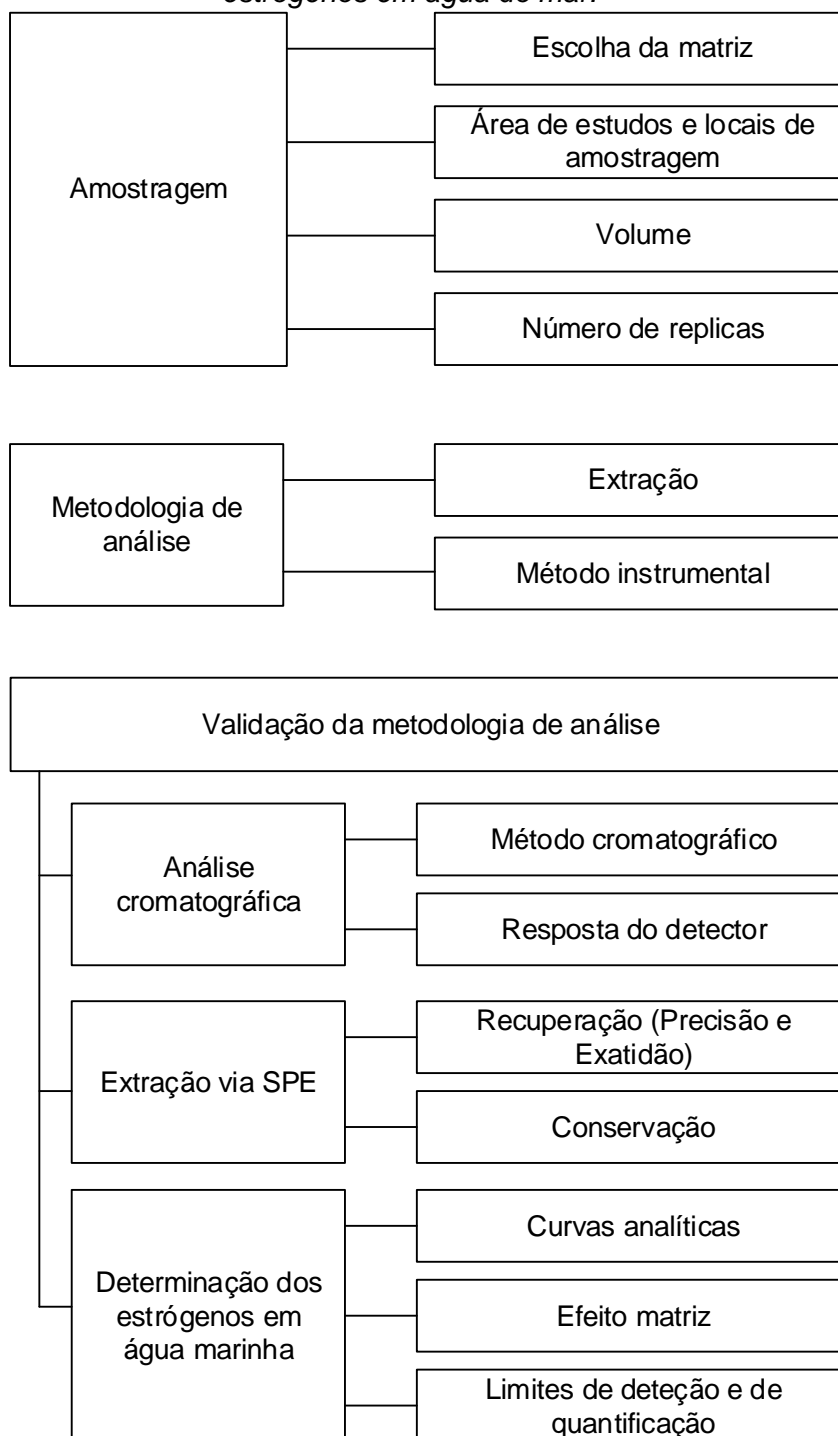
-Avaliar a dispersão desses compostos na região estudada, e suas possíveis fontes.

-Avaliar a influência da sazonalidade na ocorrência e distribuição desses compostos.

### 3 Materiais e Métodos

A definição e validação da metodologia analítica para a determinação de estrógenos em água do mar seguiu as etapas, resumidamente apresentadas, na Figura 5.

Figura 5. Definição e validação da metodologia analítica para a determinação de estrógenos em água do mar.

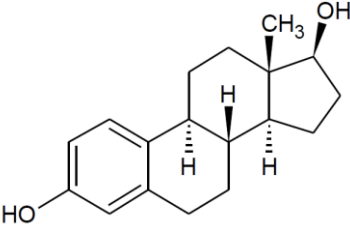
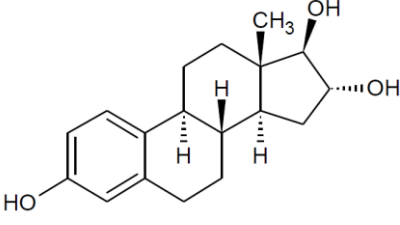
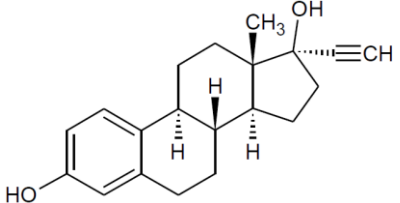


Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.1. Escolha da matriz de estudo

Dentre as possíveis matrizes ambientais (água, material particulado em suspensão e sedimento) escolheu-se a água devido às características físico-químicas dos estrógenos, as quais estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos estrógenos de interesse nesse trabalho.

Estrutura Química	pKa*	Log K <sub>ow</sub> **	Solubilidade (mg L <sup>-1</sup> )***
	10,23	3,94	12,96
	10,25	3,57	13,00
	10,25	4,15	4,8

\*Schafer et al., 2011, \*\*Combalbert & Hernandez-Raquet, 2010, \*\*\*Hurwitz & Liu, 1977

Como os estrógenos apresentam sorção média (log K<sub>ow</sub> variando entre 3 e 4) e solubilidade relativamente alta (frente a outros contaminantes orgânicos, como pesticidas), espera-se que a maior fração dos mesmos esteja dissolvida na água.

### 3.2. Área de estudo

A região estuarina de Santos/São Vicente apresenta vários problemas ambientais decorrentes do processo de desenvolvimento socioeconômico por lá estabelecido.

A região está localizada no litoral central da zona costeira do Estado de São Paulo, sendo uma área de transição entre as águas doces da bacia hidrográfica da baixada santista (UGRHI-7) e o Oceano Atlântico (Figura 6). A mesma possui uma rede de canais interligando a baía de Santos, sendo os principais que circundam a

Ilha de São Vicente o canal de Santos a leste e o Canal de São Vicente a oeste. Outros canais que ligam as águas salinas aos rios que nascem e descem das escarpas da Serra do Mar são os Canais de Piaçaguera e de Bertioga.

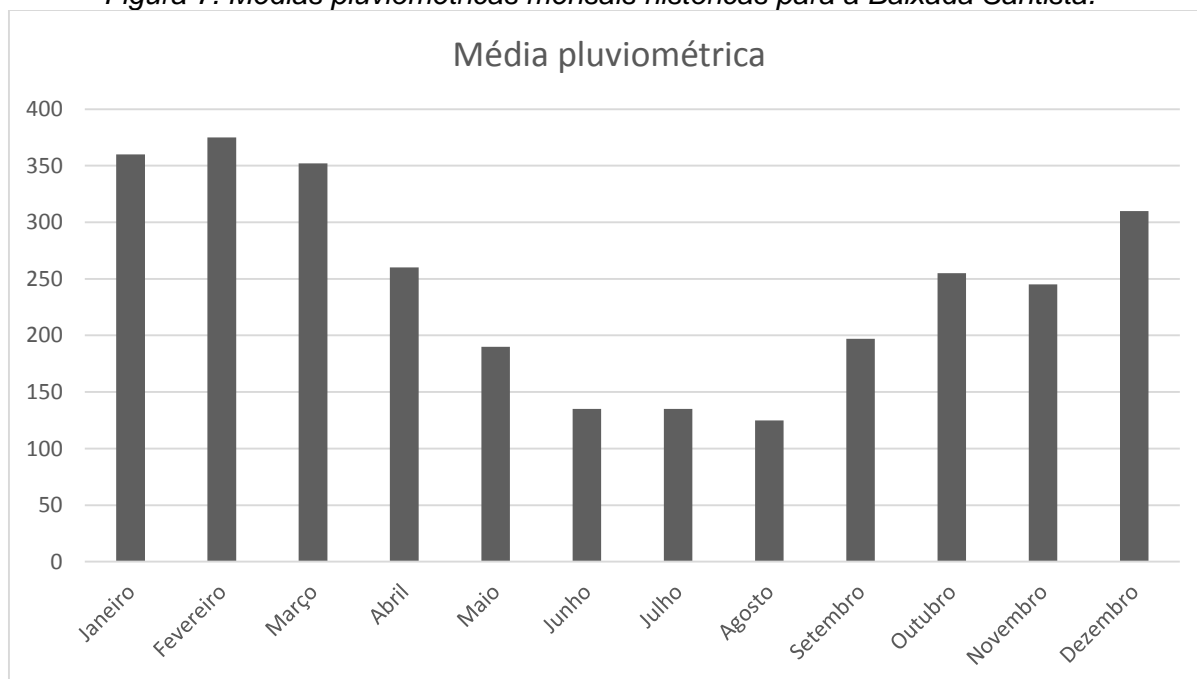
Figura 6. (a) Área de estudo, complexo estuarino de Santos/São Vicente. (b) Vila dos Pescadores. (c) Palafitas no Rio dos Bugres.



Fonte: Google Maps, 2016, Instituto Ecofaxina, 2016.

A Figura 7 apresenta as médias pluviométricas mensais históricas para a Baixada Santista. Verifica-se a sazonalidade de precipitação durante o ano, sendo o inverno com sensível diminuição de chuvas, principalmente em junho, julho e agosto, se comparadas aos meses de verão.

*Figura 7. Médias pluviométricas mensais históricas para a Baixada Santista.*



Fonte: Companhia..., 2015.

Quanto à mistura de água doce e água salgada, o estuário de Santos/São Vicente é considerado um ambiente misturado tendendo a estratificação em função do regime de descargas fluviais da bacia hidrográfica (BONNETI FILHO, 1996). Devido a essa dependência, a cunha salina é detectada até aproximadamente 20 km da baía de Santos até o curso dos principais rios, tendo a região uma peculiaridade de possível mudança da cunha em função do bombeamento de água doce da usina hidrelétrica Henry Borden (Figura 6), a qual funciona como um rio artificial, desaguando diretamente no principal afluente do estuário, o rio Cubatão.

O sistema Billings, origem da água utilizada pela usina hidrelétrica Henry Borden, foi concebido na década de 1920 e consiste na inversão das águas do Alto Tietê, através do canal do Rio Pinheiros. Por meio de bombeamentos executados em estações elevatórias, o canal do Rio Pinheiros tem seu fluxo invertido, abastecendo o

reservatório Billings, o qual se estende até as escarpas da Serra do Mar, passando pelo reservatório do Rio das Pedras, onde há a captação da Usina Henry Borden.

As principais forçantes de circulação e dos processos de mistura entre as águas doces continentais e as águas salgadas do oceano são a maré, a vazão das descargas dos rios, o gradiente de densidade das águas, o vento e a circulação costeira adjacente. No sistema em estudo, destaca-se o efeito de maré como o fenômeno de maior importância na circulação (HARARI et al., 2000). A maré dos canais é irregular, de caráter misto, com amplitudes médias de 1,23 m na sizígea (luas nova e cheia) e 0,24 m de quadratura (luas minguante e crescente) (HARARI et al., 2000; BERZIN; LEITÃO, 1997).

Essas variáveis são fundamentais no entendimento da água salobra da região, a qual influencia diretamente no método de análise dos estrógenos, uma vez que a força iônica do meio influencia a solubilidade em água destas substâncias e também a sua extractibilidade empregando-se extração em fase sólida (SPE).

Além dos canais naturais que interligam os rios ao Atlântico Sul, a ilha de São Vicente apresenta 12 canais artificiais de drenagem (Figura 8). No entanto, devido ao descarte ilegal de esgoto sanitário, houve a necessidade da instalação de comportas em suas extremidades, próximos à praia. Dessa forma, quando as comportas são fechadas, os canais são drenados até a estação de pré-condicionamento, sendo descartado no emissário submarino. Porém, caso o volume de chuvas seja alto, as comportas são abertas e o fluxo liberado diretamente nas praias (AMBROZEVICIUS; ABESSA, 2008).



Figura 8. (a) Canais artificiais existentes em Santos e São Vicente. (b) Canal de Santos (sentido estuário de Santos, sentido Baía e comportas)



Fonte: (a) Google Maps, (2016); (b) Elaborado pelo autor



Os índices de coleta e tratamento de esgoto sanitário na região não são satisfatórios, resultando em um sistema ineficiente na retirada de matéria orgânica, que acaba sendo lançada na baía de Santos ou nos rios a montante do estuário. Os índices de coleta e tratamento de esgoto de Santos, São Vicente e Cubatão estão apresentados na Tabela 2, bem como os corpos receptores destes efluentes.

*Tabela 2. Informações sobre a infra-estrutura de saneamento básico da região do complexo estuarino de Santos/São Vicente.*

Município	Coleta de esgoto	Tratamento de esgoto*	Estações de Tratamento	Tipo de Tratamento	Corpo receptor
Santos	98%	0%	Estação de pré-condicionamento de esgoto + Emissário submarino	Gradeamento	Baía de Santos
São Vicente	71%	18%	Duas estações de tratamento de esgoto + Emissário de Santos	Lodo ativado	Rio Mariana e estuário de Santos
Cubatão	60%	100%	Estação de tratamento de esgoto	Lagoa aerada	Rio Cubatão

\*considera-se porcentagem de tratamento nula para emissário submarino sem sistema primário.  
Fonte: Companhia..., 2015.

No canal de Santos, pode ser considerado como fontes de matéria orgânica o terminal portuário e suas atividades, moradias irregulares, e a drenagem urbana. O canal de São Vicente destaca-se por ser destinatário de águas provindas de vários rios da região, com a margem esquerda densamente ocupada, incrementando o canal com uma carga considerável de esgoto sanitário. Já a baía de Santos, além da poluição produzida pelo Porto de Santos, possui emissário submarino que atende uma população máxima de 1,3 milhões de habitantes, e recebe água proveniente dos canais artificiais.

Além do cenário supracitado, a Ilha de São Vicente possui 20% de sua população vivendo em núcleos habitacionais irregulares, dessa forma, não contam com a oferta de serviços de infra-estrutura urbano-sanitária adequados (SAMPAIO, 2008). Nessas comunidades, os esgotos sanitários são lançados diretamente nos corpos d'água dos canais de Santos, São Vicente e de drenagem urbana artificiais.

### 3.3. Campanha Amostral

Considerando a ineficiência do saneamento básico da Ilha de São Vicente e arredores, foram feitas amostragens nas áreas que apresentam maior aporte de esgoto sanitário, além do emissário submarino a jusante de Santos, com o intuito de estudar a ocorrência e a dispersão dessa classe de contaminantes no sistema estuarino de Santos/São Vicente.

Os locais de amostragem foram definidos a partir do Relatório de Qualidade das Águas Superficiais do Estado de São Paulo (COMPANHIA..., 2012), contemplando áreas que apresentam atividades potencialmente poluidoras, estando os locais de maior aporte de esgoto sanitário destacados na Figura 9.

*Figura 9. Pontos com maior influência de esgotamento sanitário.*



Fonte: Companhia..., 2012.

Foram realizadas três amostragens durante o estudo: 26/03/2014, 10/02/2015 e 17/06/2015, sendo que os resultados obtidos na primeira amostragem serviram de guia para as amostragens realizadas no ano de 2015. As amostragens foram realizadas com o auxílio de uma garrafa de Van Dorn de 2 litros (Figura 10), sendo coletados 4 litros de água em cada ponto, através de lançamentos sucessivos da

garrafa. As tábuas de marés para as três amostragens estão apresentadas na Tabela 3.

Figura 10. Garrafa de Van Dorn utilizada nas amostragens.



Tabela 3. Tábuas de maré para os dias das campanhas de amostragem. Porto de Santos, Torre Grande (Centro de Hidrografia da Marinha).

26/03/2014		10/02/2015		17/06/2015	
Quadratura		Sizígia		Sizígia	
Horário	Amplitude(m)	Horário	Amplitude(m)	Horário	Amplitude(m)
00:56	1,3	00:02	0,5	02:26	1,3
07:45	0,5	05:43	1,0	09:21	0,1
13:00	1,2	12:47	0,6	16:00	1,4
18:24	0,2	18:26	1,1	21:54	0,4

A primeira amostragem, realizada em 2014, incluiu três pontos amostrais na baía de Santos, próximo à saída do emissário submarino e doze pontos amostrais dentro do estuário, sendo todos realizados à profundidade média do local e em triplicata.

Devido à baixa variação entre as triplicatas, as amostras coletadas em 2015 foram realizadas em duplicada, tendo no entanto, maior número de pontos amostrais na baía de Santos, objetivando melhor entendimento dos processos de dispersão dos estrógenos na região, bem como a melhor avaliação da contribuição do emissário àquele local (Figura 11). Além do incremento no número de pontos, a amostragem na baía de Santos foi realizada em duas profundidades, superfície e fundo.

Figura 11. Localização dos pontos amostrais. "\*" referem-se aos pontos amostrados na baía em 2014, e "δ" referem-se aos pontos amostrados na baía em 2015. Os pontos dentro dos canais e no estuário de Santos foram iguais para todas amostragens.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os pontos amostrais foram codificados em SV para o canal de São Vicente, ES para o estuário de Santos, CS para o canal de Santos e EM para o emissário submarino (região da baía de Santos), estando as coordenadas na Tabela 4.

*Tabela 4. Coordenadas dos pontos amostrais das campanhas realizadas em 2013 e 2014.*

SV1	SV2	SV3	ES1	ES2	ES3
23°58'29.60"S	23°57'21.90"S	23°56'8.40"S	23°55'6.06"S	23°54'46.20"S	23°55'16.63"S
46°25'1.2"O	46°25'9.5"O	46°23'28.2"O	46°23'22.3"O	46°22'13.53"O	46°20'25.41"O
EM1*	EM2*	EM3*	CS1	CS2	CS3
24° 0'15.60"S	24° 0'15.60"S	24° 0'15.60"S	23°55'43.82"S	23°57'8.36"S	23°59'4.98"S
46°21'2.8"O	46°20'59.3"O	46°20'55.8"O	46°19'1.1"O	46°18'26.54"O	46°17'21.71"O
EM1	EM2	EM3	EM4	EM5	EM6
23°59'24.25"S	24° 0'27.81"S	24° 0'33.21"S	24° 0'33.19"S	23°59'27.04"S	23°59'22.31"S
46°19'36.26"O	46°20'16.33"O	46°20'59.03"O	46°21'54.22"O	46°20'53.6"O	46°22'2.45"O

\*Amostragem realizada em 2012.

Logo após a amostragem, as amostras foram transportadas sob refrigeração (gelo reciclável em caixa isotérmica) até o CLP-UNESP (São Vicente). No laboratório coordenado pelo Prof. Dr. Denis Moledo de Souza Abessa, as amostras foram filtradas em filtros de celulose regenerada de 0,45µm e processadas por SPE, sendo que os cartuchos foram transportados, também sob refrigeração, até o IQ/UNESP onde procedeu-se a eluição e análise dos extratos.

### 3.4. Análise Química

A determinação de estrógenos em água do mar pode ser realizada através de diversas metodologias, envolvendo diferentes técnicas de extração e de análise, sendo algumas delas apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Algumas metodologias de análise para determinação de estrógenos no ambiente marinho.

Referência	Matriz	Estrógenos	Preparo da amostra	Técnica de Análise
Aydin & Talinli, 2013	Água	E1, E2, E3, EE2	SPE	LC-MS/MS
Arditsoglou <i>et al.</i> , 2012	Água, material particulado e sedimento	E1, E2, E3, EE2	Água – SPE Material particulado e sedimento – Ultra-som	GC-MS
Froehner <i>et al.</i> , 2012	Sedimento	E1, E2, EE2	Ultra-som e SPE	HPLC UV
Bertin <i>et al.</i> , 2011	Sedimento	E1, E2, E3, EE2	Ultra-som	GC-MS
Zhou <i>et al.</i> , 2011	Água	E1, E2, E3, EE2	SPE	GC-MS
Singh <i>et al.</i> , 2010	Água	E1, E2, E3, EE2	Extração líquido-líquido	GC-MS
Hibberd <i>et al.</i> , 2009	Água e sedimento	E2, EE2	Água - SPE Sedimento - MAE	GC-MS/MS
Kuster <i>et al.</i> , 2009	Água	Estrógenos e estrógenos conjugados*	SPE	LC-MS/MS
Zhang <i>et al.</i> , 2009	Sedimento e água dos poros do sedimento	E1, E2, EE2	Água – SPE Sedimento – ASE	GC-MS

\*Estríol-3-sulfato, estríol-16-glicuronídeo, estradiol-17-glicuronídeo, estrona-3-glicuronídeo, estradiol-3-sulfato, estríol, estrona-3-sulfato, estradiol, etinilestradiol, estrona, dietinilestradiol

ASE = Accelerated Solvent Extraction

E1 = estrona; E2 = 17  $\beta$  estradiol; EE2 = 17  $\alpha$  etinilestradiol; E3 = estríol

MAE = Microwave Assisted Extraction

GPC = Gel Permeation Chromatography

SPE = Solid Phase Extraction

GC-MS = cromatografia à gas acoplada à espectrometria de massas

LC-MS/MS = cromatografia à líquido acoplada a espectrometria em modo tandem

HPLC-UV = cromatografia à líquido com detecção na região do UV

A determinação dos estrógenos pode ser realizada via cromatografia líquida ou gasosa, como pode ser visto na Tabela 5. No caso da escolha da cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas, existe a necessidade da derivatização dos analitos, com o intuito de melhorar a detectabilidade dos mesmos.

Por outro lado, ao utilizar a cromatografia em fase líquida com detector de fluorescência, tal etapa não é necessária, e a detectabilidade e seletividade

equiparam-se à atingida quando utilizado o espectrometro de massas como detector. Devido a esses fatores, a técnica de análise instrumental escolhida foi a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (HPLC/Flu).

A extração em fase sólida (SPE), técnica amplamente utilizada para extração de substâncias da fase aquosa, foi escolhida por oferecer recuperação satisfatória dos analitos, eliminar interferentes contidos na matriz e conservação dos estrógenos na fase polimérica até o momento da análise instrumental.

### 3.5. Validação do método de análise cromatográfica

Os padrões dos estrógenos utilizados neste trabalho foram o 17  $\beta$ -estradiol, estriol e 17  $\alpha$ -etinilestradiol adquiridos da Sigma-Aldrich, (EUA), todos com grau de pureza > 98%.

O método cromatográfico utilizado na determinação dos estrógenos por HPLC/Flu vem sendo utilizado há alguns anos nesse grupo de pesquisa (LOPES et al., 2010; MOURA, 2009; ZOCOLO, 2010). Tendo como partida tais estudos, as condições cromatográficas utilizadas nesse trabalho estão sumarizadas na Tabela 6.

*Tabela 6. Condições cromatográficas (HPLC/FLU, Varian LC-920) adaptadas de Zocolo (2010).*

Coluna	Luna (Phenomenex) C18 (4,6mm x 250mm x 5 $\mu$ m)
Fase móvel	MeCN 0,1%H <sub>3</sub> CCOOH:H <sub>2</sub> O 0,1% H <sub>3</sub> CCOOH
Vazão da fase móvel	1 mL min <sup>-1</sup>
Modo de eluição	Isocrático 40%A (H <sub>2</sub> O) e 60%B (MeCN)
Volume de injeção	20 $\mu$ L
Temperatura da coluna	27°C
Detector	Flu ( $\lambda_{exc}$ =230nm, $\lambda_{emi}$ =360nm)

\*MeCN = acetonitrila

O método cromatográfico foi avaliado de acordo com sua eficiência, resolução, assimetria dos picos e variação da resposta quanto da alteração das concentrações dos analitos. Os dois primeiros parâmetros foram calculados, respectivamente, via as equações:

$$N = 16\left(\frac{t_R}{W}\right)^2 \quad (1)$$

$$R_s = \frac{2[t_{R(j)} - t_{R(i)}]}{W_i + W_j} \quad (2)$$

Onde  $t_R$  é o tempo de retenção do analito e  $W$  é a largura do pico do analito

Para avaliar a variação da resposta do detector de fluorescência, foi construído um modelo empírico. Para isso foram preparadas soluções dos estrógenos em acetonitrila nas seguintes concentrações: 100, 80, 64, 44, 26, 13, 7,5 e 2,5 ng mL<sup>-1</sup>, preparados através de diluições sucessivas e em triplicata.

O modelo empírico teve por base a análise de regressão, utilizando ajuste por mínimos quadrados, onde o vetor  $y$  (resposta) é proporcional a matriz  $X$  (concentrações) multiplicada por um vetor  $b$  (coeficientes):

$$\hat{y} = Xb \quad (3)$$

A matriz  $y$  foi obtida nas análises das soluções padrão, e sendo conhecida as concentrações utilizadas, os coeficientes podem ser determinados através da equação (NETO et al., 2010):

$$b = (X^T X)^{-1} X^T y \quad (4)$$

Previamente à construção do modelo, os resultados obtidos foram sujeitos ao teste de Grubbs (GRUBBS, 1969) com o intuito de determinar valores anômalos, sendo calculado o valor  $Q$  para cada resposta analítica através da equação (5). Esses valores  $Q$  foram confrontados com o valor  $z$  tabelado, afim de aceitar ou rejeitar a hipótese de anormalidade.

$$Q = \frac{|(X_i - \bar{X})|}{s} \quad (5)$$

A etapa subsequente à construção do modelo empírico foi a validação do mesmo. Para isso, foram feitas análises em triplicata das soluções padrão na concentração de 80 ng mL<sup>-1</sup> e posteriormente procedeu-se à quantificação utilizando o modelo empírico.

### 3.6. Validação do método de extração

Como forma de validar o método de extração dos analitos nas amostras, foram preparadas soluções análogas à água do mar. Para tal, sais em quantidades equivalentes à água do mar foram adicionadas à água deionizada (TRUJILLO; THURMAN, 2011), (Tabela 7).

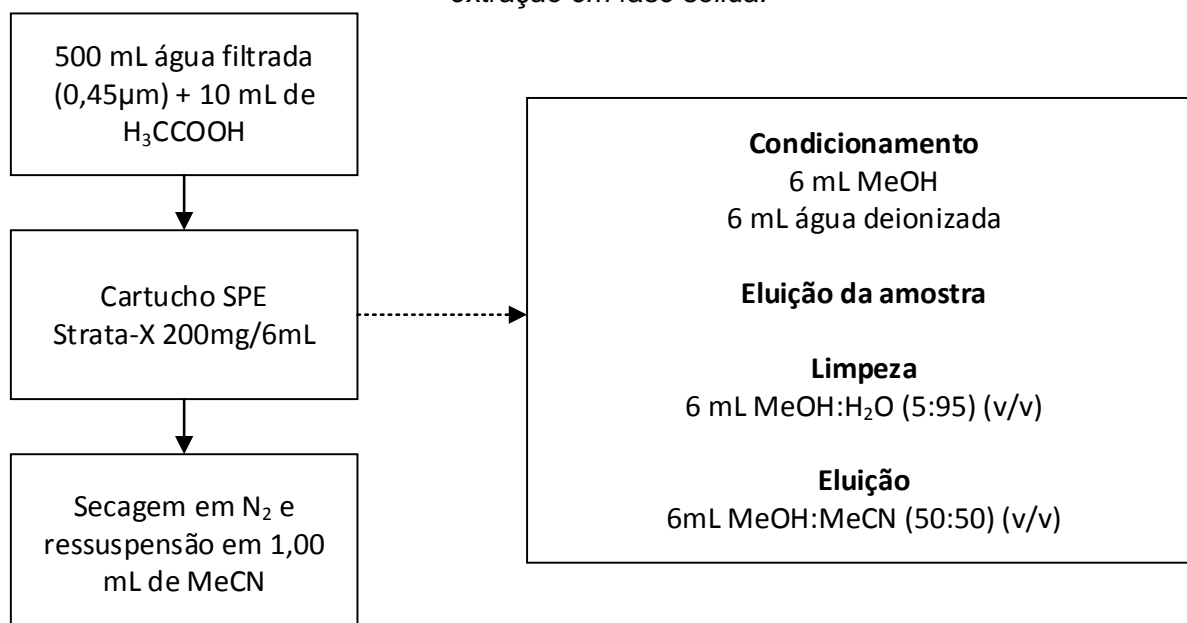


*Tabela 7. Concentração de sais majoritários presentes na água do mar, utilizados para preparo da água marinha artificial.*

Sal	g L <sup>-1</sup>	Sal	g L <sup>-1</sup>
NaCl	24,53	KBr	0,1
KCl	0,7	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,03
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,09	MgCl <sub>2</sub>	10,78
NaHCO <sub>3</sub>	0,2	CaCl <sub>2</sub>	1,16

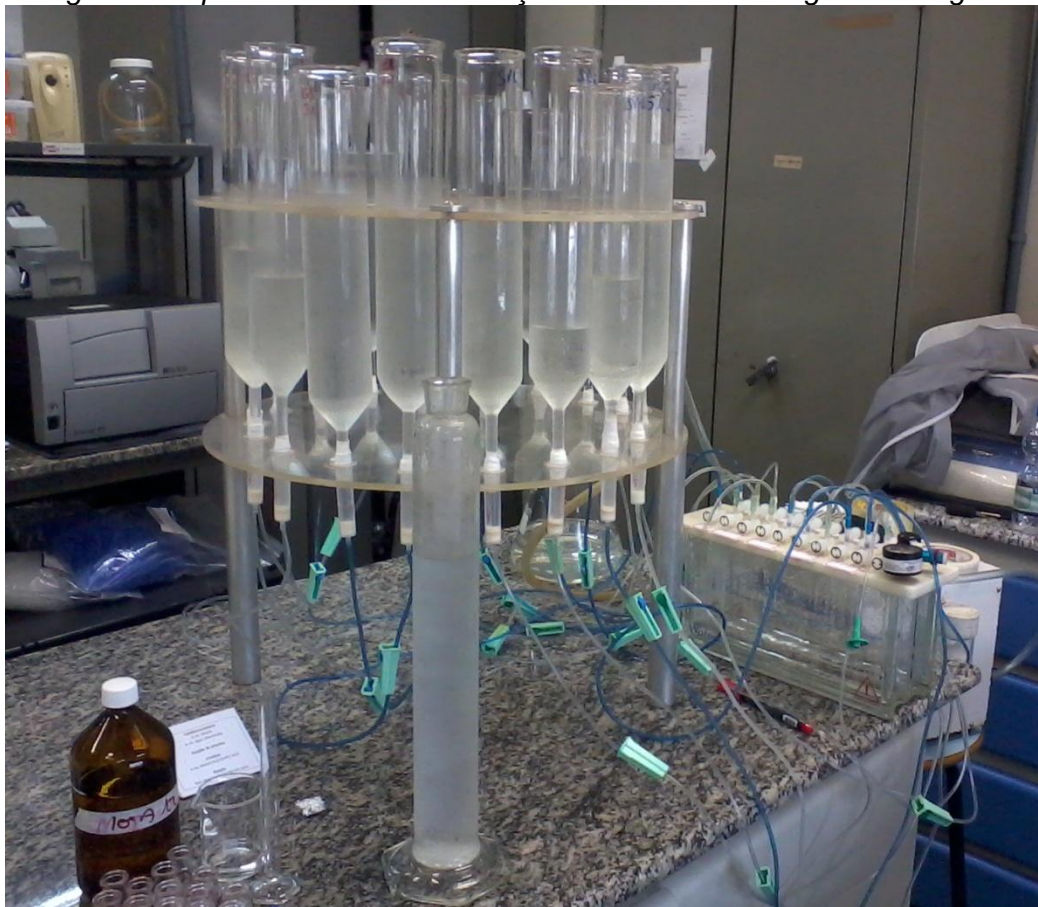
A extração dos estrógenos de interesse foi realizada através da adaptação de método de extração de estrógenos em água doce já existente (ZOCOLO, 2010). As etapas envolvidas foram: condicionamento do cartucho SPE Strata-X Phenomenex (200mg/6mL) com 6 mL de metanol e 6 mL de água, passagem de 500 mL de amostra acidificada com 10 mL de ácido acético (filtrada com filtro de 0,45µm, para retirada do material particulado), limpeza com 6 mL de mistura metanol:água 5%:95%, eluição utilizando 6mL de mistura 1:1 de acetonitrila e metanol, secagem sob fluxo suave de N<sub>2</sub>, e por fim, ressuspensão em 1,00 mL de acetonitrila (Figura 12). O aparato utilizado na extração com a utilização dos cartuchos de extração em fase sólida pode ser visto na Figura 13.

*Figura 12. Extração de estrógenos em água superficial utilizando cartuchos de extração em fase sólida.*



Fonte: Elaborado pelo autor.

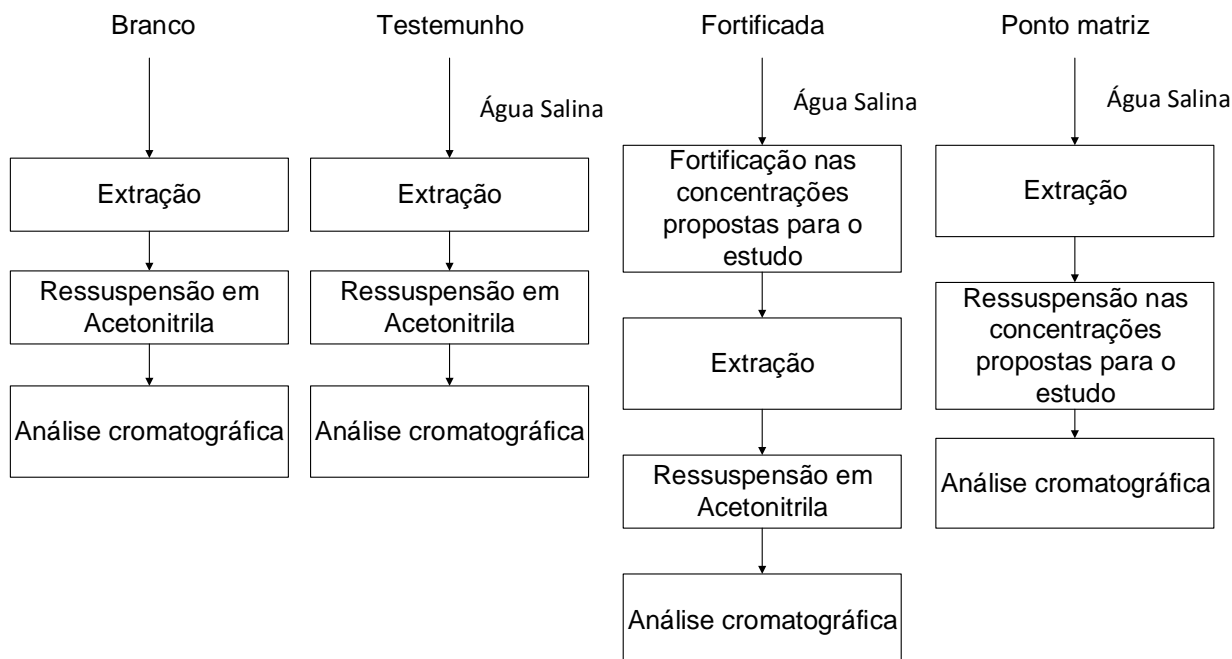
*Figura 13. Aparato utilizado na extração via SPE dos estrógenos da água do mar.*



Fonte: Elaborado pelo autor.

Foram preparados quatro tipos de amostras: branco, testemunho, ponto matriz e amostra fortificada (Figura 14).

Figura 14. Amostras utilizadas durante o estudo de validação da extração dos analitos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A amostra “branco” é o branco do método, consistindo de água ultrapura e incluindo todas as etapas, sendo utilizada para avaliar a ocorrência de interferentes que venham dos materiais/reagentes utilizados no processo de extração. A amostra “testemunho” contempla todas etapas descritas no parágrafo anterior, e é utilizada para avaliar a influência da matriz (água salina) no desempenho do método.

A amostra “fortificada” é obtida pela adição de uma concentração conhecida dos analitos à solução salina; enquanto que para a amostra denominada “ponto matriz” tem essa adição, da mesma concentração utilizada para a amostra fortificada, porém no estágio final da extração, na ressuspensão (concentrações utilizadas de 80 ng mL<sup>-1</sup> e 27 ng mL<sup>-1</sup>). Essas concentrações foram escolhidas pois representam pontos dentro do modelo empírico proposto a ser testado, sendo uma em concentração baixo e outra em concentração alta.

Através dos resultados obtidos da extração em triplicata das amostras fortificadas e ponto matriz, foram obtidas as recuperações do método na extração dos analitos de interesse, ou seja, a capacidade do método em determinar quantitativamente um desejado analito de uma matriz inicial.

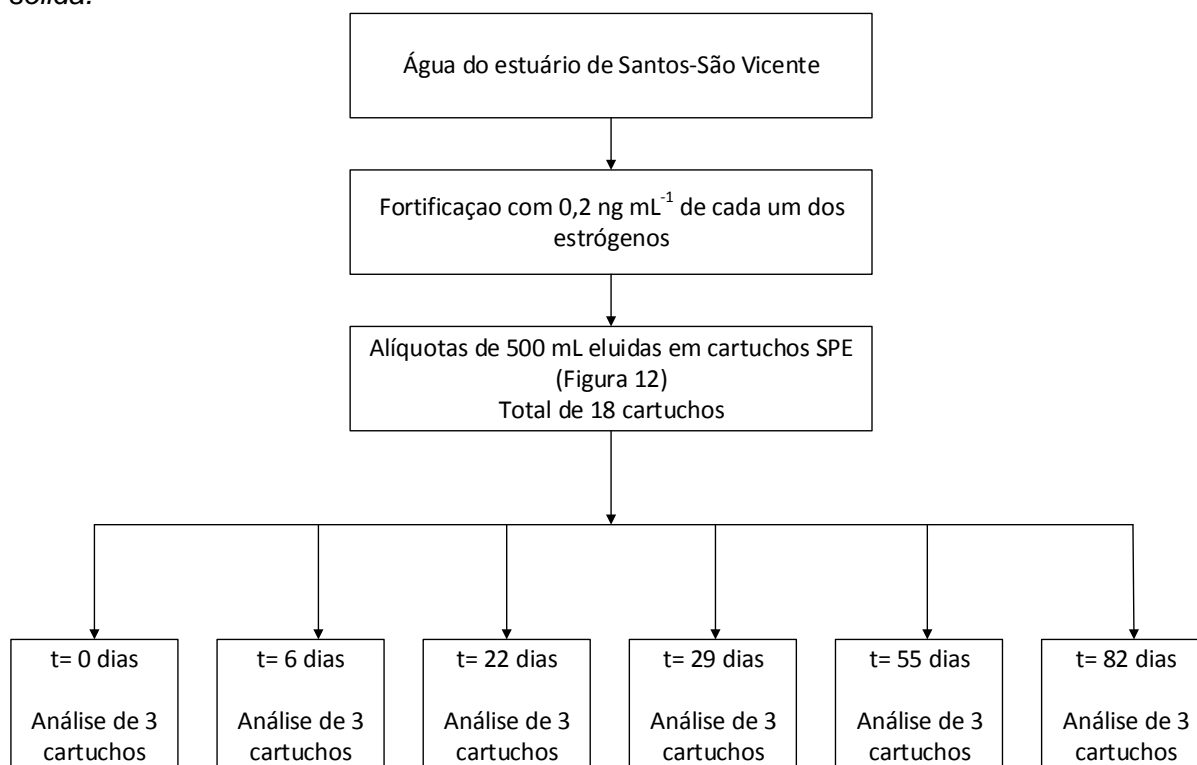
### 3.7. Conservação das amostras nos cartuchos de extração em fase sólida

A técnica de extração em fase sólida com a utilização de cartuchos contendo uma fase polimérica oferece, além da recuperação do analito de interesse e eliminação de interferentes provenientes da matriz, a possibilidade de conservar tal analito até o momento de análise.

Considerando-se que o local das análises das amostras (IQ-UNESP, em Araraquara) situa-se a cerca de 400 km do local de amostragem (Baixada Santista), a possibilidade de transportar os cartuchos SPE contendo os analitos extraídos das amostras, ao invés das próprias amostras de água representou um ganho extremo na logística deste estudo. Neste grupo de pesquisa, havia experiência no sentido da conservação de amostras submetidas a SPE, para análise de estrógenos, com água superficial (de rio) amostrada na região centro-oeste e analisada no IQ-UNESP (ZOCOLO, 2010) e com amostras de água superficial e esgoto sanitário coletadas no estado de São Paulo e analisadas na Espanha (MOURA, 2008). No entanto, sendo este o primeiro estudo focando a determinação de estrógenos em águas salobras e salinas, houve a necessidade de proceder um estudo de conservação das amostras após o processamento por SPE.

Foram fortificadas alíquotas de 500 mL de água salobra provenientes do estuário de Santos São Vicente (na concentração de  $0,2 \text{ ng mL}^{-1}$ ), as quais passaram pela primeira etapa do processo de extração (conforme descrito no item 3.6), em triplicata. Logo após a eluição das alíquotas de água fortificada, uma amostra foi extraída e o extrato analisado, sendo os resultados obtidos para esta, o tempo zero de armazenamento. As outras amostras (acondicionadas nos cartuchos) foram mantidas em freezer ( $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por 6; 22; 29; 55 e 82 dias antes de serem analisadas (Figura 15).

Figura 15. Estudo de conservação da amostra nos cartuchos de extração em fase sólida.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Concomitantemente à análise do extrato, foi injetado padrão analítico na concentração de  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ . Na Eq. 6, a área obtida na análise do extrato da amostra (cartucho SPE) foi numerador, enquanto a área obtida na análise do padrão o denominador do fator de extração ( $F_{Ext}$ ):

$$F_{Ext} = \frac{A_{extrato}}{A_{padrão}} \quad (6)$$

Essa correção é necessária devido às possíveis mudanças na detectabilidade do equipamento com o decorrer do tempo (mudanças físicas no equipamento, como troca da lâmpada do detector).

A normalidade dos dados foi testada através dos testes de Anderson-Darling e Shapiro-Wilk (RAZALI; WAH, 2011), com o auxílio do software Assistat v7.7. A estimativa de precisão relativa para comparação entre grupos foi feita através do cálculo do coeficiente de variação de Pearson com o auxílio do software Statex v1.4.2, sendo o mesmo programa utilizado para o cálculo da ANOVA de um fator.

A normalização dos dados foi feita através de autoescalamento, onde cada valor do grupo é subtraído pela média daquele grupo, e posteriormente esses valores obtidos são divididos pelo desvio padrão desse conjunto de dados. Tal transformação foi realizada no software Octave-2.1.72.

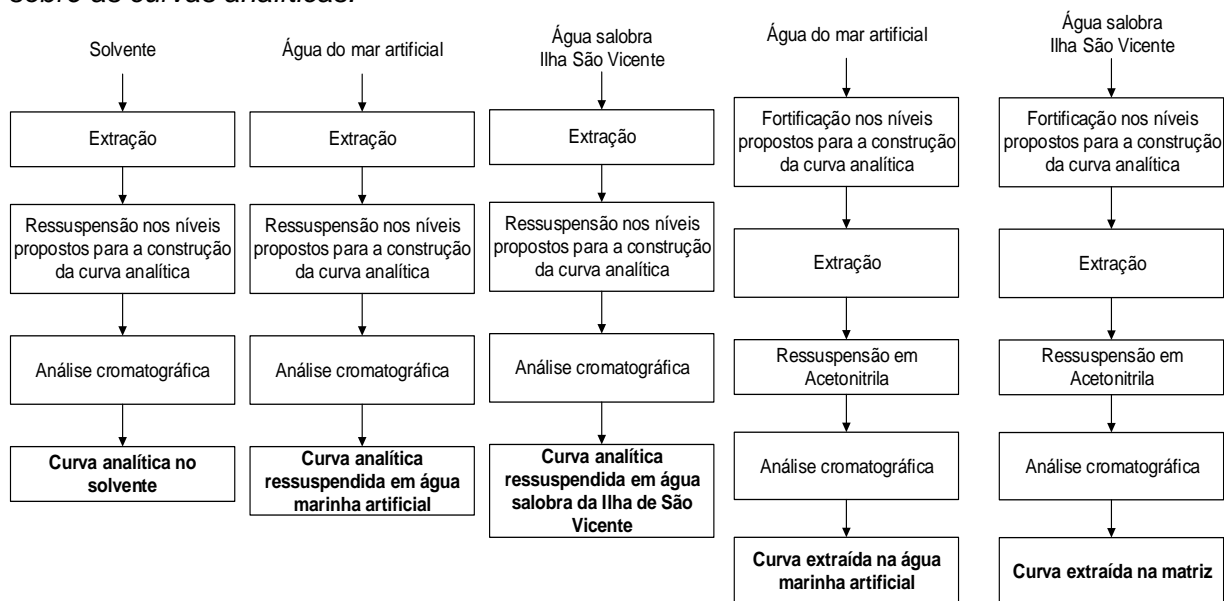
### 3.8. Curvas Analíticas e efeito matriz

Foram construídas cinco curvas analíticas para cada um dos três analitos: uma delas no solvente, duas em água marinha artificial e duas em uma mistura de água coletada em todo entorno da Ilha de São Vicente (em proporções iguais). Todas as curvas incluíram seis pontos (5; 20; 40; 60; 80 e 100 ng mL<sup>-1</sup> para cada um dos estrógenos), em duplicata com injeção em triplicata.

Uma das curvas construídas em água marinha artificial e uma das curvas realizadas em água salobra foram fortificadas (nos níveis propostos da curva) antes do método de extração dos analitos; que foram denominadas curva extraída e curva extraída na matriz, respectivamente. (Figura 16).

A utilização dessa curva para quantificação, bem como para comparação com as outras, deve-se à maior confiabilidade analítica por ela apresentada. Como os analitos são inseridos na mistura de água antes da extração, o analito proveniente da fortificação sofre interação com a matriz, eliminando assim possíveis efeitos causados por essa na recuperação dos compostos de interesse.

Figura 16. Procedimento utilizado no preparo das amostras inseridas nos estudos sobre as curvas analíticas.

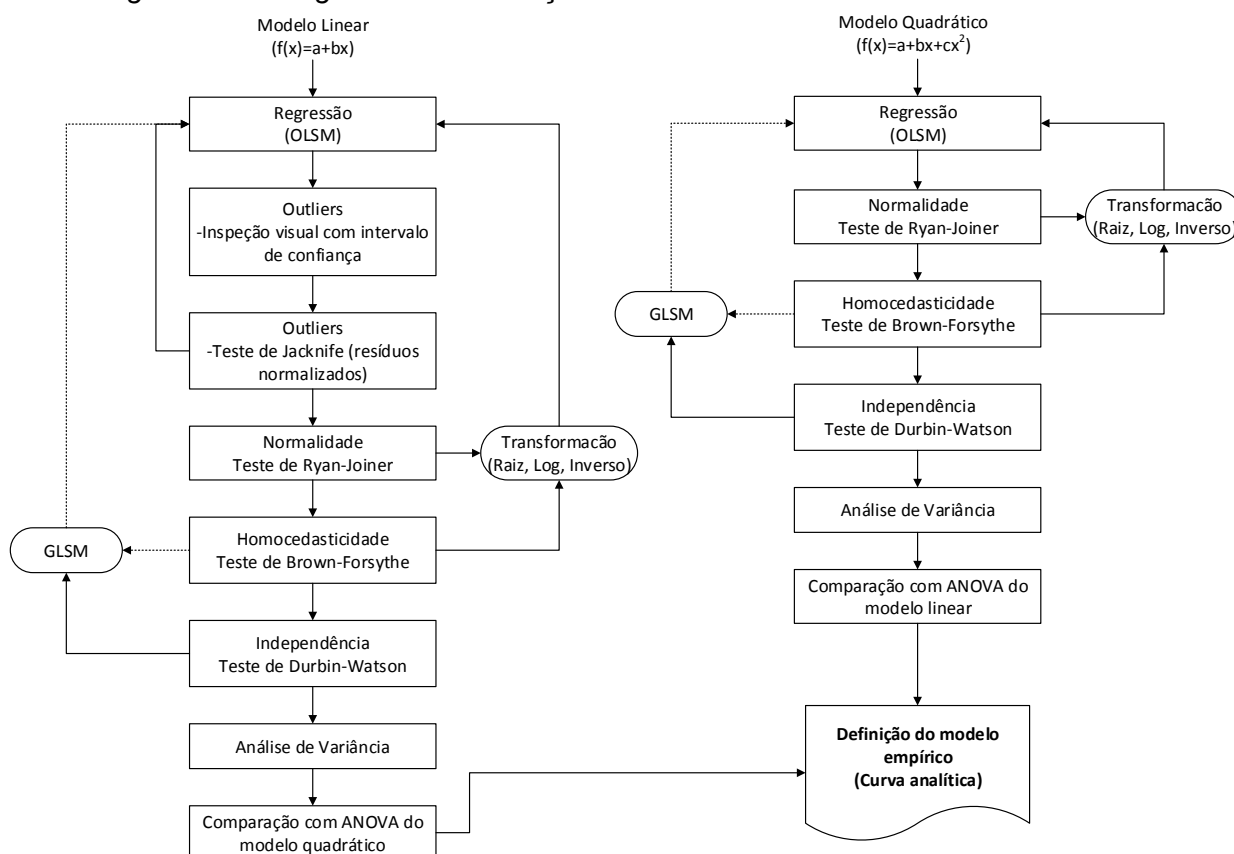


Fonte: Elaborado pelo autor.

Para cada grupo de dados (analito e diferentes curvas), foi realizada a regressão linear por quadrados mínimos ordinários (OLS), no entanto, para aceitação dessa técnica de otimização matemática, os resíduos do modelo devem apresentar homocedasticidade, independência e normalidade (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

Para comprovar tais suposições, foram feitos testes estatísticos para os três requisitos supracitados, bem como para a detecção de outliers, os quais poderiam afetar o ajuste de curva. O fluxograma para o processo da construção do modelo é apresentado na Figura 17.

Figura 17. Fluxograma da construção das curvas analíticas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A construção da curva analítica teve por base a análise de regressão, utilizando ajuste por mínimos quadrados, sendo os coeficientes do modelo  $(y = X\beta + \varepsilon)$  calculados conforme a equação (4).

Após a definição dos coeficientes, foi possível calcular a resposta prevista para cada concentração, bem como o erro, ou resíduo, resultado da diferença entre a resposta experimental e a resposta prevista. A esses erros, foram executados os testes subsequentes.

Inicialmente, foi avaliada a presença de valores anômalos, sendo utilizadas duas técnicas: visual com intervalos de confiança e através do teste de Jackknife. Naquele, os erros provenientes da curva analítica são plotados em função de suas concentrações, e os limites superiores calculados através da equação 7:

$$\pm \sqrt{\frac{\sum(Y - \hat{Y})^2}{n - 2}} \cdot t(95\%, n - 2) \quad (7)$$



Onde  $Y$  é a matriz das respostas analíticas e  $\hat{Y}$  é a matriz das respostas previstas pelo modelo.

As equações envolvidas no teste residual de Jackknife se encontram a seguir:

$$h_i = \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{S_{xx}} \quad (8)$$

$$S_{\varepsilon_i} = s_{res} \sqrt{1 - h_i} \quad (9)$$

$$r_i = \frac{e_i}{S_{\varepsilon_i}} \quad (10)$$

$$J_{e_i} = r_i \sqrt{\frac{n - p - 1}{n - p - r_i^2}} \quad (11)$$

Onde  $r_i$  é o resíduo normalizado,  $S_{\varepsilon_i}$  o erro do resíduo normalizado,  $h_i$  a leverage e  $p$  o número de parâmetros do modelo.

Nessa técnica, é usada uma estimativa do desvio padrão para cada ponto, tendo esses valores ( $J_{e_i}$ ) uma distribuição t com  $n-p-1$  graus de liberdade, portanto, para valores de  $J_{e_i}$  maior que o valor t crítico para aquele grau de liberdade, o ponto é considerado anômalo.

Quando algum ponto foi apontado como anômalo (estando fora dos limites no gráfico ou por Jackknife), o mesmo foi retirado, e nova regressão linear realizada. No entanto, o número máximo de pontos retirados não pode ser de mais de dois nove avos de experimentações, pois o grupo de dados ficaria prejudicado frente ao modelo como um todo (HORWITZ, 1995).

Após a retirada dos pontos anômalos (quando ocorriam), foi testada a normalidade dos resíduos. Esses foram ordenados e plotados com o quantil da distribuição normal inversa (Teste de Ryan-Joiner). À esses valores (gráfico Q-Q), foi feita a regressão linear (mínimos quadrados) e o coeficiente de determinação desse ajuste confrontado com o R crítico, sendo que a distribuição normal dos resíduos é aceita quando o coeficiente experimental é maior que o calculado. As equações utilizadas no teste de Ryan-Joiner foram:

$$c_i = \Phi^{-1} \left\{ \frac{(i - 3/8)}{(n + 1/4)} \right\}, i = 1, \dots, n \quad (12)$$

$$R_{crit}(n) \approx 0,9963 - \frac{0,0211}{\sqrt{n}} - \frac{1,4106}{n} + \frac{3,1791}{n^2}$$

$$\alpha = 0,01 \quad (13)$$

Onde  $c_i$  é o ponto percentual da distribuição normal,  $\phi^{-1}$  é o inverso da distribuição normal e  $R_{crit}$  é o coeficiente crítico de determinação.

Quando os erros não apresentaram normalidade, houve a necessidade de transformação da matriz resposta por raiz quadrática, logarítmica ou inversa.

A distribuição dos resíduos foi testada para garantir que as variâncias das matrizes Y e X fossem iguais (homocedasticidade). Para tal, foi utilizado o teste de Brown-Forsythe, o qual divide os erros em dois grupos e posteriormente, testados para a estatística proposta por Levene ( $t_L$ ). Quando o valor encontrado (através da equação ( 14 )) é confrontado com o t tabelado, há a confirmação da homocedasticidade quando aquele é menor que esse. No caso de heterocedasticidade, a matriz Y é transformada e novamente testada.

$$t_L = \frac{\bar{d}_1 - \bar{d}_2}{\sqrt{(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2})s_p^2}} \quad (14)$$

Onde  $t_L$  é o t de Levene,  $d_j$  é a média da diferença entre o resíduo e a mediana dos resíduos do grupo e  $s_p^2$  é a variância combinada dos grupos.

O último dos testes aplicado à regressão foi o de Durbin-Watson, o qual analisa se existe uma correlação seriada dos resíduos, ou seja, autocorrelação. Quando essa autocorrelação é confirmada, o modelo deve ser revisto para que a hipótese de independência seja assegurada. Uma das formas de fazer isso, é a utilização da regressão linear por quadrados mínimos generalizados (GLSM), onde a matriz Y é equacionada pela matriz X, e a matriz inversa  $X^{-1}$  utilizada ao invés da matriz X para a modelagem. Os cálculos envolvidos nesse teste estão apresentados a seguir:

$$d = \frac{\sum_{i=1}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2} \quad (15)$$

$$d_L \approx 1,9845 - \frac{3,6875}{\sqrt{n}} - \frac{2,6136}{n} + \frac{20,6393}{n^2}$$

$$\alpha = 0,025 \quad (16)$$

$$d_U \approx 1,9480 - \frac{3,1647}{\sqrt{n}} - \frac{0,6472}{n} + \frac{31,5772}{n^2} \quad (17)$$

$$\alpha = 0,025$$

Onde  $d$  é o valor  $d$  para a estatística Durbin-Watson,  $d_L$  é o valor crítico inferior e  $d_U$  o valor crítico superior.

Depois da proposição do modelo (linear e quadrático), foram realizadas as análises de variância (ANOVA). Os resultados obtidos nessa análise passaram por um teste F correlacionando a média quadrática de regressão pela média quadrática dos resíduos e correlacionando a média quadrática da falta de ajuste pela média quadrática do erro puro. Confrontando esses coeficientes, foi tomada a decisão de qual modelo melhor se ajustava aos dados experimentais.

Para fins de quantificação foi utilizada a equação com os coeficientes com significado estatístico, ou seja, quando o erro associado ao coeficiente não o tornasse nulo. A cada amostragem realizada, as curvas na matriz extraídas foram todas refeitas seguindo o procedimento apresentado na Figura 17. Todos cálculos foram realizados através dos softwares Microsoft Excel 2013 quando as operações envolveram vetores e Octave-2.1.72 quando as operações envolveram matrizes.

### 3.9. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção é definido como a concentração mínima de uma substância que pode ser medida e informada com 95% de confiança (RIBEIRO et al., 2008). Nesse trabalho foram calculados os limites de detecção instrumental e do método. Ambos foram determinados a partir de parâmetros da curva analítica.

No caso do limite de detecção do equipamento, foi utilizada a curva preparada no solvente. Por outro lado, limite de detecção do método, foram utilizados os parâmetros provenientes da curva analítica na matriz extraída. A equação para determinação do limite de detecção, bem como do  $y$  crítico (intercepto do limite superior do intervalo de confiança) estão nas equações a seguir (Ribeiro et al. 2008):

$$y_c = a_0 + S_y \cdot t \sqrt{\left(\frac{1}{n}\right) + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (18)$$

$$LD = 2 \cdot \frac{S_y \cdot t}{a_1} \sqrt{\left(\frac{1}{n}\right) + 1 + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{a_1^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (19)$$

Onde  $S_y$  é o desvio padrão calculado para o modelo.

O cálculo do limite de quantificação (LQ), definido como a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável (95%) de exatidão e precisão, também foi calculado utilizando o intervalo de confiança da curva analítica, no caso, a curva na matriz extraída. O LQ foi calculado através de:

$$y_h = a_0 + 2 \cdot S_y \cdot t \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(x_c - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (20)$$

$$x_c = \left(\frac{S_y \cdot t}{a_1}\right) \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (21)$$

$$LQ = \left(\frac{y_h - a_0}{a_1}\right) + \left(\frac{S_y \cdot t}{a_1}\right) \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(y_h - \bar{y})^2}{a_1^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (22)$$

Onde  $S_y$  é o desvio padrão calculado para o modelo e  $y_h$  é o valor de  $y$  para a projeção de  $x_c$  no limite de controle superior.

Foram calculados os limites de detecção do método e de quantificação para cada analito, e à cada amostragem distinta. Quando houve utilização do modelo quadrático para a quantificação do analito, a determinação dos limites foi realizada com base no modelo análogo linear. No caso onde o valor mais baixo de concentração da curva analítica foi menor que o limite de quantificação do método, tal ponto foi excluído e novos limites foram calculados.

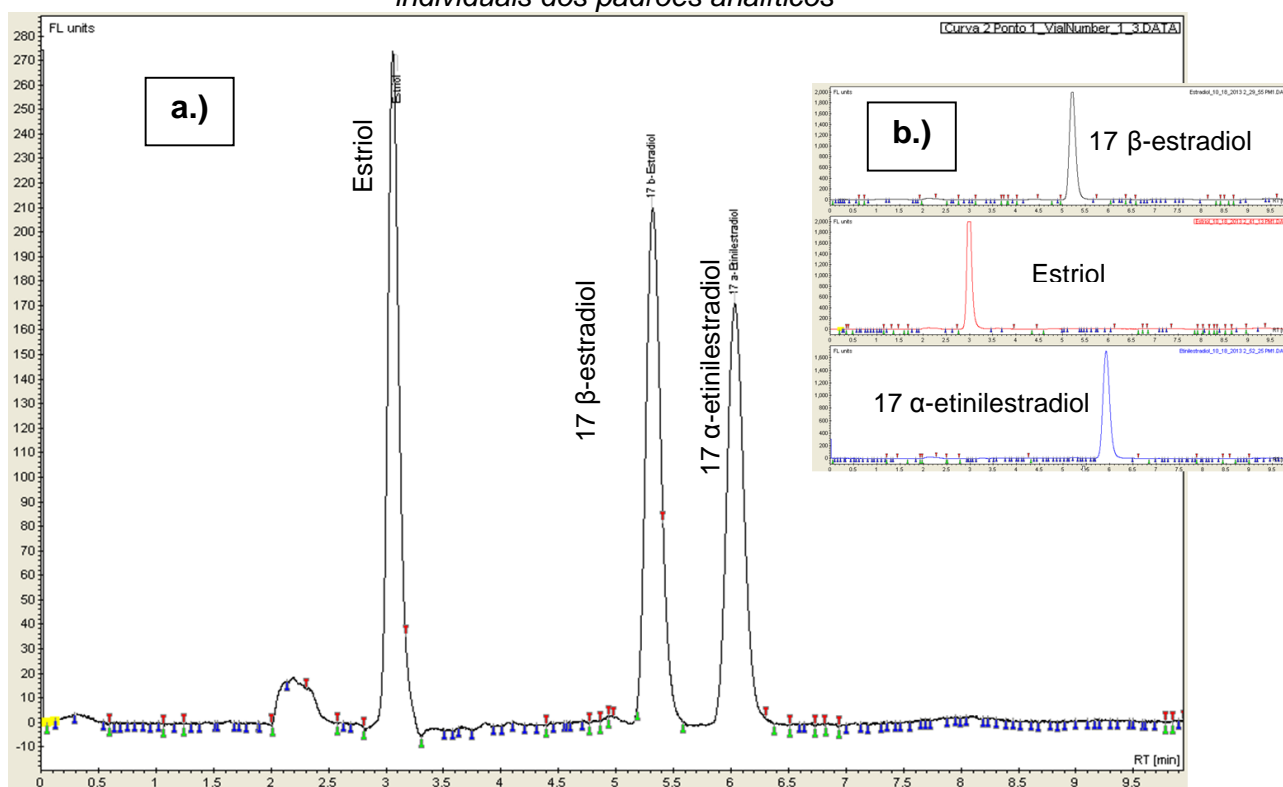
## 4 Resultados e discussão

Os resultados do estudo analítico bem como do estudo ambiental, são apresentados a seguir.

### 4.1. Análise cromatográfica

Um cromatograma da mistura dos padrões dos três estrógenos em acetonitrila pode ser visto na Figura 18, sendo que a confirmação de cada um foi feita com base em seus tempos de retenção. As condições utilizadas estão apresentadas na Tabela 6.

Figura 18. Cromatograma obtido nas condições da Tabela 6. a) Estriol,  $17\beta$ -estradiol e  $17\alpha$ -etinilestradiol na concentração de  $100\text{ ng mL}^{-1}$ , em acetonitrila b.) Cromatogramas individuais dos padrões analíticos



Fonte: Elaborado pelo autor.

Devido à boa resolução obtida ( $R_s=1,52$  entre o  $17\beta$ -estradiol e o  $17\alpha$ -etinilestradiol), à boa eficiência ( $N\approx 3000$ ), e boa simetria dos picos ( $A_s=1,0$  e  $TF=1,09$  para estriol,  $A_s=1,27$  e  $TF=1,21$  para o  $17\beta$ -estradiol,  $A_s=1,33$   $TF=1,14$  para o  $17\alpha$ -etinilestradiol) o método cromatográfico não foi alterado, sendo utilizados os parâmetros da Tabela 6.

## 4.2. Validação da análise cromatográfica

### 4.2.1. Definição do modelo

O teste de Grubbs, utilizado para detecção de valores anômalos, apresentou valores menores que o Z crítico tabelado para 95% de confiança, portanto não houve valores rejeitados. A principal contribuição para esse efeito é o uso de diluições sucessivas no preparo das soluções diluídas, o qual diminui o erro entre as amostras.

As correlações lineares entre a concentração e a resposta encontrada foram:

$$y = 19,0 \pm 0,9 x - 60 \pm 43 \text{ (estriol)}$$

$$y = 18,6 \pm 0,7 x - 46 \pm 33 \text{ (17}\beta\text{-estradiol)}$$

$$y = 17,0 \pm 0,6 x - 35 \pm 27 \text{ (17}\alpha\text{-etinilestradiol)}$$

A qualidade dos modelos foi avaliada através da análise da variância (ANOVA), os dados obtidos para cada um dos estrógenos encontram-se nas Tabelas 8, 9 e 10.

*Tabela 8. Análise de variância completa para o modelo empírico linear do Estriol.*

Fonte de Variação	Soma Quadrática	No de graus de liberdade	Média Quadrática
Regressão	12683420	1	12683420
Resíduos	186517,4	28	6661,336
Falta de Ajuste	180091,9	8	22511,48
Erro Puro	6425,54	20	321,277
Total	12869937	29	
% de variação explicada, R <sup>2</sup>		0,985508	
% máxima de variação explicada		0,999501	

*Tabela 9. Análise de variância completa para o modelo empírico linear do 17β-estradiol.*

Fonte de Variação	Soma Quadrática	No de graus de liberdade	Média Quadrática
Regressão	12187374	1	12187374
Resíduos	106951,4	28	3819,693
Falta de Ajuste	100700,4	8	12587,55
Erro Puro	6251,02	20	312,551
Total	12294325	29	
% de variação explicada, R <sup>2</sup>		0,991301	
% máxima de variação explicada		0,999492	

*Tabela 10. Análise de variância completa para o modelo empírico linear do 17α-etinilestradiol.*

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Nº de graus de liberdade	Média Quadrática
Regressão	10250595	1	10250595
Resíduos	73457,95	28	2623,498
Falta de Ajuste	65040,34	8	8130,043
Erro Puro	8417,607	20	420,8803
Total	10324053	29	
% de variação explicada, R <sup>2</sup>		0,992885	
% máxima de variação explicada		0,999185	

Apesar dos valores satisfatórios dos coeficientes de determinação, os modelos lineares apresentaram altos valores nas médias quadráticas de falta de ajuste e nas somas quadráticas dos resíduos. Como forma de otimizar o modelo proposto, o ajuste foi feito com correlação quadrática, obtendo então as seguintes equações:

$$y = 12,0 \pm 1,6x + 0,08 \pm 0,02x^2 \text{ (estriol)}$$

$$y = 13,3 \pm 1,4x + 0,06 \pm 0,02x^2 \text{ (17}\beta\text{-estradiol)}$$

$$y = 13,3 \pm 1,5x + 0,04 \pm 0,02x^2 \text{ (17}\alpha\text{-etinilestradiol)}$$

Nota-se que o coeficientes linear ( $\beta_0$ ) não são mostrados nas equações supracitadas, pois os seus erros ( $s \times t_{\text{tab}(1, n-2)}$ ) tornam esses coeficientes desprezíveis.

A ANOVA do estriol,  $17\beta$ -estradiol e  $17\alpha$ -etinilestradiol estão apresentadas respectivamente nas Tabelas 11, 12 e 13.

*Tabela 11. Análise de variância completa para o modelo empírico quadrático do Estriol.*

Fonte de Variação	Soma Quadrática	No de graus de liberdade	Média Quadrática
Regressão	12829765	2	6414883
Resíduos	40559,48	27	1502,203
Falta de Ajuste	34133,94	7	4876,277
Erro Puro	6425,54	20	321,277
Total	12870325	29	
% de variação explicada, $R^2$			0,996849
% máxima de variação explicada			0,999501

*Tabela 12. Análise de variância completa para o modelo empírico quadrático do  $17\beta$ -estradiol.*

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Nº de graus de liberdade	Média Quadrática
Regressão	12261135	2	6130568
Resíduos	32655,28	27	1209,455
Falta de Ajuste	26404,26	7	3772,037
Erro Puro	6251,02	20	312,551
Total	12293790	29	
% de variação explicada, $R^2$			0,997344
% máxima de variação explicada			0,999492



*Tabela 13. Análise de variância completa para o modelo empírico quadrático do 17 $\alpha$ -etinilestradiol.*

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Nº de graus de liberdade	Média Quadrática
Regressão	10287917	2	5143958
Resíduos	36322,81	27	1345,289
Falta de Ajuste	27905,2	7	3986,458
Erro Puro	8417,607	20	420,8803
Total	10324239	29	
% de variação explicada, R <sup>2</sup>		0,996482	
% máxima de variação explicada		0,999185	

A análise de variância do modelo quadrático apresenta vários fatores que sugerem um aumento da qualidade do modelo. Nota-se uma grande diminuição na média quadrática da falta de ajuste, bem como da soma quadrática dos resíduos, além do aumento da porcentagem de variação explicada para os três modelos propostos.

A Tabela 14, referente à comparação entre o F calculado dos resíduos e o F tabelado para os modelos linear e quadrático, evidencia claramente que o modelo quadrático apresenta melhor ajuste, devido ao aumento dessa razão. Efeito também comprovado quando analisada a razão entre o F do ajuste e o F tabelado, onde ocorreu um decréscimo desse valor (melhor ajuste).

No entanto, no caso do 17 $\alpha$ -etinilestradiol, essa primeira razão teve uma ligeira queda, porém, quando observamos a razão entre a dupla falta de ajuste e erro puro por F tabelado, tem-se uma diminuição elevada, mostrando uma melhora no ajuste do modelo. Essa razão também diminuiu para os outros analitos, bem como houve a melhora do coeficiente de determinação em todos os casos.

Tabela 14. Valores de F calculado (MQR/MQr e MQfaj/MQep), F tabelado e coeficientes de determinação para as modelagens utilizando regressão linear e quadrática para o Estriol, 17 $\beta$ -estradiol e 17 $\alpha$ -etinilestradiol.

	Estriol		17 $\beta$ -estradiol		17 $\beta$ -estradiol	
	Linear	Quadrático	Linear	Quadrático	Linear	Quadrático
MQR/MQr	1904,035	4270,317	3190,669	5068,869	3907,224	3823,68198
F <sub>tab</sub>	4,195972	4,210008	4,195972	4,210008	4,195972	4,21000847
Razão	453,777	1014,325	760,4123	1204,004	931,1845	908,236172
MQfaj/MQep	70,06877	15,1778	40,27358	12,06855	19,31676	9,471713
F <sub>tab</sub>	2,447064	2,514011	2,447064	2,514011	2,447064	2,514011
Razão	28,63381	6,037283	16,45792	4,800516	7,893851	3,76757
Coeficientes de determinação (R <sup>2</sup> )	0,985508	0,996849	0,991301	0,997344	0,992885	0,996482

MQR = Média Quadrática da Regressão  
 MQr = Média Quadrática dos Resíduos  
 MQfaj = Média Quadrática da Falta de Ajuste  
 MQep = Média Quadrática do Erro Puro

Tendo esses fatores em vista, a modelagem quadrática foi tida como a mais adequada para esses casos, pois ocorreu uma diminuição relevante dos dados não explicados pela regressão. O modelo final e os pontos experimentais estão ilustrados nas Figura 19 a 21.

Figura 19. Modelo empírico construído a partir da análise de regressão das áreas resultantes de diferentes concentrações do padrão de estriol, injetadas em triplicata. No detalhe, e equação de correlação.

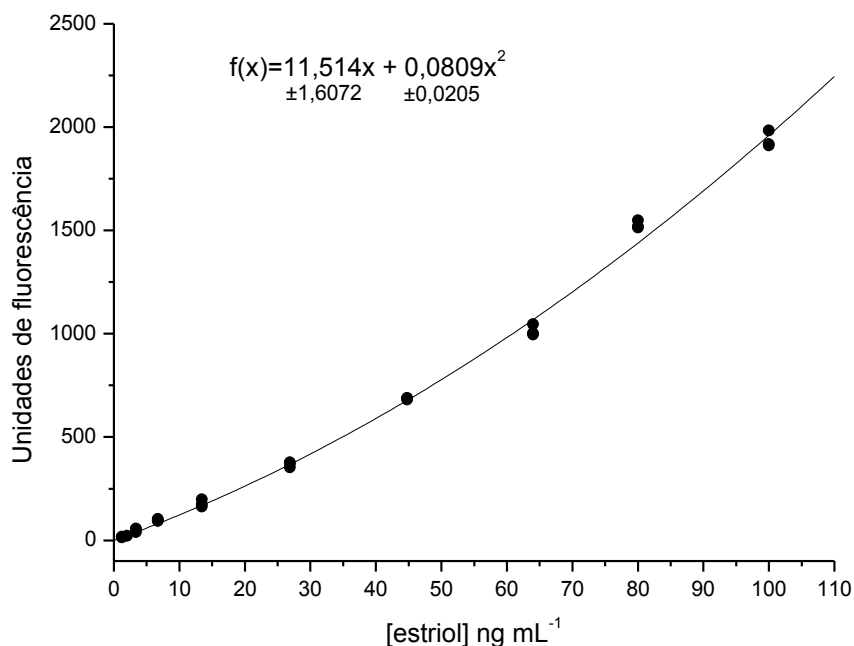


Figura 20. Modelo empírico construído a partir da análise de regressão das áreas resultantes de diferentes concentrações do padrão de 17 $\beta$ -estradiol, injetadas em triplicata. No detalhe, e equação de correlação.

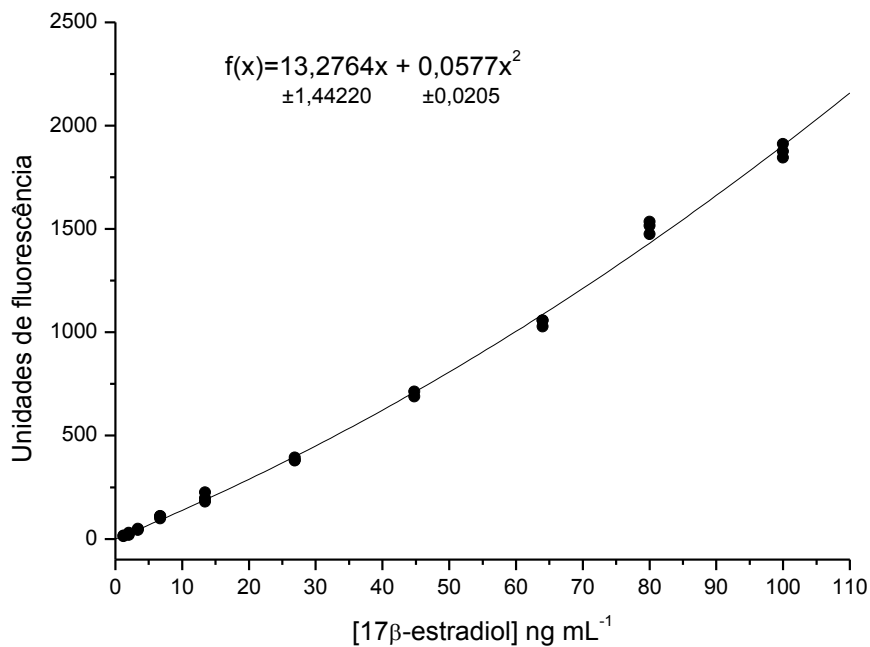
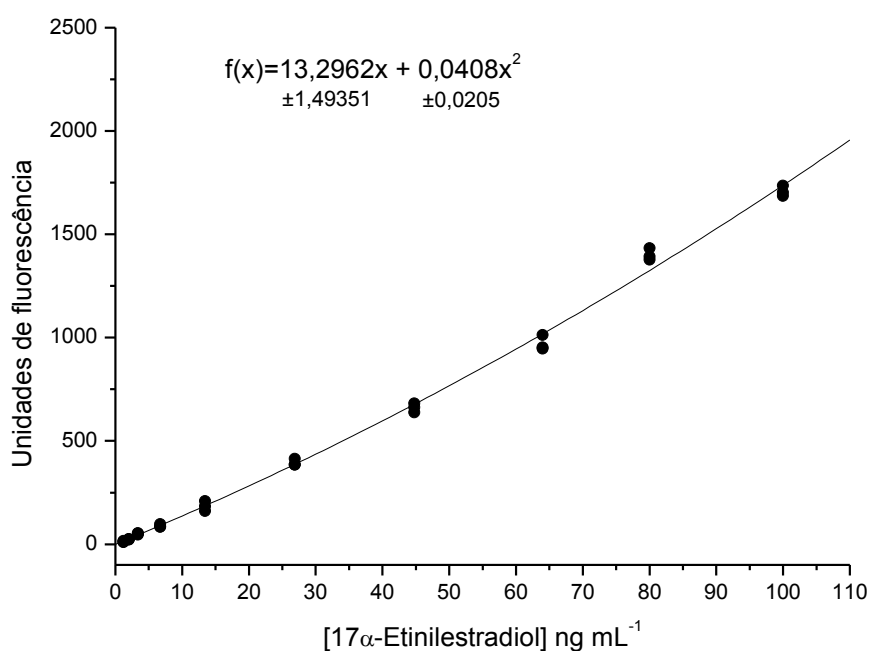


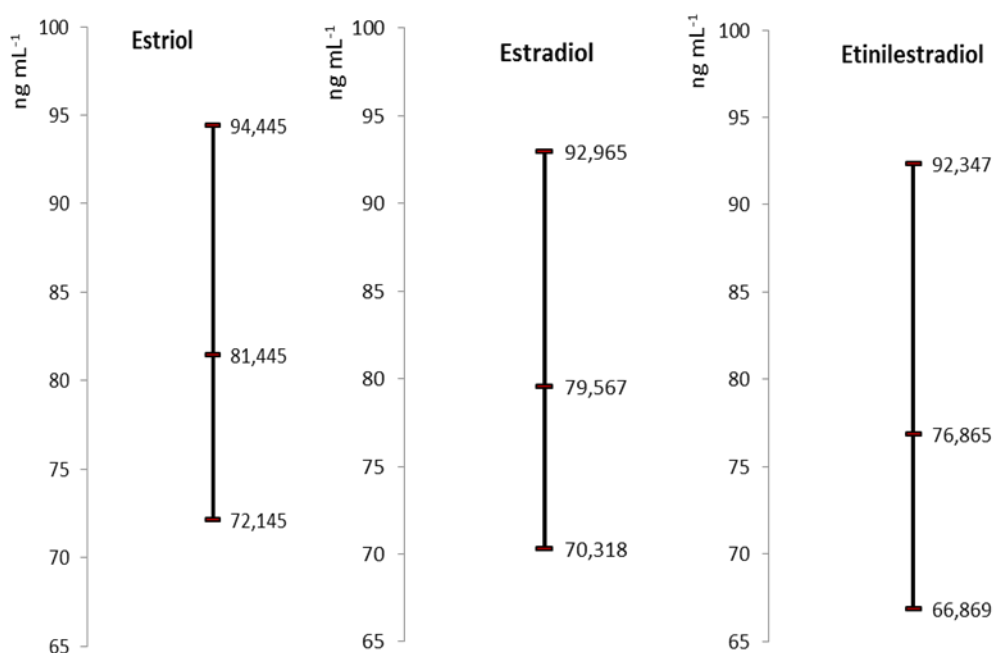
Figura 21. Modelo empírico construído a partir da análise de regressão das áreas resultantes de diferentes concentrações do padrão de 17 $\alpha$ -etinilestradiol, injetadas em triplicata. No detalhe, e equação de correlação.



#### 4.2.2. Validação do modelo empírico

Os resultados das injeções dos padrões na concentração de  $80 \text{ ng mL}^{-1}$ , bem como os limites inferiores e superiores (referentes aos erros dos coeficientes b dos modelos supracitados) podem ser vistos na Figura 22.

Figura 22. Concentrações encontradas, juntamente com o erro da falta de ajuste, utilizando o modelo empírico quadrático para o Estriol,  $17\beta$ -estradiol e  $17\alpha$ -etinilestradiol.



De acordo com a Figura 22, as concentrações médias (para a triplicata) foram de:  $81,4 \text{ ng mL}^{-1}$  para o estriol,  $79,5 \text{ ng mL}^{-1}$  para o  $17\beta$ -estradiol e  $76,9 \text{ ng mL}^{-1}$  para o  $17\alpha$ -etinilestradiol. Tais valores mostram a exatidão e precisão da análise cromatográfica.

#### 4.3. Extração em cartuchos de fase sólida

As recuperações obtidas ao utilizar o método de extração proposto estão apresentadas na Tabela 15, sendo que foram considerados para o cálculo a amostra "ponto matriz" como 100% e a amostra "fortificada" como o valor apresentado na tabela. Esses valores estão inseridos no limite aceitável para métodos de extração em matrizes complexas (50 – 120%) estabelecido pelo INSTITUTO... (2010) indicando

que o método utilizado neste estudo apresenta exatidão (avaliada pela recuperação) e precisão (avaliada pelo CV) compatíveis com a aplicação ambiental pretendida.

Tabela 15. Valores de recuperação média (n=9) obtidos do método de extração em fase sólida dos estrógenos em água do mar artificial

			Estriol	17 $\beta$ -estradiol	17 $\alpha$ -etinilestradiol	
Fortificação (ng mL <sup>-1</sup> )	27	Recuperação	Média (%)	76	88	94
		CV (%)	8,2	1,1	2,5	
	80	Recuperação	Média (%)	77	87	92
		CV (%)	2	0	1,7	

#### 4.4. Conservação dos analitos nos cartuchos SPE

Os fatores de extração (FExt) são vistos no gráfico da Figura 23, sendo que o mesmo evidencia visualmente que as variações de concentrações do analito não foram altas. A Tabela 16 corrobora a hipótese de que os analitos não sofreram degradação ou mesmo forte adsorção na fase estacionária durante a estocagem, já que o coeficiente de variação de Pearson apresentado foi baixo (<5%).

Figura 23. Comportamento dos analitos no teste de conservação. Amostra de água do mar sintética fortificadas com 0,2 ng mL<sup>-1</sup> de cada analito. Extração efetuada de acordo com o explicitado na Figura 12.

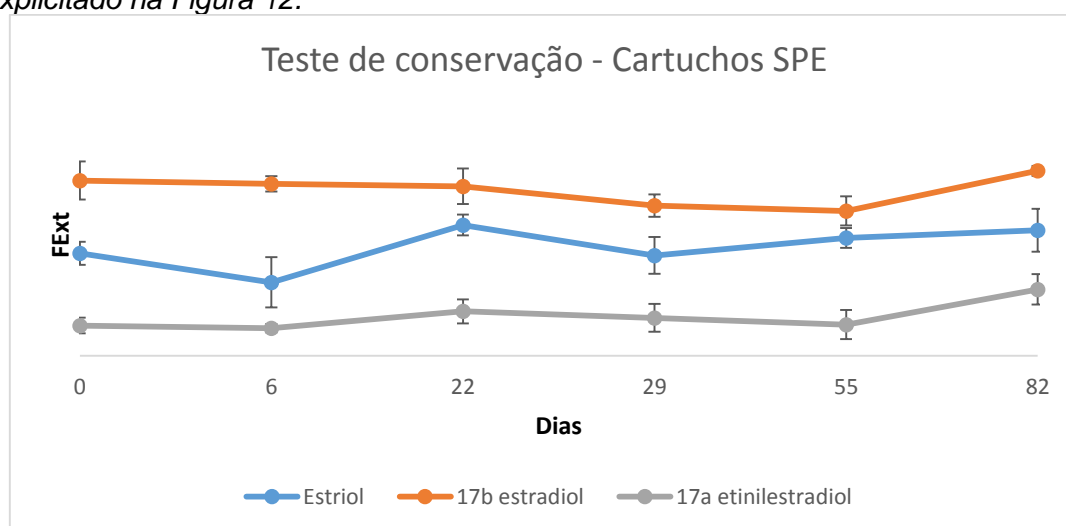


Tabela 16. Resultados obtidos no teste de conservação das amostras (n=18)

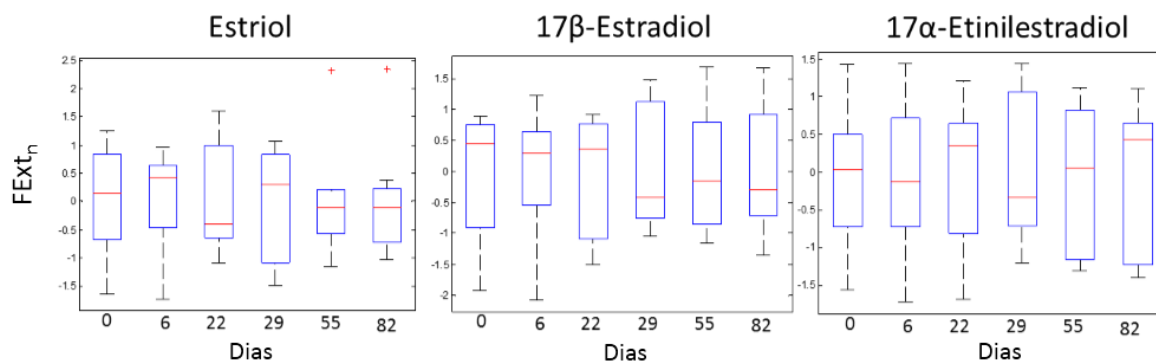
	Estriol	17 $\beta$ -Estradiol	17 $\alpha$ -Etinilestradiol
Média das áreas	1948	1988	1664
Desvio padrão (SD)	87	58	60
Coeficiente de variação (CV %)	4	3	4

Outro modo de analisar o comportamento dos diversos grupos (tempos diferentes) é através da análise de variância de um fator, a qual mostra se existe diferença significativa entre as médias desses grupos. No entanto, para utilização dessa ferramenta é necessário que os dados apresentem distribuição normal.

A normalidade dos dados foi descartada através dos testes de Anderson-Darling e Shapiro-Wilk. Houve portanto a necessidade de normalizar os dados, sendo essa transformação feita por autoescalamento, onde cada valor do grupo é subtraído pela média daquele grupo, e posteriormente esses valores obtidos são divididos pelo desvio padrão desse conjunto de dados.

Após o autoescalamento, foi feito o teste de normalidade dos grupos, e todos seguiram a distribuição normal. A Figura 24 apresenta os novos valores obtidos através do escalonamento e mostra claramente a tendência de que os estrógenos estudados não sofrem mudanças nas suas concentrações.

Figura 24. Diagrama de caixas da distribuição dos fatores de conservação normalizados (FExt<sub>n</sub>)



Como os novos grupos apresentaram distribuição normal, foi então aplicado a ANOVA de um fator, e os resultados mostraram que os mesmos apresentam semelhança no comportamento, com intervalo de confiança igual a 95%.

Frente aos resultados obtidos, a hipótese de conservação do analito no cartucho de extração foi confirmada para o intervalo de 82 dias (tempo total do estudo).

#### 4.5. Curvas analíticas e efeito matriz

Os resultados apresentados a seguir referem-se às curvas analíticas que foram utilizadas na primeira amostragem, tendo as mesmas sido tratadas (e escolhida linear ou quadrática) de acordo com a Figura 17.

A primeira etapa da construção da curva analítica foi a construção das matrizes X e vetor Y, e após, a obtenção dos coeficientes b. Com esses coeficientes, foram então calculados os resíduos e os limites superior e inferior para os mesmos, estão eles apresentados nas Figuras 25-27.

Figura 25. Resíduos e intervalos de confiança (limites superior e inferior) da curva extraída na matriz do Estriol.

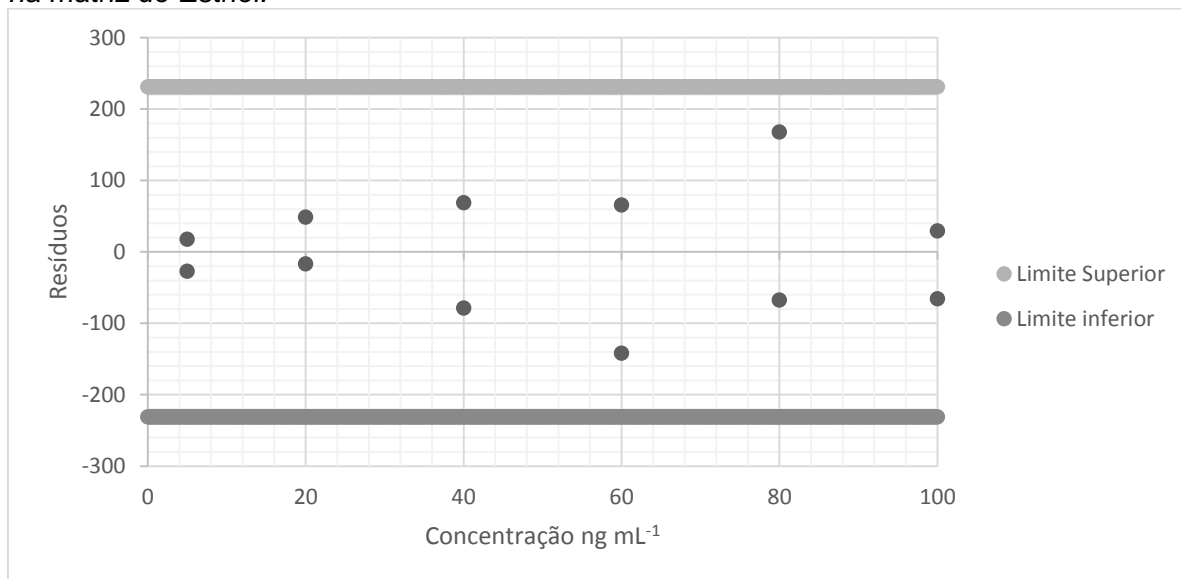


Figura 26. Resíduos e intervalos de confiança (limites superior e inferior) da curva extraída na matriz do  $17\beta$ -estradiol.

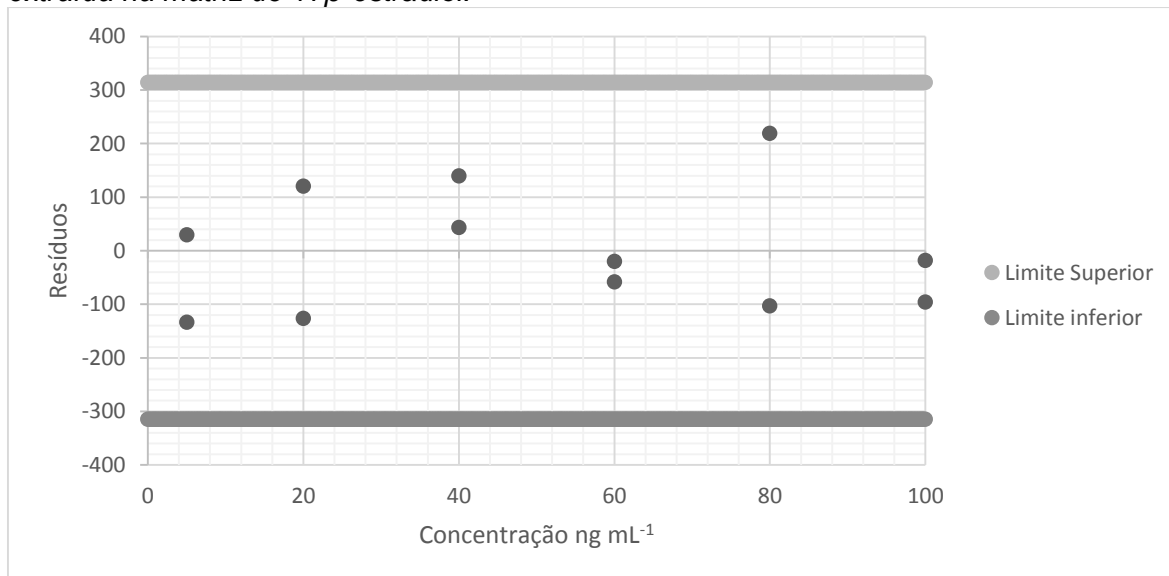
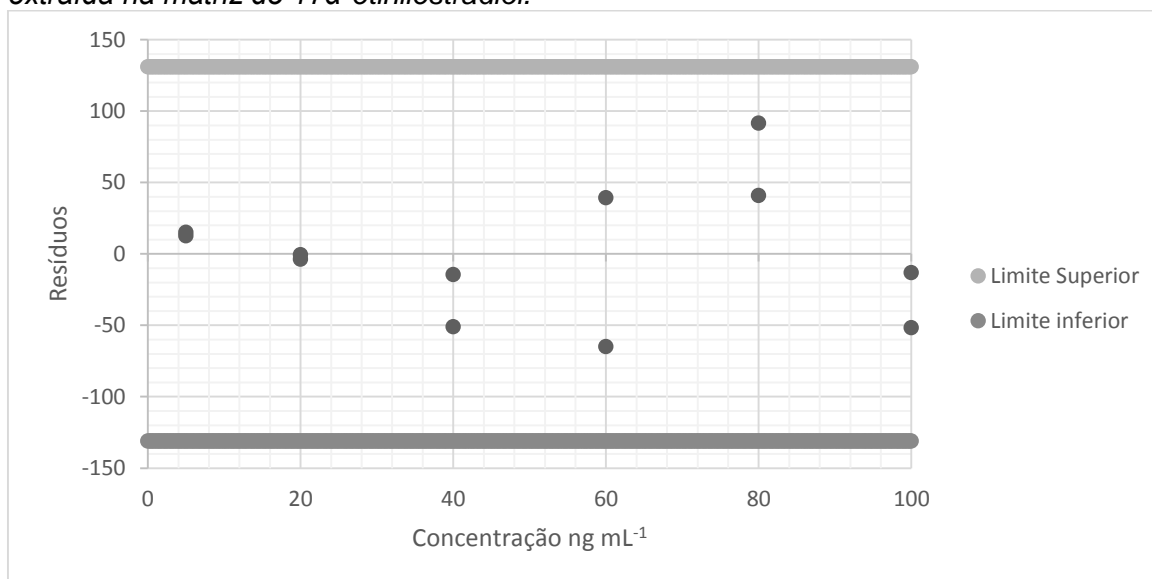




Figura 27. Resíduos e intervalos de confiança (limites superior e inferior) da curva extraída na matriz do 17 $\alpha$ -etinilestradiol.



A distribuição dos resíduos, bem como a visualização dos limites superior e inferior, atesta a ausência de pontos anômalos nos modelos de regressão. Além dessa forma visual, onde é utilizado um intervalo de confiança único para todos os pontos, proveniente do desvio global dos resíduos, também foi aplicado o teste residual de Jackknife, onde são utilizados valores do desvio de cada ponto. As estimativas  $Je_i$  para cada ponto, e o valor  $t$  tabelado para cada distribuição, estão apresentados na Tabela 17.

Todos valores de  $Je_i$  foram menores que os valores de  $t$  calculado, confirmando portanto a não existência de pontos anômalos. Após a aceitação dos pontos, os resíduos dos mesmos foram testados através do procedimento Ryan-Joiner com o intuito de garantir a normalidade da distribuição. A normalidade foi atestada quando o coeficiente de determinação da distribuição dos erros *versus* a normal inversa foi maior que o coeficiente de determinação crítico, os valores estão apresentados nas Figuras 28 a 30.

Tabela 17. Valores de  $J_{ei}$  calculados para os resíduos da curva extraída na matriz para o estriol,  $17\beta$ -estradiol e  $17\alpha$ -etinilestradiol.

	<b>estriol</b>	<b><math>17\beta</math>-estradiol</b>	<b><math>17\alpha</math>-etinilestradiol</b>
<b>Concentração ng mL<sup>-1</sup></b>	<b><math>J_{ei}</math></b>	<b><math>J_{ei}</math></b>	<b><math>J_{ei}</math></b>
100	0,660	-0,196	-
100	-0,758	-1,09	-1,82
80	2,63	2,60	1,06
80	-0,899	-0,970	2,90
60	-2,14	-0,166	-0,656
60	0,606	-0,490	-0,320
40	-1,09	1,28	-1,09
40	0,657	0,370	0,074
20	0,598	1,172	-0,707
20	-0,215	-1,23	-0,944
5	0,449	0,310	1,29
5	-0,177	-1,55	0,961
$t(\frac{0,05}{2n}; n - p - 2)$	3,81	3,81	3,90

Figura 28. Gráfico de normalidade (normal inversa vs resíduos) para o estriol,  $R_c=0,942$ .

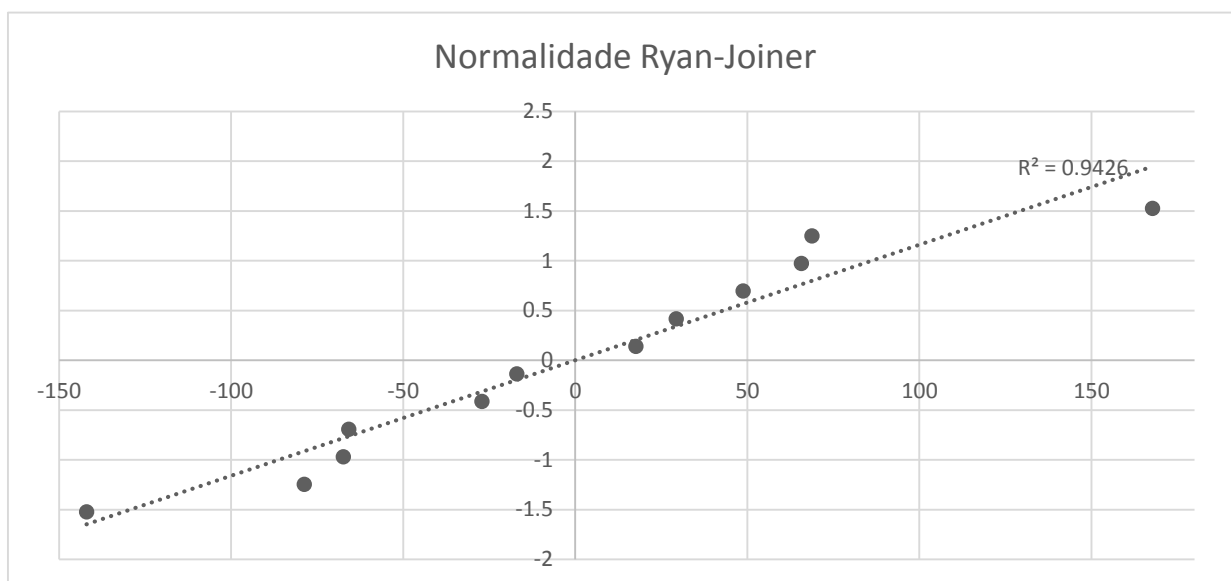


Figura 29. Gráfico de normalidade (normal inversa vs resíduos) para o  $17\beta$ -estradiol,  $R_c = 0,942$ .

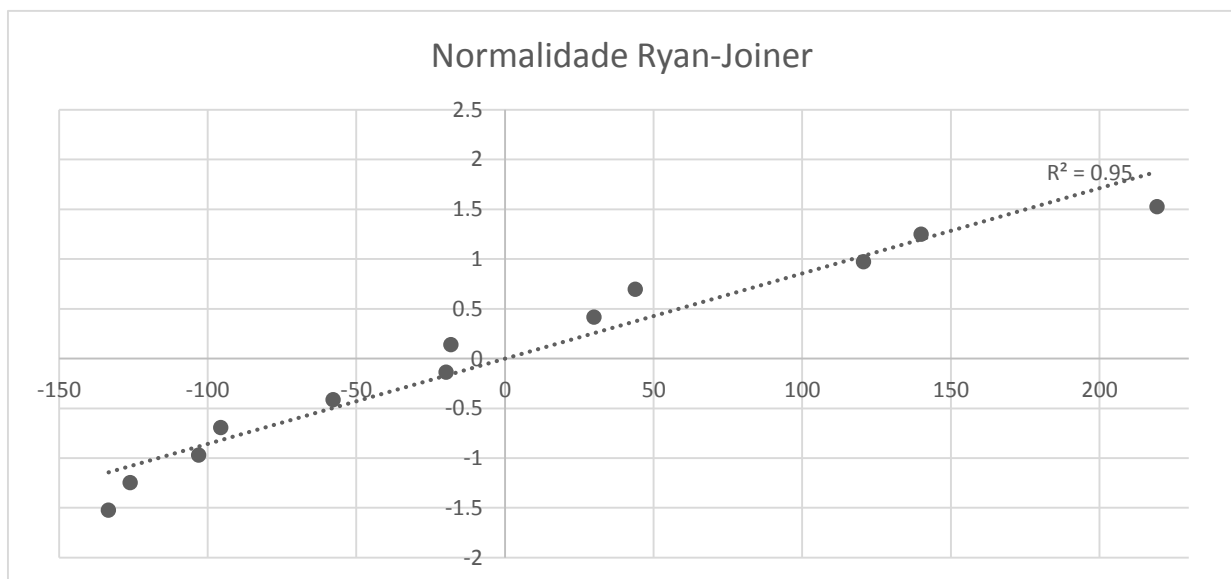
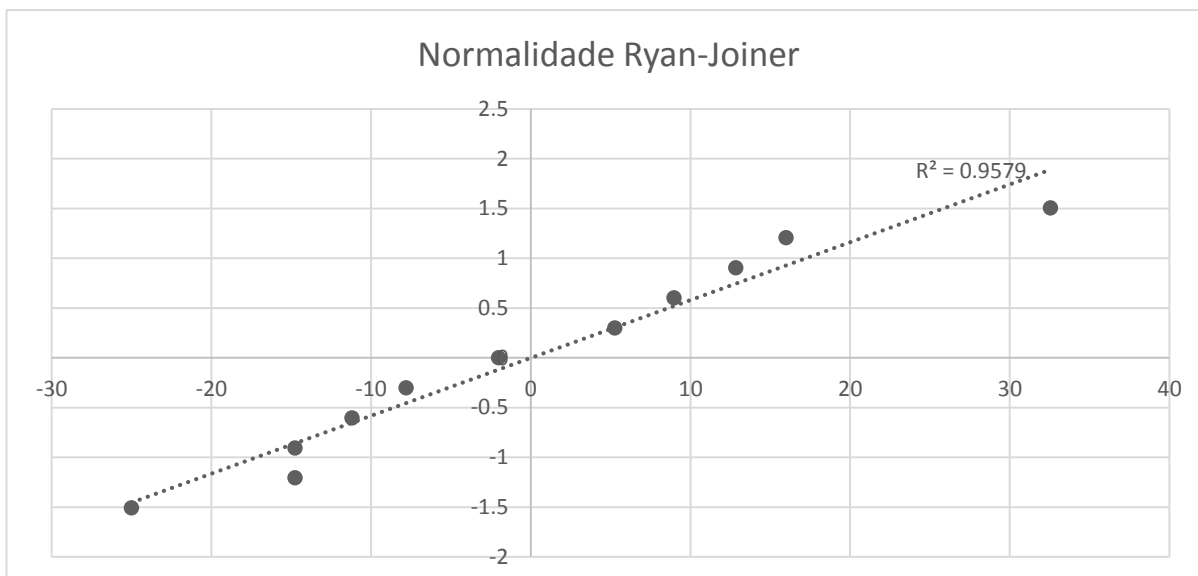


Figura 30. Gráfico de normalidade (normal inversa vs resíduos) para o 17 $\alpha$ -etinilestradiol,  $R_c = 0,939$ .



Confirmada a normalidade das distribuições dos resíduos, foi calculado o  $t$  de Levene ( $t_L$ ) e  $t$  crítico para o teste de Brown-Forsythe, sendo que os valores calculados para o  $t_L$  foram menores que o  $t$  crítico, atestando a homocedasticidade da variância. Por fim, foi comprovada a independência dos resíduos com o teste de Durbin-Watson, sendo  $d_U < d_W < 4 - d_U$  verdadeiro para todos modelos, como está apresentado na Tabela 18.

Tabela 18. Valores de  $t$  de Levene e  $t$  crítico do teste de Brown-Forsythe e valores de  $d_U$ ,  $d_L$  e  $d_W$  do teste de Durbin-Watson para o estriol, 17 $\beta$ -estradiol e 17 $\alpha$ -etinilestradiol.

	Estriol	17 $\beta$ -estradiol	17 $\alpha$ -etinilestradiol
$t_L$	2,15	1,37	0,180
$t_{\text{crítico}}$	2,23	2,29	2,26
$d_W$	2,63	2,69	1,84
$d_U$	0,84	0,84	0,80
$d_L$	1,20	1,20	1,20

Posteriormente à confirmação de ausência de pontos anômalos, a normalidade dos resíduos, a homocedasticidade da variância e descartada a autocorrelação, os modelos tiveram seus ajustes testados via análise de variância para definição do modelo final (linear ou quadrático), o qual foi utilizado na quantificação dos analitos de interesse, estando eles na Tabela 19.

*Tabela 19. Curvas analíticas usadas na quantificação do estriol, 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol, para cada campanha amostral, com destaque para os coeficientes com significado estatístico.*

Estriol	
26/03/2014	$y=101_{(\pm 154)}+13,4x_{(\pm 7,2)}+1,26 \cdot 10^{-2}x^2_{(\pm 0,07)}$
10/02/2015	$y=97,3_{(\pm 16)}+11,5x_{(\pm 0,32)}$
17/06/2015	$y=82,6_{(\pm 28)}+11,2x_{(\pm 1,6)}-2,23 \cdot 10^{-2}x^2_{(\pm 0,02)}$
17β-estradiol	
26/03/2014	$y=214_{(\pm 141)}+16x_{(\pm 2,3)}$
10/02/2015	$y=114_{(\pm 119)}+116x_{(\pm 2,3)}$
17/06/2015	$y=116_{(\pm 145)}+10,6x_{(\pm 8,4)}+0,309x^2_{(\pm 0,08)}$
17α-etinilestradiol	
26/03/2014	$y=-7,38_{(\pm 82)}+12,8x_{(\pm 3,8)}+1,74 \cdot 10^{-2}x^2_{(\pm 0,04)}$
10/02/2015	$y=240_{(\pm 20)}+14,8x_{(\pm 0,4)}$
17/06/2015	$y=-15,3_{(\pm 19)}+8,38x_{(\pm 0,3)}$

Todos modelos apresentados na Tabela 19 referem-se à curva extraída na matriz, já que para todos os analitos houve a presença do efeito matriz, como evidenciado na Figura 31 para o estriol, Figura 32 para o 17β-estradiol e Figura 33 para o 17α-etinilestradiol. Para fins de quantificação, foram utilizados somente os coeficientes com valores maiores que os erros associados à eles, estando os mesmos destacados na Tabela 19.

Figura 31. Curvas analíticas do estriol, resultantes dos procedimentos apresentados na Figura 16 e Figura 17.

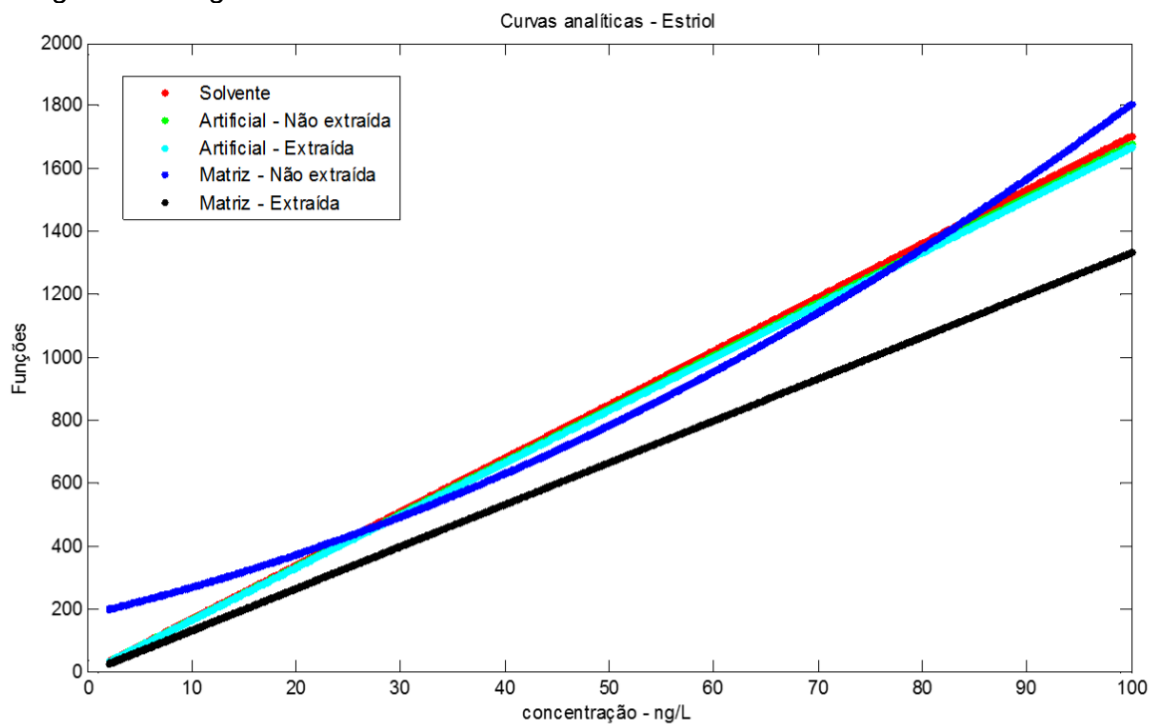


Figura 32. Curvas analíticas do 17 $\beta$ -estradiol, resultantes dos procedimentos apresentados na Figura 16 e Figura 17.

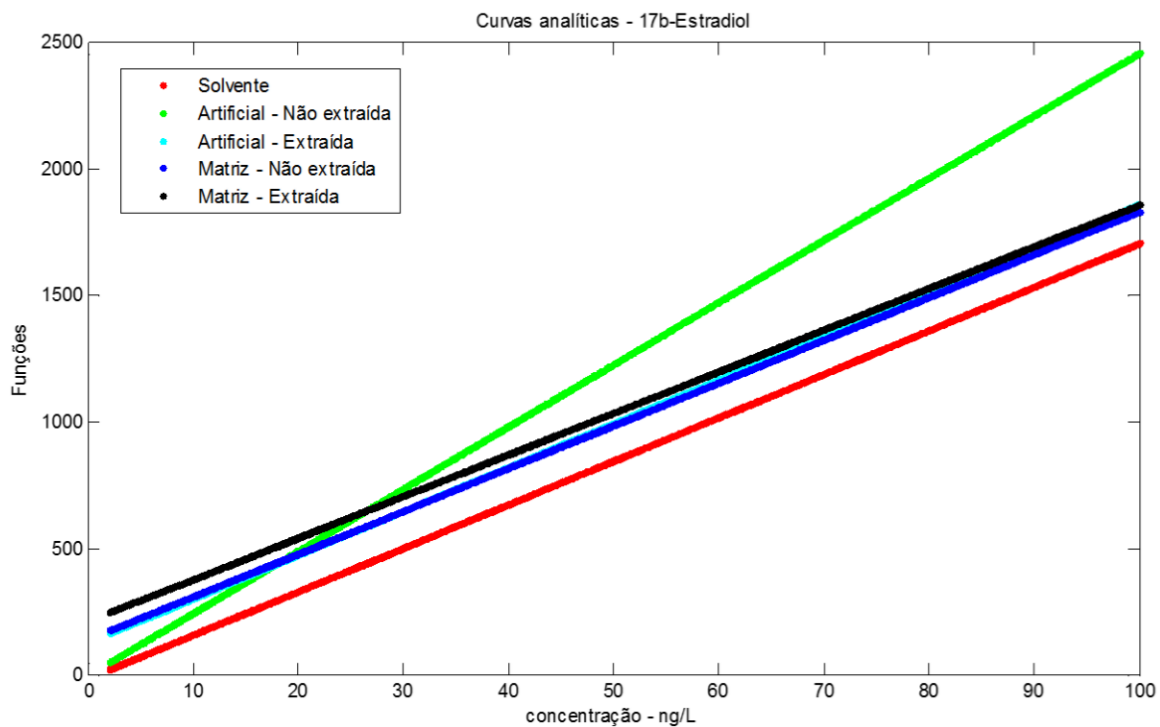
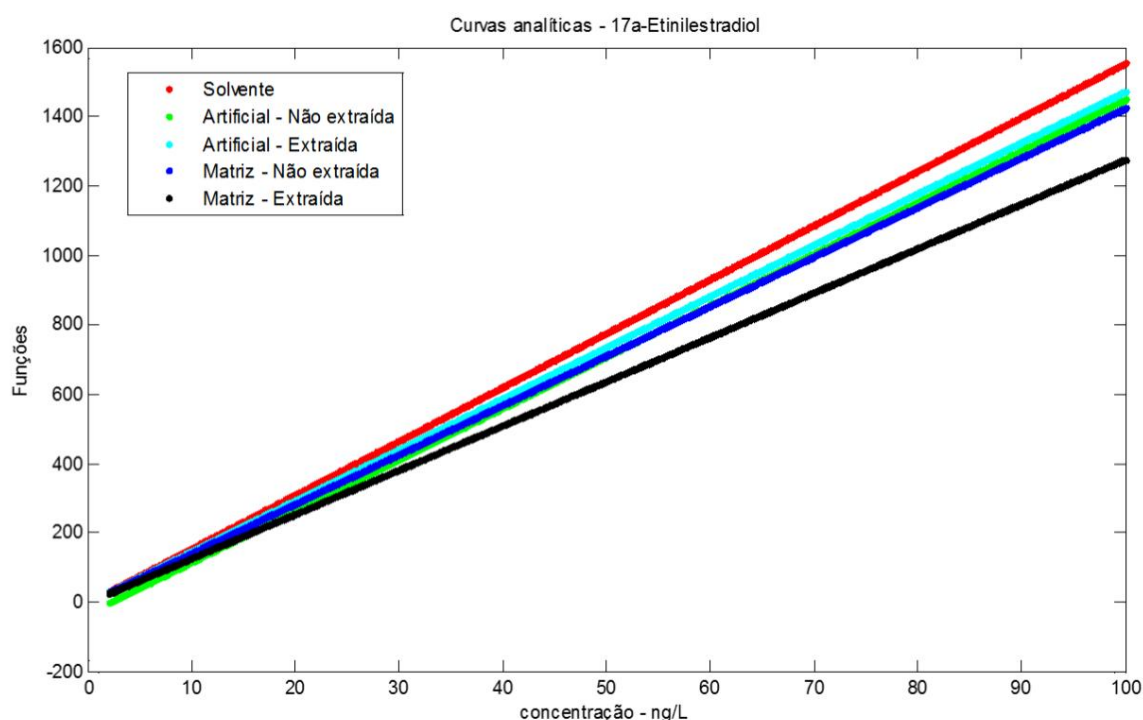


Figura 33. Curvas analíticas do 17 $\alpha$ -etinilestradiol, resultantes dos procedimentos apresentados na Figura 16 e Figura 17.



As curvas analíticas plotadas nos gráficos das Figuras acima estão apresentadas na Tabela 20.

Tabela 20. Curvas analíticas para os analitos estriol, 17 $\beta$ -estradiol e 17 $\alpha$ -etinilestradiol preparadas pelo procedimento apresentado na Figura 16 e Figura 17.

	Estriol	17 $\beta$ -estradiol	17 $\alpha$ -etinilestradiol
Solvente	$y = -2,05 + 17,1x$ $\pm 9,95 \quad \pm 0,16$	$y = -12,7 + 17,2x$ $\pm 6,99 \quad \pm 0,11$	$y = 2,96 + 15,5x$ $\pm 7,51 \quad \pm 0,13$
Água marinha artificial	$y = -7,92 + 16,8x$ $\pm 36,7 \quad \pm 0,63$	$y = 30,7 + 24,6x$ $\pm 458 \quad \pm 7,27$	$y = -31,5 + 14,8x$ $\pm 9,50 \quad \pm 0,17$
Água salobra	$y = (13,62 + 0,29x)^2$ $\pm 1,51 \quad \pm 0,02$	$y = 142 + 16,9x + 1,53 \cdot 10^{-2}x^2$ $\pm 65,1 \quad \pm 3,19 \quad \pm 0,03$	$y = -18,1 + 14,2x + 4,47 \cdot 10^{-3}x^2$ $\pm 32,4 \quad \pm 1,58 \quad \pm 0,02$
Extraída (água marinha artificial)	$y = 30,2 + 16,7x$ $\pm 104 \quad \pm 1,73$	$y = 129 + 17,3x$ $\pm 128 \quad \pm 2,12$	$y = -15,2 + 14,7x$ $\pm 30,7 \quad \pm 0,49$
Extraída (matriz)	$y = 101 + 13,4x + 1,26 \cdot 10^{-2}x^2$ $\pm 154 \quad \pm 7,19 \quad \pm 0,07$	$y = 214 + 16,5x$ $\pm 141 \quad \pm 2,33$	$y = -7,38 + 12,8x + 1,74 \cdot 10^{-2}x^2$ $\pm 82,3 \quad \pm 3,83 \quad \pm 0,04$

No caso do estriol (Figura 31), a sensibilidade analítica envolvida na quantificação (coeficiente angular da reta) é menor do que para as outras curvas, principalmente com relação à curva preparada no solvente, o qual poderia apresentar um erro de mais de 30% na determinação do analito.

Outra característica ubíqua no preparo da curva na matriz é a detectabilidade frente à curva não fortificada. Confrontando as curvas que utilizaram matriz (com fortificação prévia à extração e com fortificação após a extração) pode ser observado claramente que a resposta da curva extraída é menor que a curva fortificada após a extração. A hipótese é que uma parcela do analito proveniente da fortificação fique adsorvida à matéria orgânica presente na matriz e outros componentes da matriz, os quais não são liberados durante a extração, diminuindo assim a resposta da curva extraída.

Esse fator é outra vantagem da curva analítica extraída na matriz, já que, caso a quantificação fosse feita pela curva sem fortificação prévia à extração, essa magnitude de perda de resposta, não seria prevista, resultando assim em um valor abaixo do real.

Para o  $17\beta$ -estradiol, não houve diferenças entre as curvas construídas utilizando matriz e pouca diferença quando construídas no solvente, no entanto, o efeito matriz foi alto quando comparado com a curva ressuspensa em água do mar artificial.

No caso do  $17\alpha$ -etinilestradiol, conforme a diminuição da similaridade entre a matriz utilizada para a construção da curva, maior foi o efeito matriz existente, portanto, houve um alto efeito matriz com relação ao solvente, o qual foi diminuindo ao usar água artificial, água artificial fortificada prévia à extração, e matriz sem a fortificação prévia. Todo esse dinamismo pode ser expresso na forma de coeficientes de variação de Pearson, os quais estão apresentados na Tabela 21, corroborando os fatos supracitados.



Tabela 21. Diferença percentual entre os coeficientes angulares das curvas preparadas com a matriz extraída e as demais.

	<b>Estriol</b>	<b>17<math>\beta</math>-estradiol</b>	<b>17<math>\alpha</math>- Ethinilestradiol</b>
Solvente	-22	-4	-18
Artificial não extraída	-20	-33	-14
Artificial extraída	-20	-5	-13
Matriz não extraída	NC	-3	-10

NC=Não calculado, impossibilidade de cálculo devido ao modelo final.

Por outro lado, nota-se ao analisar a Tabela 20 que os erros associados aos coeficientes aumentam conforme aumenta-se a complexidade da matriz utilizada no preparo da curva analítica.

#### 4.6. Limites de detecção instrumental e do método e limite de quantificação

Os limites de detecção instrumental e do método e o limite de quantificação do método, calculados de acordo com o subitem 3.9, estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22. Limites de detecção instrumental e do método e limite de quantificação do método para os estrógenos de interesse para cada amostragem.

<b>Analito</b>	<b>Amostragem</b>	<b>LDM (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LQM (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LDI (ng L<sup>-1</sup>)</b>
Estriol	26/03/2014	4,14	9,92	2,20
	10/02/2015	4,62	12,8	2,24
	17/06/2015	4,42	13,0	2,24
17 $\beta$ -estradiol	26/03/2014	2,27	9,17	1,67
	10/02/2015	2,26	9,89	1,74
	17/06/2015	2,45	12,7	1,74
17 $\alpha$ - ethinilestradiol	26/03/2014	9,62	11,3	8,09
	10/02/2015	9,86	12,7	8,18
	17/06/2015	9,71	10,5	8,18

LDM=Limite de detecção do método

LQM=Limite de quantificação do método

LDI=Limite de detecção instrumental

Os valores obtidos nesse estudo estão próximos de outros trabalhos: Kumar et al., 2011, utilizando cromatografia líquida de ultra performance acoplado à espectrometria de massas obtiveram o limite de detecção variando entre 0,2 e 0,8 ng L<sup>-1</sup> na determinação de estrógenos em efluentes de estações de tratamento de esgoto sanitário. Miège et al., 2009, obtiveram valores entre 0,4 e 1,2 ng L<sup>-1</sup> para o limite de

detecção em método utilizando espectrometria de massas para análises de matrizes aquosas. Verbinnen et al., 2010, utilizando detector de arranjo de diodos obtiveram o limite de detecção de 6,25 ng L<sup>-1</sup> para o estriol, na análise de água potável.

#### 4.7. Resultados obtidos na primeira amostragem (março/2014)

As concentrações médias encontradas para todos pontos estão apresentadas na Tabela 23 e os pontos amostrais na Figura 34.

*Tabela 23. Concentrações médias dos analitos (n=9) (ng L<sup>-1</sup>) encontradas na primeira campanha de amostragem, realizada no dia 26 de março de 2014.*

	SV1	SV2	SV3	ES1	ES2	ES3	CS1	CS2	CS3	EM1	EM2	EM3
estriol	65	122	237	208	354	232	150	126	155	22	10	15
17β-estradiol	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
17α- etinilestradiol	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD

Codificação das amostras de acordo com a Figura 34

n=9 : 3 amostras por ponto, analisadas em triplicata

LD = limite de detecção

LQ = limite de quantificação

Foi possível a quantificação apenas do estriol, o que ocorreu em todos os pontos inseridos neste estudo. Esses dados podem ser explicados por esse estrógeno natural possuir a maior taxa de excreção diária por humanos que os outros, principalmente em mulheres durante a gravidez (4500-6500 mg dia<sup>-1</sup> indivíduo<sup>-1</sup>, COMBALBERT; HERNANDEZ-RAQUET, 2010). Somando a isso, o estriol é o produto final da degradação do estradiol (HAVLIKOVA et al, 2006; JÜRGENS et al., 1999). Outra propriedade do estriol é sua solubilidade, de 13 mg mL<sup>-1</sup>, sendo essa a maior solubilidade entre os estrógenos estudados (17β-estradiol 12,7 mg mL<sup>-1</sup> e 17α-etinilestradiol 4,8 mg mL<sup>-1</sup>).

As hipóteses para a não detecção do 17β-estradiol são duas: biotransformação e conjugação. O primeiro deles retrata a situação supracitada, onde o mesmo é alterado bioquimicamente para estrona e depois estriol (LAFLEUR et al., 2011), fazendo com que não se encontre em concentrações detectáveis mesmo com a entrada contínua do mesmo no ambiente.

Porém, a entrada desse estrógeno no ambiente não ocorre na forma livre, sendo ela na forma conjugada (não detectada no método analítico utilizado). Somando

a biotransformação e a excreção na forma conjugada (D'ASCENZO et al., 2003), o resultado é a não detecção desse estrógeno, conforme visto na Tabela 23.

A região que apresentou maiores concentrações foi o estuário de Santos (Figura 34), a qual recebe um alto aporte de águas fluviais, provenientes de rios e do canal de Piaçaguera podendo ser essa a fonte dos estrógenos. Um sumário das concentrações do estriol para essa região pode ser visto no diagrama de caixas da Figura 35.

*Figura 34. Concentrações de estriol (em  $\text{ng L}^{-1}$ ) determinadas em água dos pontos amostrais referente a campanha realizada em 26 de março de 2014*

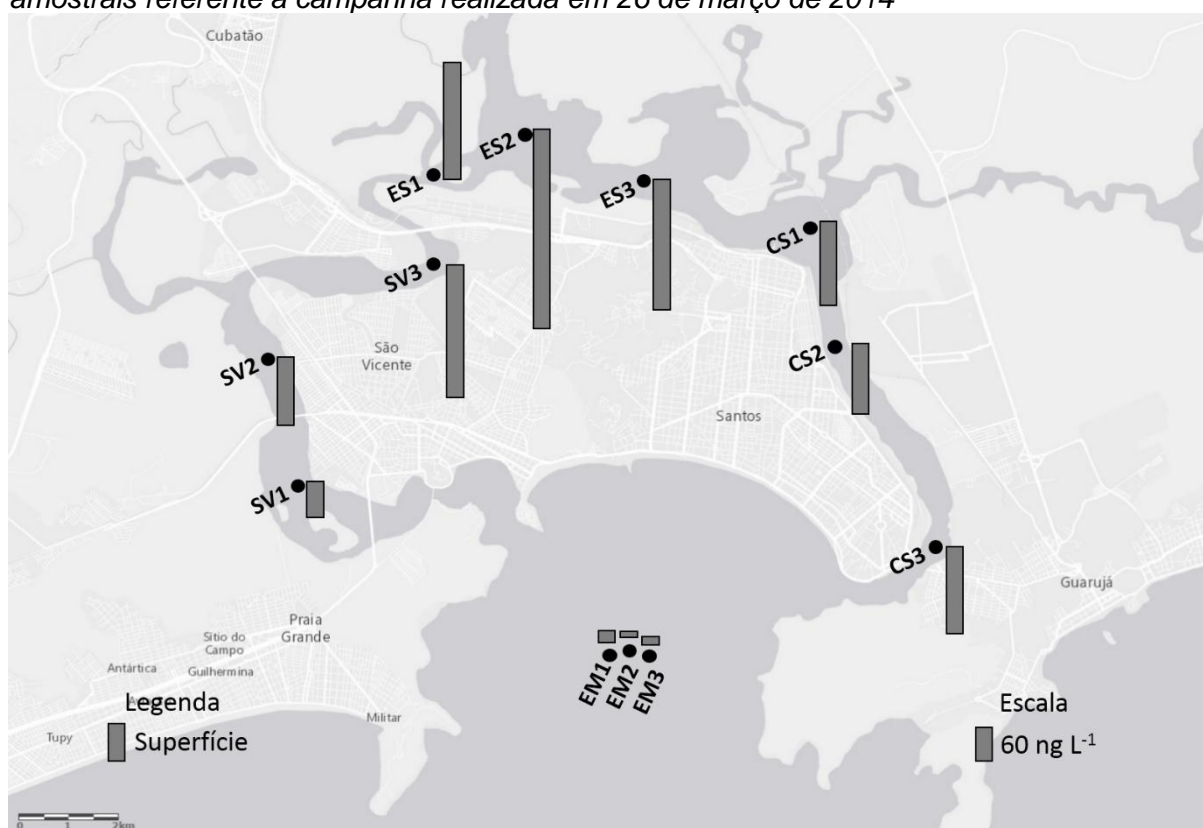
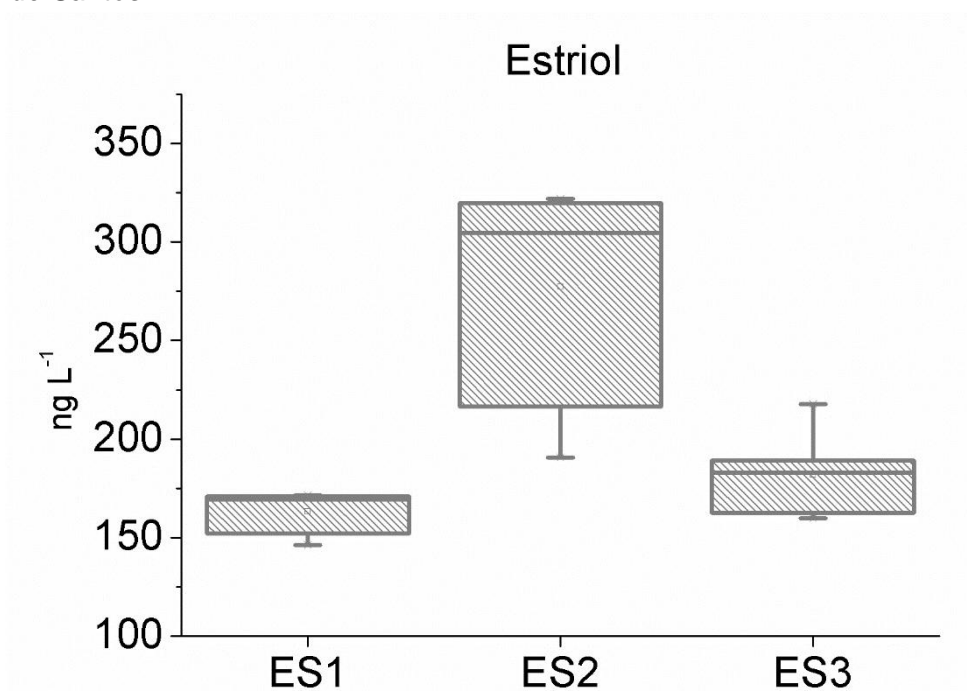


Figura 35. Diagrama de caixas relativas às concentrações de estriol nas amostras do Estuário de Santos.

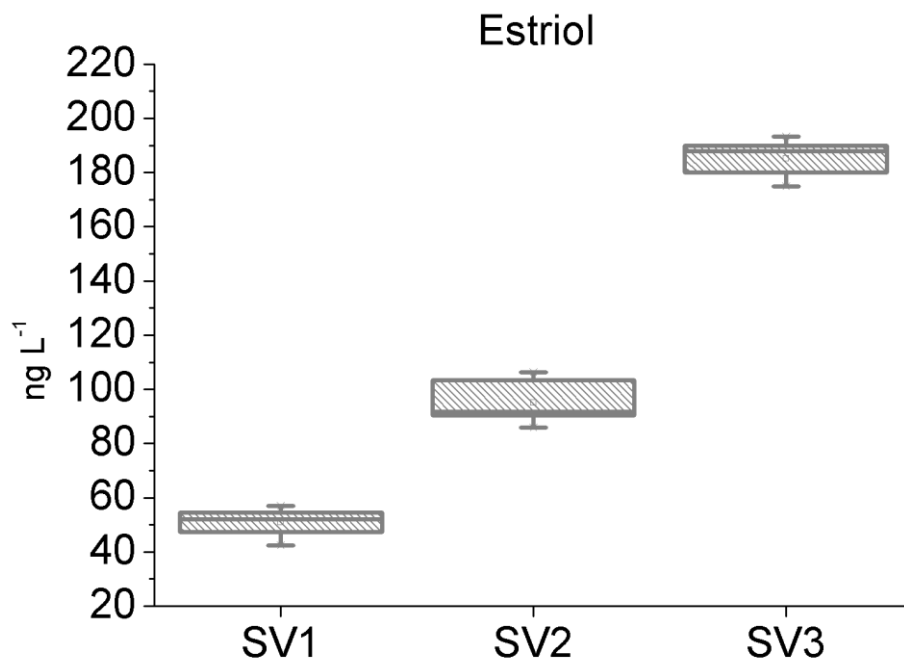


A maior concentração observada para o estriol foi no ponto ES2, logo na desembocadura do Canal de Piaçaguera. A magnitude encontrada nesse ponto pode estar correlacionada com uma alta descarga de estrógenos provenientes desse Canal, o qual mantém ligação com o Rio Cubatão, que recebe o esgoto sanitário da cidade de Cubatão (população de aproximadamente 120 mil habitantes).

Além disso, a amostragem foi realizada em período de mare enchente (26/03/14, 8h às 11h) (Tabela 3), sendo então plausível que os estrógenos que foram encontrados nas amostras de água tenham também a procedência dos canais de Santos e de São Vicente, levados por advecção.

A distribuição das concentrações de estriol encontradas no canal de São Vicente estão apresentadas no diagrama de blocos da Figura 36.

Figura 36. Diagrama de caixas relativas às concentrações de estriol nas amostras do Canal de São Vicente.

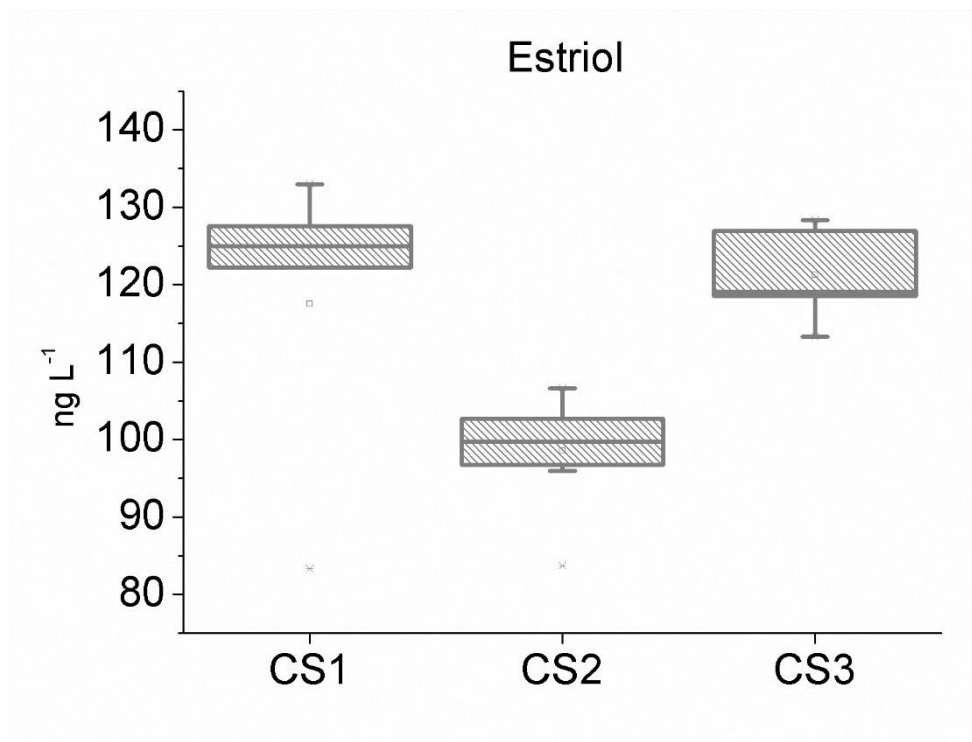


Houve diferenças significativas nas concentrações encontradas para os pontos amostrados no canal de São Vicente para o estriol. Considerando a mare enchente, os valores ficaram dentro do esperado, pois conforme a água oceânica adentrava o canal, fazia com que os analitos alastrassem longitudinalmente no sentido norte do canal.

Acrescentado à esse possível efeito, o ponto SV3 compreende um local de alta densidade populacional em condições de saneamento precário (palafitas), sendo à isso creditado a maior parte de estrógenos encontrados naquela região.

A distribuição do estriol no canal de Santos está apresentada na Figura 37.

Figura 37. Diagrama de caixas relativas às concentrações de estriol nas amostras do Canal de Santos.



Houve diferenças nas concentrações determinadas para o estriol no canal de Santos, sendo que os pontos CS1 e CS 3 apresentaram valores mais elevados. No caso do ponto CS1 existe uma aproximação com a foz de vários rios, inclusive do canal de Piaçaguera, tendo portanto novamente esse aporte de estrógenos provenientes da massa de águas fluviais. Essa possível contribuição do canal de Piaçaguera é também corroborado ao analisar as magnitudes de concentração, já que, o ponto CS1 apresenta concentrações próximas às obtidas para o estuário de Santos.

Existe também a influência de águas provenientes do esgoto sanitário clandestino do Distrito de Vicente de Carvalho (Figura 6), pois o mesmo não possui rede coletora de esgoto, tendo seu descarte diretamente no estuário.

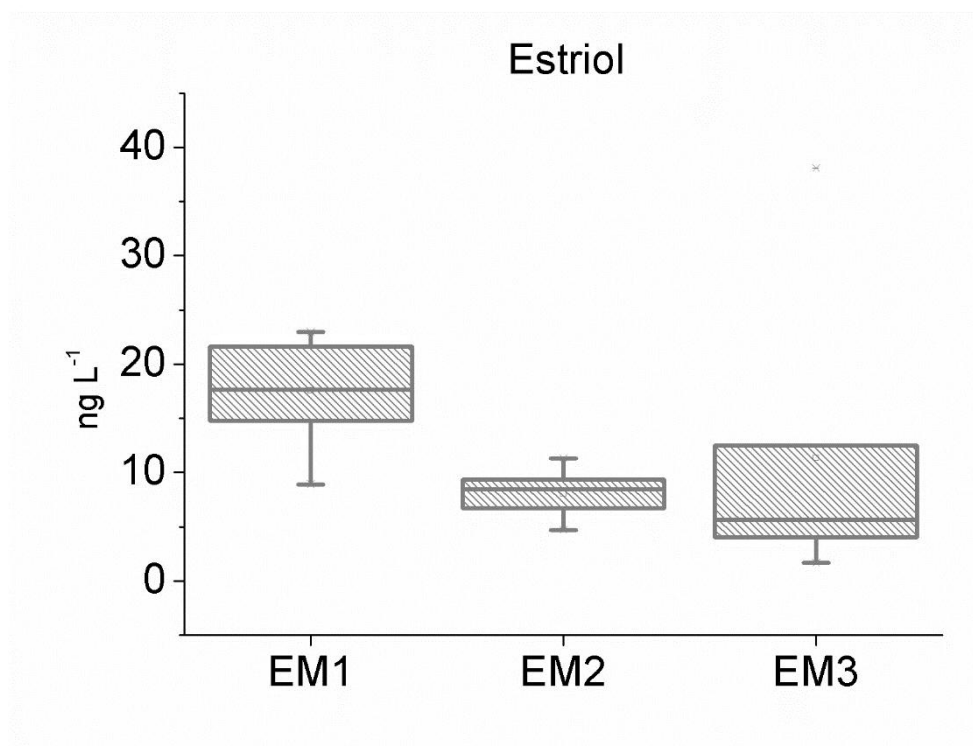
O ponto CS2 situa-se entre uma região portuária e outra de intensa urbanização, com concentrações de estrógenos próximas às encontradas no ponto SV2, o ponto central do canal de São Vicente. As similaridades se estendem quando comparado com o regime de marés, sendo que em mare enchente os analitos podem ser arrastados para regiões mais internas dos canais, como o ponto CS1.

O ponto CS3 também apresentou alta concentração de estriol (126-155 ng L<sup>-1</sup>). Pressupõe-se que a fonte dessa molécula possa ser o emissário submarino de Santos, pois a região do complexo estuarino sofre um alto índice de ventos SW, os quais forçam as correntes no sentido mar aberto – canal de Santos, resultando em altas concentrações na entrada no canal.

Soma-se ainda que a região recebe a descarga de águas contaminadas por esgotos sanitários (COMPANHIA..., 2001), além da proximidade com o Rio Santo Amaro, o qual recebe aporte de diversas embarcações e casas que despejam o seu esgoto diretamente no rio sem prévio tratamento (Agem, 2005).

Nesse cenário, de correntes em direção ao Canal de Santos, o esperado seria que as concentrações dos analitos nos pontos próximos ao emissário fossem mais baixas, e isso foi confirmado com as determinações do estriol (Figura 38).

Figura 38. Diagrama de caixas relativas às concentrações de estriol e nas amostras do Emissário Submarino.



De acordo com o diagrama de caixas observa-se que as concentrações de estriol nos pontos do emissário submarino foram de ordem de grandeza inferior às encontradas em outros pontos. Tal comportamento pode ser explicado pelas

correntes em direção ao canal de Santos e ao efeito diluente intrínseco ao sistema de emissários oceânicos.

#### 4.8. Resultados obtidos na segunda amostragem (fevereiro/2015)

As concentrações médias encontradas para todos pontos estão apresentadas na Tabela 24 e os pontos amostrais na Figura 39.

*Tabela 24. Concentrações médias dos analitos (n=6) (ng L<sup>-1</sup>) encontradas na segunda campanha de amostragem, realizada no dia 10 de fevereiro de 2015.*

	<b>SV1</b>	<b>SV2</b>	<b>SV3</b>	<b>ES1</b>	<b>ES2</b>	<b>ES3</b>	<b>CS1</b>	<b>CS2</b>	<b>CS3</b>
Estriol	31	<LD	<LD	93	55	42	39	31	37
17β-estradiol	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
17α- Etinilestradiol	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

	<b>EMS</b>	<b>EMS</b>	<b>EMS</b>	<b>EMS</b>	<b>EMS</b>	<b>EMS</b>	<b>EMF</b>	<b>EMF</b>	<b>EMF</b>	<b>EMF</b>	<b>EMF</b>	<b>EMF</b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
Estriol	33	16	13	<LQ	20	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
17β- estradiol	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
17α- Etinilestra diol	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

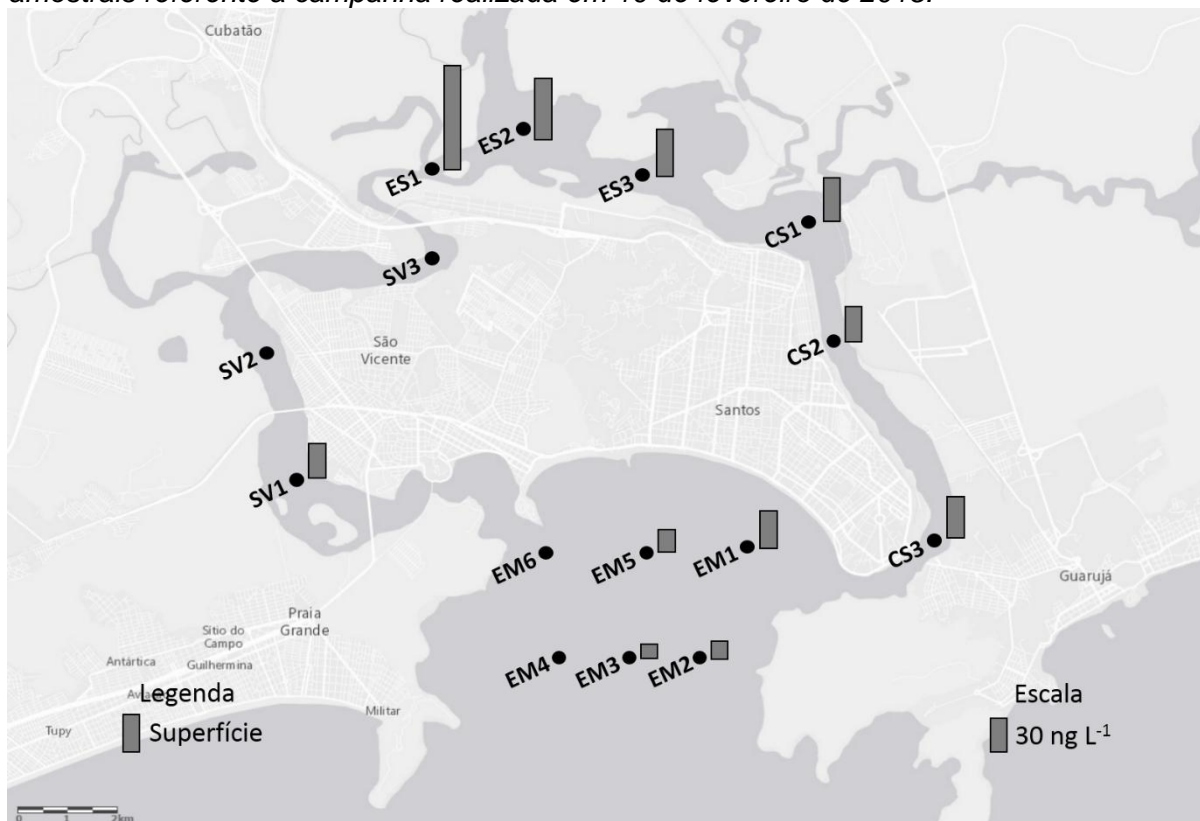
Codificação das amostras de acordo com a Figura 39. EMS= Água superficial, EMF = Água de fundo  
n=6 : 2 amostras por ponto, analisadas em triplicata  
LD = limite de detecção  
LQ = limite de quantificação

Da mesma forma que o ocorrido na primeira amostragem, realizada em março de 2014, não foram detectados os estrógenos 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol, sendo isso creditado aos mesmos fatos evidenciados no subitem anterior. Corroboram-se à eles a ausência desses estrógenos mesmo com maior malha amostral, além de contemplar águas de superfície e de fundo.

A distribuição do estriol entre as regiões se apresentou de forma semelhante à amostragem realizada em 2014, com concentrações maiores na região do estuário de Santos, principalmente no ponto ES1, região que recebe o aporte do Rio Casqueiro (Figura 39).



Figura 39. Concentrações de estriol (em  $\text{ng L}^{-1}$ ) determinadas em água dos pontos amostrais referente a campanha realizada em 10 de fevereiro de 2015.



Os pontos a leste do ES1 (de maior concentração encontrada) foram apresentando diminuições nas concentrações de estriol até o ponto CS2, podendo então esse contaminante ter atingido o canal através das correntes provenientes do canal de Piaçaguera, bem como do descarte de esgoto sanitário da vila dos pescados, região de alta carência sanitária. Já, o ponto CS3 apresentou uma concentração maior que as encontradas nos pontos anteriores, tendo como possível fonte o distrito de Vicente de Carvalho (Figura 6), onde grande parte das residências não estão ligadas à rede coletora de esgoto sanitário, ocorrendo portanto o descarte do mesmo no canal de Santos (ABESSA, 2002).

Por outro lado, o estriol foi detectado em apenas um ponto do Canal de São Vicente (SV1), local de desague do Rio Piaçabuçu e de descarte irregular de resíduos de moradias à leste da margem do canal. Soma-se à esses fatores, a vazante (Tabela 3), a qual pode ter contribuído para o acréscimo de estriol nesse ponto, bem como a diminuição nos pontos SV2 e SV3.

A ocorrência do estriol na baía de Santos foi observada em quatro dos seis pontos amostrais para água superficial, e em nenhum ponto para a água de fundo.

Com relação às águas superficiais, foram encontradas concentrações semelhantes para os pontos EM2, EM3 e EM5, sendo a possível causa a pluma advinda do emissário submarino de Santos, além dos canais artificiais (Figura 8) e do Canal de Santos, sendo essas duas últimas, as plausíveis fontes para a maior concentração de estriol no ponto EM1, localizado mais próximo das mesmas.

Por outro lado, a não detecção do estriol no ponto EM6 pode estar correlacionada com as baixas concentrações no canal de São Vicente, sendo pronunciado ainda mais pela maré vazante. Além desse fato, tal ponto apresentou salinidade de 35 psu, a mesma que o ponto EM4, excluindo portanto fontes importantes como rios e descarte irregular de resíduos.

#### 4.9. Resultados obtidos na terceira amostragem (junho/2015)

As concentrações médias encontradas para todos pontos estão apresentadas na Tabela 25 e os pontos amostrais na Figura 40.

*Tabela 25. Concentrações médias dos analitos (n=6) (ng L<sup>-1</sup>) encontradas na terceira campanha de amostragem, realizada no dia 17 de junho de 2015.*

	SV1	SV2	SV3	ES1	ES2	ES3	CS1	CS2	CS3
Estriol	15	<LQ	49	63	84	98	33	43	23
17β-estradiol	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LD
17α- Etinilestradiol	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

	EMS 1	EMS 2	EMS 3	EMS 4	EMS 5	EMS 6	EMF 1	EMF 2	EMF 3	EMF 4	EMF 5	EMF 6
Estriol	18	<LQ	64	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
17β- estradiol	<LQ	13	<LD	18	<LD	14	<LD	16	<LQ	14	<LQ	15
17α- Etinilestra diol	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

Codificação das amostras de acordo com a Figura 40. EMS= Água superficial, EMF = Água de fundo  
n=6 : 2 amostras por ponto, analisadas em triplicata

LD = limite de detecção

LQ = limite de quantificação

Como ocorrido nas amostragens anteriores, o 17α-etinilestradiol não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas, no entanto, o 17β-estradiol pôde ser quantificado em 4 dos 21 pontos analisados (Figura 40).

Figura 40. Concentrações de  $17\beta$ -estradiol (em  $\text{ng L}^{-1}$ ) determinadas em água dos pontos amostrais referente a campanha realizada em 17 de junho de 2015.

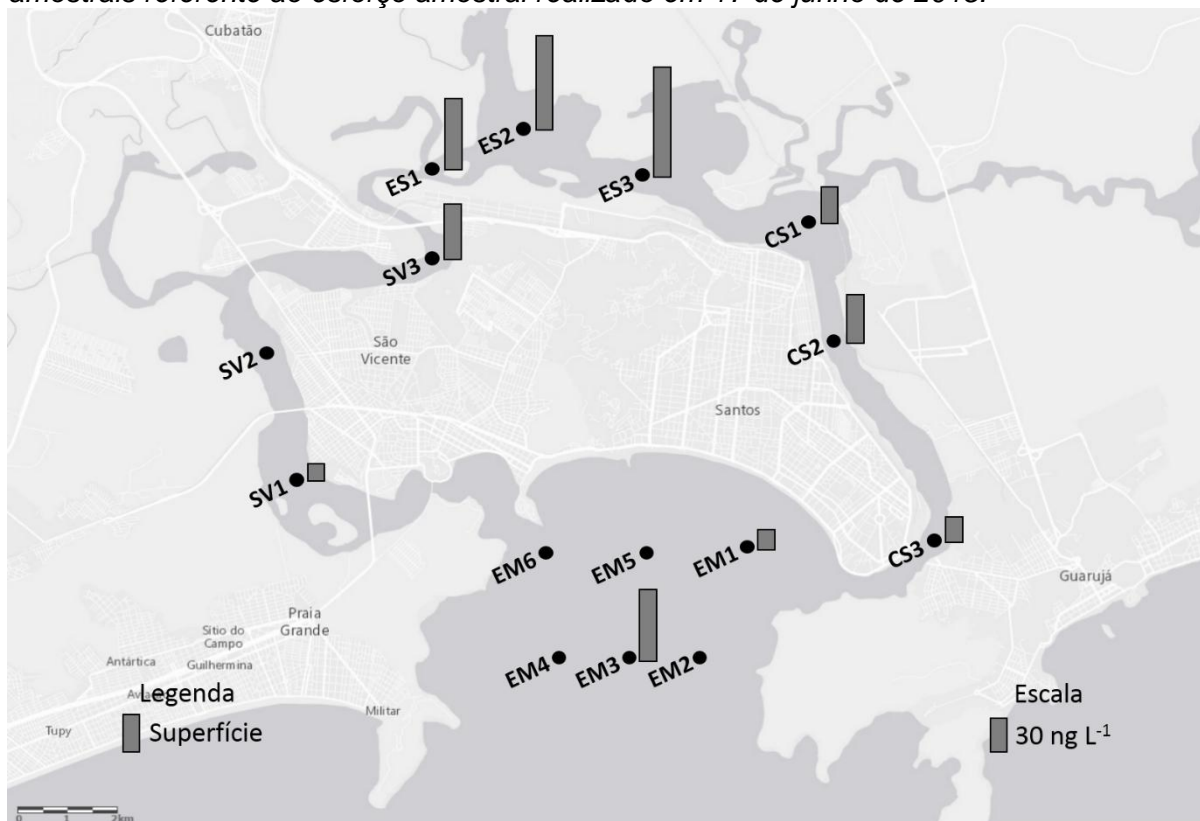


A ocorrência desse estrógeno na Baía de Santos pode ser creditada à um descarte recente do mesmo pelo emissário submarino, visto que não foi detectado estriol (produto de degradação) em nenhum dos pontos amostrais (EM2, EM4 e EM6). No horário referente à amostragem, a baía apresentava maré enchente, corroborando o fato de não haver contribuição dos canais de Santos ou de São Vicente para a ocorrência do  $17\beta$ -estradiol. Quanto às possíveis diferenças de concentrações do  $17\beta$ -estradiol entre água superficial e de fundo, tal fato não foi observado.

Nos pontos amostrais dentro do complexo estuarino, o  $17\beta$ -estradiol foi detectado em 8 dos 9 pontos, no entanto, não pode ser quantificado devido ao limite de quantificação do método ( $12,7 \text{ ng L}^{-1}$ ).

Por outro lado o estriol apresentou concentrações mais elevadas nos pontos amostrados dentro dos canais do que aqueles amostrados na baía (Figura 41).

Figura 41. Concentrações de estriol (em  $\text{ng L}^{-1}$ ) determinadas em água dos pontos amostrais referente ao esforço amostral realizado em 17 de junho de 2015.



As amostras que apresentaram maiores concentrações de estriol foram as referentes ao estuário de Santos, local de desague de vários rios da região e do canal de Piaçaguera, sendo a maior concentração medida no ponto ES3 e logo após o ES2. Tal fato pode ter como explicação a vazante da maré no horário amostrado (9:00 AM, GMT-3), sendo que a água doce dos rios, tidos como possíveis fontes poluidoras, se alastram ao leste no canal.

O canal de Santos apresentou semelhanças ao estuário de Santos, visto a maior concentração de estriol no ponto CS2 que o ponto CS1, o qual deveria estar mais próximo das fontes poluidoras (estuário de Santos e canal de Bertioga). Da mesma forma, a maré vazante pode ter contribuído para que esse comportamento fosse observado.

A ocorrência do estriol no canal de São Vicente foi observada somente nos pontos SV1 e SV3. Em ambos, constatam-se moradias irregulares em suas margens, tendo o ponto SV3, no largo da Pompeba, um grande aporte de águas do Rio Santana e a contribuição de águas do estuário de Santos.

Na baía de Santos, o estriol foi determinado em dois pontos de água superficial, EM1 e EM3. Destaca-se a amostra relativa ao ponto EM3 pela sua magnitude de concentração, 64 ng L<sup>-1</sup>, valor da mesma ordem encontrada na região de maior incidência do estriol (Estuário de Santos). Possivelmente, a fonte para tal estrógeno foi a pluma do emissário submarino de Santos. Já, para o EM1, além dos canais de artificiais, ainda há a influência do Canal de Santos.

#### 4.10. Ocorrência dos estrógenos

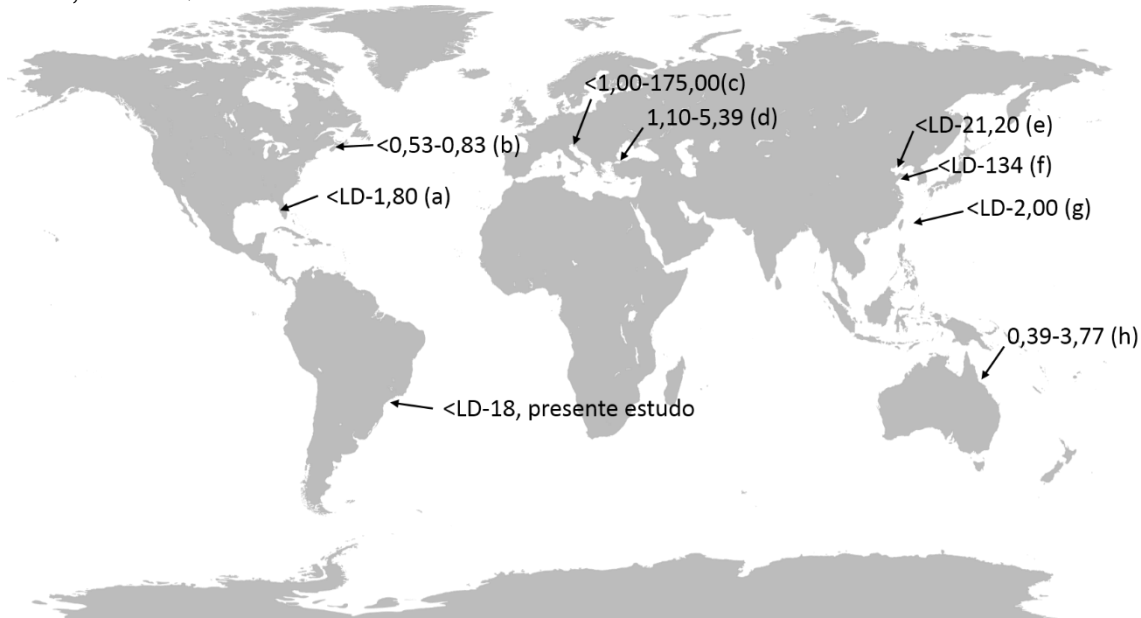
O estrógeno sintético 17 $\alpha$ -etinilestradiol não pôde ser quantificado em nenhum dos pontos coletados dos três esforços amostrais realizados. Diferentemente do 17 $\beta$ -estradiol, a degradação daquele ocorre de forma mais lenta, no entanto, ele é liberado para o meio ambiente majoritariamente na forma conjugada (MULLER et al., 2008).

Além disso, dentre os analitos estudados o EE2 é o que apresenta o maior coeficiente de partição octanol-água, portanto mais suscetível à acumulação no sedimento e material particulado (HOLTHAUS et al., 2002). Braga et al., 2005 evidenciaram que tal comportamento é aumentado quando os estrógenos de um efluente estão em um meio de alta força iônica, fazendo com que os mesmos fiquem adsorvidos em partículas finas, as quais acabam por sedimentar no leito oceânico.

No caso do 17 $\beta$ -estradiol, que também apresenta esse comportamento de aumento da sorção com o aumento da salinidade (YANG, et al. 2016), somado à possível degradação do mesmo (ARIS et al., 2014), são fatores claros para a baixa detecção desse estrógeno nas amostras analisadas. Ainda, a hipótese da degradação ganha força a partir da detecção do mesmo somente na baía de Santos e em um momento de maré enchente, sendo a única fonte o emissário submarino.

A ocorrência do 17 $\beta$ -estradiol, com concentrações variando entre <LD-18 ng L<sup>-1</sup>, foi próxima às encontradas em outros estudos (Figura 42). Além disso, nota-se pela Figura 42, que os valores de concentração majoritariamente detectados nos outros trabalhos estão abaixo do limite de detecção do presente estudo.

Figura 42. Concentrações de  $17\beta$ -estradiol em água superficial estuarina ( $\text{ng L}^{-1}$ ). (a) Singh et al., 2010. South Florida, EUA. (b) Zuo et al., 2006. Acushnet, EUA. (c) Pojana et al., 2007. Veneza, Itália. (d) Aydin & Talinli, 2013. Istambul, Turquia. (e) Lei et al., 2009. Tianjin, China. (f) Zhou et al., 2011. Quingdao, China. (g) Chen et al., 2007. Taipei, Taiwan. (h) Ying et al., 2009. Queensland, Austrália.



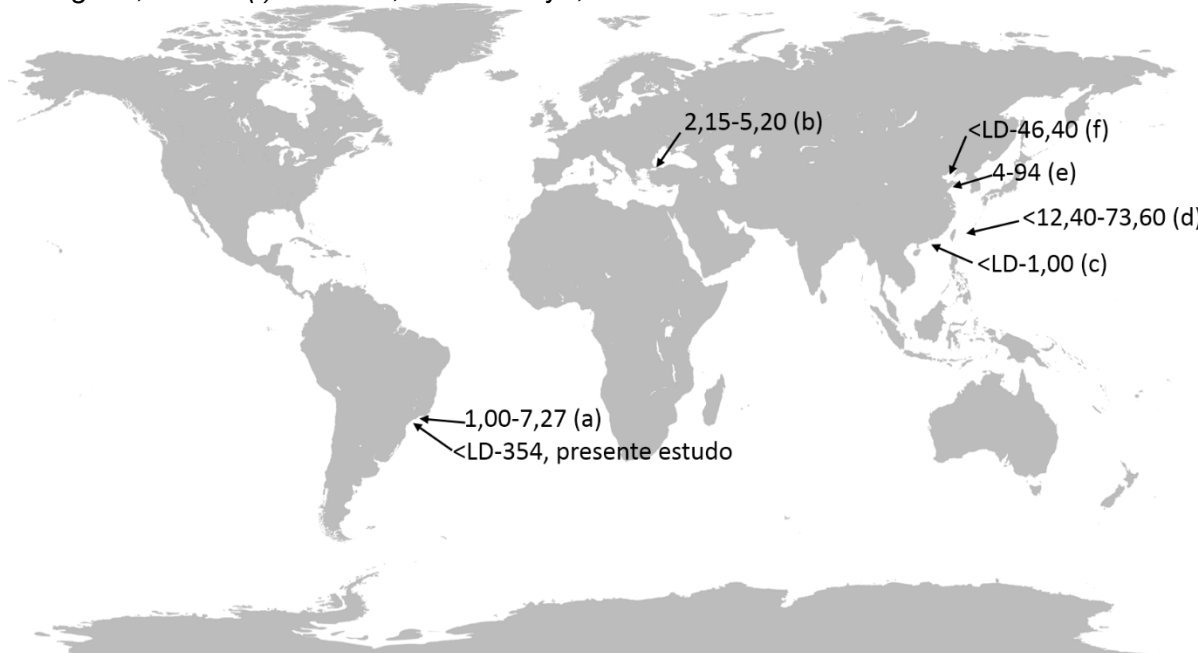
Considerando as amostras onde o  $17\beta$ -estradiol pôde ser quantificado, os valores variaram entre 13 e  $18 \text{ ng L}^{-1}$ . Ciocan et al., (2010) demonstraram que a expressão do gene que produz a proteína vitalogenina, a qual está relacionada à maturação dos óvulos, podendo dessa forma ser considerada um marcador de feminização de animais, foi maior em mexilhões imaturos expostos à  $5 \text{ ng L}^{-1}$  de  $17\beta$ -estradiol que em mexilhões adultos não expostos à esse estrógeno. Irwin et al., (2001) mostraram que ocorre a indução da produção de vitalogenina em tartarugas (*Chrysemys picta*) em concentrações entre  $1,80$  e  $7,4 \text{ ng L}^{-1}$  de  $17\beta$ -estradiol, podendo essa alteração acarretar em efeitos deletérios na reprodução desses animais.

Dentre os estrógenos estudados, o estriol foi o de maior incidência e com maiores valores de concentração. Nie et al., (2015), avaliaram a ocorrência de estrógenos em um estuário da China durante as quatro estações do ano em sete locais diferentes, sendo o estriol detectado em todas as estações e o mais frequentemente detectado nas amostras. O mesmo comportamento foi obtido por Kuster et al., (2009), ao avaliar a ocorrência de estrógenos no Rio de Janeiro, sendo o estriol detectado em 70% das amostras. Aydin e Tanli, (2013), ao analisar a ocorrência de fármacos em Istambul, chegaram no mesmo perfil de contaminação,

encontrando maior frequência de detecção do estriol dentre os estrógenos por eles estudados (E1, E2, EE2 e E3).

As concentrações de estriol encontradas nesse trabalho situaram-se entre <LD-354 ng L<sup>-1</sup>, valores maiores que os encontrados em outros locais (Figura 43). No entanto, considerando somente as últimas duas amostragens, a variação da concentração de estriol foi de <LD-98 ng L<sup>-1</sup>, estando esses valores nos mesmos níveis que em outros estudos, principalmente em regiões onde não há tratamento eficiente do esgoto sanitário (CHEN et al., 2007).

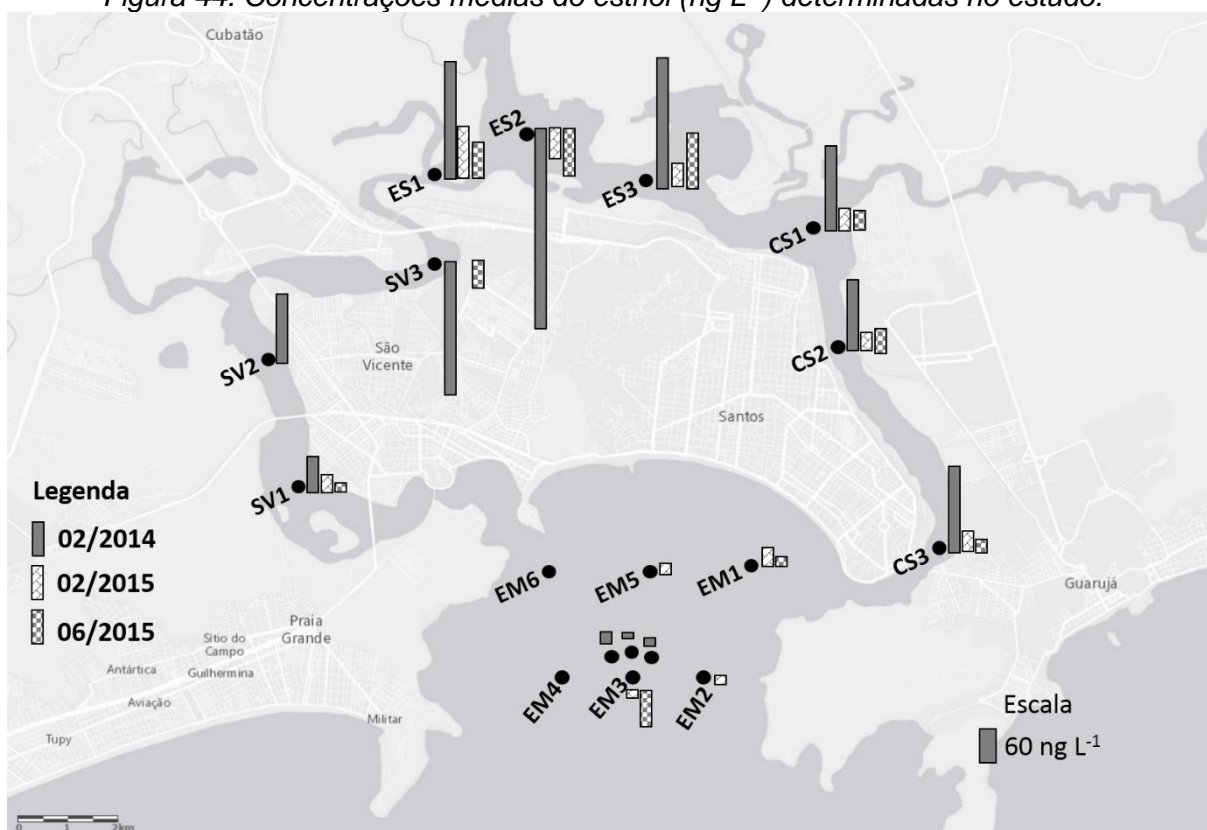
Figura 43. Concentrações de estriol em água superficial estuarina (ng L<sup>-1</sup>). (a) Kuster et al., 2009. Rio de Janeiro, Brasil. (b) Aydin & Talinli, 2013. Istambul, Turquia. (c) Peng et al., 2008. Guangzhou, China. (d) Chen et al., 2007. Taipei, Taiwan. (e) Zhou et al., 2011. Qingdao, China. (f) Lei et al., 2009. Tianjin, China.



Apesar do estriol ser considerado de menor potencial estrogênico que o 17 $\beta$ -estradiol e 17 $\alpha$ -etinilestradiol (LUO et al 2011, LANGE et al, 2012), o mesmo pode ter efeitos à biota, como a expressão do gene da vitalogenina em peixes (*Oryzias latipes*) machos (LEI et al., 2014) quando esses são expostos ao estriol na concentração de 5 ng L<sup>-1</sup> por 15 dias.

Tendo em vista a distribuição do estriol entre as amostragens (Figura 44), é evidente a maior incidência do analito na região do estuário de Santos e na parte norte do canal de São Vicente.

Figura 44. Concentrações médias do estriol ( $\text{ng L}^{-1}$ ) determinadas no estudo.



Harari et al., (2008), mostraram que as correntes de maré que entram pelos canais de Santos e São Vicente em direção ao estuário de Santos se encontram exatamente nessa região onde foram encontrados os maiores valores de concentração para o estriol, em todos esforços amostrais, sendo esse um dos fatores para a acumulação desse estrógeno na área em questão.

Gimiliani et al., (2016), calcularam o tempo de residência das águas na região do canal de Piaçaguera, do setor norte do canal de Santos e na entrada desse canal, sendo maior nos pontos ES1 e ES2. Portanto, a troca de águas nessa região é menor, havendo maior tempo para degradação dos analitos, bem como da acumulação dos mesmos.

Além desse fator hidrodinâmico, a região apresenta baixo nível de atendimento sanitário, incluindo bairros urbanizados sem rede coletora de esgoto sanitário e uma grande quantidade de moradias precárias irregulares próximas aos corpos d'água, lançando seus efluentes em valas, redes de drenagem ou diretamente no estuário, como no caso da Vila dos Pescadores e palafitas que margeiam o Rio dos Bugres (Vila Gilda).



Martins et al., (2010) determinaram a ocorrência de alquilbenzenos lineares, os quais podem ser considerados marcadores de esgoto sanitário, em sedimentos da região, e obtiveram os maiores valores referentes à amostragem próxima ao Rio Casqueiro (ES1).

Outro fator que pode contribuir para a contaminação da região norte do complexo estuarino são as descargas de águas do sistema Billings (Rio Pinheiros e Rio Tietê), através das turbinas da Usina Henry Borden.

#### 4.11. Efeitos da sazonalidade

Com relação à sazonalidade, Chambel e Mateus (2008), mostraram que o tempo de renovação das águas é menor durante o verão por dois motivos principais: o volume de chuva nessa estação é maior, sendo o mês de fevereiro com maior precipitação média (Figura 7), e as velocidades de corrente para tal estação, são maiores. No entanto, os resultados obtidos nesse trabalho não apresentam padrões nítidos referente às diferentes estações do ano. Harari et al., (2008), a partir de uma análise de dados medidos durante um período de inverno e um período de verão constataram que os padrões de correntes para as diferentes estações são semelhantes, devido à grande influência da circulação causada pela maré.

No que concerne aos regimes de maré, Miranda et al., (2010), analisaram uma série de correntes no canal de Piaçaguera e obtiveram os valores de velocidade de corrente entre 0,20 e 0,30 m/s para quadratura e 0,40 a 0,50 m/s para sizígia. Tal fato pode explicar as diferentes concentrações obtidas para a amostragem de 2014 (quadratura) e para as amostragens de 2015 (sizígia), pois conforme diminui a velocidade de corrente, maior será o tempo de residência das águas.

## 5 Considerações finais e Conclusões

A avaliação da ocorrência de estrógenos no complexo estuarino de Santos-São Vicente foi realizada através de método com alta confiabilidade analítica, sendo possível determinar com fidedignidade as concentrações de estriol, 17 $\beta$ -estradiol e 17 $\alpha$ -etinilestradiol em água salobra e marinha daquela região.

A confiabilidade analítica foi alcançada através do uso de ferramentas estatísticas robustas, como a avaliação dos resíduos da regressão, análise de variância dos modelos propostos, estudos de efeito matriz, e avaliação da conservação dos analitos nos cartuchos de extração em fase sólida após a passagem da amostra nos mesmos.

A ocorrência de estriol foi a mais frequente entre as amostras (detectado em dois terços das amostras), sendo os valores de concentração obtidos para esse estrógeno os maiores entre os estudados. O segundo analito mais frequente foi o 17  $\beta$ -estradiol, sendo detectado em um terço das amostras analisadas. Por fim, o 17  $\alpha$ -etinilestradiol foi detectado somente em 2 amostras analisadas, de um total de 54.

Tal comportamento pode ser explicado em razão da degradação do 17  $\beta$ -estradiol em estrona, o qual é convertido em estriol. Por outro lado, o 17  $\alpha$ -etinilestradiol apresenta uma taxa de adsorção nos sedimentos e material particulado maior que o estriol e o 17  $\beta$ -estradiol, sendo tais matrizes os possíveis sumidouros daquele estrógeno. Cabe ainda ressaltar que o 17  $\alpha$ -etinilestradiol é excretado na forma conjugada, as quais não foram incluídas esse estudo.

Com relação às concentrações observadas, as de maiores magnitudes foram encontradas em áreas de reconhecidos problemas de saneamento, como o Largo da Pompeba, proximidades do Rio Casqueiro e na extremidade sul do Canal de Santos, local com aporte de efluentes do Distrito de Vicente de Carvalho.

Esses resultados indicam que as possíveis fontes para os estrógenos no complexo estuarino sejam os lançamentos de esgoto sanitário, no entanto, não foram observadas altas concentrações desses contaminantes na região de saída do emissário submarino de Santos, possivelmente devido à diluição intrínseca à esse

dispositivo bem como a alta salinidade do local, a qual torna esses alteradores endócrinos mais suscetíveis à adsorção no material particulado e sedimentos.

Não foi observada variação nas concentrações entre as estações, sendo as maiores variações na distribuição desses estrógenos causadas pelos regimes de marés.

Por fim, os valores de concentrações determinados para o estriol e 17  $\beta$ -estradiol em parte das amostras estão acima daquelas onde há toxicidade demonstrada para organismos aquáticos. Do ponto de vista ambiental, esse risco ecotoxicológico é de extrema preocupação, já que a região abriga o Parque Estadual Xixová-Japuí além de grandes áreas de mangue, as quais são locais de transição entre o ambiente marinho e terrestre.

## 6 Perspectivas futuras

Frente aos resultados obtidos, fica clara a necessidade de políticas públicas visando a melhoria da qualidade sanitária da região bem como de mais estudos que embasem tanto a ocorrência dos estrógenos quanto à toxicidade desses contaminantes no local.

Dentre os estudos de ocorrência, há a necessidade de desenvolvimento de métodos que incluam os estrógenos conjugados e também outros analitos que sejam considerados marcadores de esgoto, podendo então, dessa forma, atrelar os estrógenos às possíveis fontes desses alteradores endócrinos. Além disso, para o completo entendimento da distribuição desses compostos, há a necessidade da determinação dos mesmos em diferentes matrizes ambientais, como o material particulado e sedimento.

O monitoramento ambiental dos estrógenos, via amostragens ativas e passivas, e estudos toxicológicos com os estrógenos individuais e em mistura para organismos da região trariam artifícios concretos para tomadas de decisões com intuito de minimizar a ocorrência de tais contaminantes na região, a qual além de apresentar rica variedade de espécies biológicas em risco, possui um alto potencial turístico, acarretando assim em melhores condições aos habitantes locais.

## Referências

- ABESSA, D. M. S. **Avaliação da qualidade de sedimentos do sistema estuarino de Santos, SP, Brasil**. 2002. 260 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- ABESSA, D. M. S. et al. Efeitos ambientais da disposição oceânica de esgotos por meio de emissários submarinos: uma revisão. **Mundo da Saúde**, v. 36, n. 4, p. 643-661, 2012.
- AMBROZEVICIUS, A. P.; ABESSA, D. M. D. S. Acute toxicity of waters from the urban drainage channels of Santos (São Paulo, Brazil). **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 3, n. 2, p. 108-115, 2008.
- ARDITSOGLOU, A.; VOUTSA, D. Occurrence and partitioning of endocrine-disrupting compounds in the marine environment of Thermaikos Gulf, Northern Aegean Sea, Greece. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 11, p. 2443-2452, 2012.
- ARIS, A. Z.; SHAMSUDDIN, A. S.; PRAVEENA, S. M. Occurrence of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. **Environment International**, v. 69, p. 104-119, 2014.
- AYDIN, E.; TALINLI, I. Analysis, occurrence and fate of commonly used pharmaceuticals and hormones in the Buyukcekmece Watershed, Turkey. **Chemosphere**, v. 90, n. 6, p. 2004-2012, 2013.
- AZEVEDO, J. de S. **Biomarcadores de contaminação em *Cathorops spixii* nos estuários de Santos/São Vicente e Cananéia**. 2008. 218 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- BARROS NETO, B. de.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414 p.
- BERTIN, A.; INOSTROZA, P. A.; QUIÑONES, R. A. Estrogen pollution in a highly productive ecosystem off central-south Chile. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p. 1530-1537, 2011.
- BERZIN, G.; LEITÃO, J. C. Utilização de modelo hidrodinâmico no controle da poluição do Estuário e Baía de Santos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 18., 1997, Foz do Iguaçu. **Anais...** Rio de Janeiro: ABES, 1997. v. 1, p. 2212-2221.
- BIANCHI, T. S. **Biogeochemistry of estuaries**. New York: Oxford University Press, 2007. 706 p.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.

BONETTI FILHO, J. **Sensoriamento remoto aplicado à análise de ambientes costeiros impactados**: avaliação metodológica: Baixada Santista. 1996. 206 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

BRAGA, O. et al. Steroid estrogens in ocean sediments. **Chemosphere**, v. 61, n. 6, p. 827-833, 2005.

BURUAEM, L. M. et al. Integrated quality assessment of sediments from harbour areas in Santos-São Vicente Estuarine System, Southern Brazil. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 130, p. 179-189, 2013.

CABAS, I. et al. 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol alters the immune response of the teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) both in vivo and in vitro. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 36, n. 3, p. 547-556, 2012.

CAMPOS, V. et al. Fecal sterols in estuarine sediments as markers of sewage contamination in the Cubatão area, São Paulo, Brazil. **Aquatic Geochemistry**, v. 18, n. 5, p. 433-443, 2012.

CASANOVA-NAKAYAMA, A. et al. Endocrine disrupting compounds: can they target the immune system of fish? **Marine Pollution Bulletin**, v. 63, n. 5, p. 412-416, 2011.

CESAR, A. et al. Environmental assessment of dredged sediment in the major Latin American seaport (Santos, São Paulo - Brazil): an integrated approach. **Science of the Total Environment**, v. 497/498, p. 679-687, 2014.

CHAMBEL, J.; MATEUS, M. **Deliverable 2.3**: calibration of the hydrodynamic model for the Santos estuary. Lisboa: Maretec, 2008. 35 p.  
Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/238759899\\_D23\\_-\\_Calibration\\_of\\_the\\_hydrodynamic\\_model\\_for\\_the\\_Santos\\_Estuary](https://www.researchgate.net/publication/238759899_D23_-_Calibration_of_the_hydrodynamic_model_for_the_Santos_Estuary)>. Acesso em: 6 jul. 2016.

CHEN, C. Y. et al. Determining estrogenic steroids in Taipei waters and removal in drinking water treatment using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **The Science of the Total Environment**, v. 378, n. 3, p. 352-365, 2007.

CIOCAN, C. M. et al. Effects of estrogen exposure in mussels, *Mytilus edulis*, at different stages of gametogenesis. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 9, p. 2977-2984, 2010.

COMBALBERT, S.; HERNANDEZ-RAQUET, G. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1671-1692, May 2010.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Sistemas estuarino de Santos e São Vicente**. São Paulo, 2001. 178 p. Disponível em: <<http://praias.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/26/2013/11/relatorio.zip>>. Acesso em: 6 jul. 2016.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Qualidade das águas superficiais do estado de São Paulo 2012**. São Paulo, [2013]. 354 p. (Série relatórios). Disponível em: <<http://aguasinteriores.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/32/2013/11/relatorio-aguas-superficiais-2012-substituido-em-060513.zip>>. Acesso em: 6 jul. 2016.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Qualidade das praias litorâneas no estado de São Paulo 2015**. São Paulo, 2016. 192 p. (Série relatórios). Disponível em: <<http://praias.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/26/2013/11/praias-2015.pdf>>. Acesso em: 6 jul. 2016.

D'ASCENZO, G. et al. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. **Science of the Total Environment**, v. 302, n. 1, p. 199-209, 2003.

FROEHNER, S. et al. Occurrence of selected estrogens in mangrove sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 1, p. 75-79, 2012.

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

GOOGLE MAPS. [Estuário de Santos-São Vicente]. 2016. Disponível em: <<https://www.google.com.br/maps/@-23.9613343,-46.3611516,12.5z>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

GREGORIO, H. P. **Modelagem numérica da dispersão da pluma do emissário submarino de Santos**. 2009. 125 f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GRUBBS, F. E. Procedures for detecting outlying observations in samples. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 1-21, 1969.

HARARI, J.; CAMARGO, R. de; CACCIARI, P. L. Resultados da modelagem numérica hidrodinâmica em simulações tridimensionais das correntes de maré na Baixada Santista. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 5, n. 2, p. 71-87, 2000.

HARARI, J.; FRANÇA, C. A. S.; CAMARGO, R. Climatology and hydrography of the Santos Estuary. In: NEVES, R.; BARETTA, J.; MATEUS, M. (Org). **Perspectives on integrated coastal zone management in South America**. Lisboa: IST Press, 2008. p.147-160.

HAVLÍKOVÁ, L. et al. Determination of estradiol and its degradation products by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1119, n. 1/2, p. 216-223, 2006.

HIBBERD, A. et al. An improved method for the simultaneous analysis of phenolic and steroidal estrogens in water and sediment. **Talanta**, v. 77, n. 4, p. 1315-1321, 2009.

HOLTHAUS, K. I. E. et al. The potential for estradiol and ethinylestradiol to sorb to suspended and bed sediments in some english rivers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 2526-2535, Dec. 2002.

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n. 2, p. 331-343, 1995.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo demográfico: resultados divulgados no Diário Oficial da União em 04/11/10**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/resultados\\_dou/SP2010.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/resultados_dou/SP2010.pdf)> Acesso em: 6 jul. 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **DOQ-CGCRE-008**. Orientação sobre validação de métodos analíticos: documento de caráter orientativo. 2010. Revisão 3. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_03.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf)>. Acesso em: 14 mar. 2016.

IRWIN, L. K.; GRAY, S.; OBERDÖRSTER, E. Vitellogenin induction in painted turtle, *Chrysemys picta*, as a biomarker of exposure to environmental levels of estradiol. **Aquatic Toxicology**, v. 55, n. 1, p. 49-60, 2001.

ISOBE, T. et al. Horizontal distribution of steroid estrogens in surface sediments in Tokyo Bay. **Chemical Analysis**, v. 144, p. 632-638, 2006.

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

JOBLING, S. et al. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. **Aquatic Toxicology**, v. 66, n. 2, p. 207-222, 2004.

JOHNSON, A. C.; WILLIAMS, R. J. A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone, and ethinylestradiol at sewage treatment works. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 13, p. 3649-3658, July 2004.

JÜRGENS, M. D.; WILLIAMS, R. J.; JOHNSON, A. C. **Fate and behaviour of steroid oestrogen in rivers: a scoping study**. Bristol: Environmental Agency Bristol, 1999. 94 p. Technical report P161. Disponível em: <[https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/290229/strp161-e-e.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/290229/strp161-e-e.pdf)>. Acesso em: 6 jul. 2016.

KENNISH, M. J. **Practical handbook of estuarine and marine pollution**. Boca Raton: CRC, 1997. 524 p.

KOSTICH, M.; FLICK, R.; MARTINSON, J. Comparing predicted estrogen concentrations with measurements in US waters. **Environmental Pollution**, v. 178, p. 271-277, 2013.



- KUMAR, V. et al. The arrival and discharge of conjugated estrogens from a range of different sewage treatment plants in the UK. **Chemosphere**, v. 82, n. 8, p. 1124-1128, 2011.
- KUSTER, M. et al. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). **Environment International**, v. 35, n. 7, p. 997-1003, 2009.
- LAFLEUR, A. D.; SCHUG, K. A. A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems. **Analytica Chimica Acta**, v. 696, n. 1/2, p. 6-26, 2011.
- LANGE, A. et al. Comparative responsiveness to natural and synthetic estrogens of fish species commonly used in the laboratory and field monitoring. **Aquatic Toxicology**, v. 109, p. 250-258, 2012.
- LAPWORTH, D. J. et al. Emerging organic contaminants in groundwater: a review of sources, fate and occurrence. **Environmental Pollution**, v. 163, p. 287-303, 2012.
- LEI, B. et al. Levels of six estrogens in water and sediment from three rivers in Tianjin area, China. **Chemosphere**, v. 76, n. 1, p. 36-42, 2009.
- LEI, B. et al. Long-term exposure investigating the estrogenic potency of estriol in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 160, n. 1, p. 86-92, 2014.
- LOPES, L. G. **Estudo sobre a ocorrência de estrógenos em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal – SP**. 2007. 121 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.
- LOPES, L. G. et al. Estrogênios em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal - São Paulo. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 639-643, 2010.
- LUO, J. et al. Identification of estrogen receptor agonists in sediments from Wenyu River, Beijing, China. **Water Research**, v. 45, n. 13, p. 3908-3914, 2011.
- MARTINS, C. C. et al. Depositional history of sedimentary linear alkylbenzenes (LABs) in a large South American industrial coastal area (Santos Estuary, Southeastern Brazil). **Environmental Pollution**, v. 158, n. 11, p. 3355-3364, 2010.
- MIÈGE, C. et al. Method validation for the analysis of estrogens (including conjugated compounds) in aqueous matrices. **TrAC, Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 2, p. 237-244, Feb. 2009.
- MOURA, J. A. **Estudo da eficiência de estações de tratamento de esgoto - ETE e estações de tratamento de água – ETA na eliminação de resíduos de estrógenos naturais e sintéticos na UGRHI-13 (Tietê-Jacaré)**. 2009. 188 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

- MULLER, M. et al. Chemical and biological analysis of endocrine-disrupting hormones and estrogenic activity in an advanced sewage treatment plant. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 8, p. 1649-1658, Aug. 2008.
- NIE, M. et al. Occurrence, distribution and risk assessment of estrogens in surface water, suspended particulate matter, and sediments of the Yangtze Estuary. **Chemosphere**, v. 127, p. 109-116, 2015.
- PARTRIDGE, C.; BOETTCHER, A.; JONES, A. G. Short-term exposure to a synthetic estrogen disrupts mating dynamics in a pipefish. **Hormones and Behavior**, v. 58, n. 5, p. 800-807, 2010.
- PENG, X. et al. Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. **Science and Technology**, v. 7, p. 1-9, 2008.
- PEREIRA, C. D. S. et al. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. **Science of the Total Environment**, v. 548/549, p. 148-154, 2016.
- PINTO, A. B. et al. Heavy metals and TPH effects on microbial abundance and diversity in two estuarine areas of the southern-central coast of São Paulo State, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 96, n. 1/2, p. 410-417, 2014.
- 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.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2001. 703 p.
- RAZALI, N. M.; WAH, Y. B. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. **Journal of Statistical Modeling and Analytics**, v. 2, n. 1, p. 21-33, 2011.
- REIS FILHO, R. W.; ARAÚJO, J. C. de; VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 817-822, 2006.
- REYHANIAN, N. et al. 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol affects anxiety and shoaling behavior in adult male zebra fish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 1, p. 41-48, 2011.
- RIBEIRO, F. A. D. L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.
- ROCHA, M. L. F. et al. Metal concentration in muscle of two species of flatfish from Santos Bay, Southeastern Brazilian coast. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 318, pt. A, p. 88-93, 2014.

SAMPAIO, A. F. P.; FERREIRA, J. M. S.; TELÉSFORO, J. Socio-economic issues in Santos estuary. In: NEVES, R.; BARETTA, J.; MATEUS, M. (Org). **Perspectives on integrated coastal zone management in South America**. Lisboa: IST Press, 2008. p. 205-218.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. **Emissários submarinos: projeto, avaliação de impacto ambiental e monitoramento**. São Paulo, 2006. 240 p.

SARAVANABHAVAN, G.; HELLEUR, R.; HELLOU, J. Chemosphere GC – MS / MS measurement of natural and synthetic estrogens in receiving waters and mussels close to a raw sewage ocean outfall. **Chemosphere**, v. 76, n. 8, p. 1156-1162, 2009.

SILVA, P. S. C. et al. Metal distribution in sediment cores from São Paulo State Coast, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 5, p. 1130-1139, 2011.

SINGH, S. P. et al. Occurrence and distribution of steroids, hormones and selected pharmaceuticals in South Florida coastal environments. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 2, p. 338-350, Feb. 2010.

SOUZA, J. B. G. **Estudo da ocorrência de tetraciclinas e estrógenos em água superficial, subterrânea e esgoto tratado na cidade de Campo Grande (MS)**. 2008. 155 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

SOUZA, S. C. S.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, p. 25-35, 2005.

TARRANT, A. M; ATKINSON, M. J.; ATKINSON, S. Uptake of estrone from the water column by a coral community. **Marine Biology**, v. 139, n. 2, p. 321-325, Aug. 2001.

TRUJILLO, A. P.; THURMAN, H. V. **Essentials of oceanography**. 10th ed. Glenview: Pearson, 2011. 577 p.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for submarine outfall structures for Mediterranean small and medium-sized coastal communities**. Athens: UNEP, 1996. 36 p.

Disponível em:

<[http://195.97.36.231/dbases/MEETING\\_DOCUMENTS/96WG111\\_Inf6\\_Eng.pdf](http://195.97.36.231/dbases/MEETING_DOCUMENTS/96WG111_Inf6_Eng.pdf)>

Acesso em: 23 abr. 2016.

VALENTIN, J. L.; MUELBERT, J. H. Ambientes marinhos. In: CASTELLO, J. P.; KRUG, L. C. (Org). **Introdução às ciências do mar**. Pelotas: Textos, 2015. Cap. 12, p. 314-381.

VERBINNEN, R. T.; NUNES, G. S.; VIEIRA, E. M. Determinação de hormônios estrógenos em água potável usando CLAE-DAD. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1837-1842, 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.

WEBER, R. Sistemas costeiros e oceânicos. **Química Nova**, v. 15, n. 2, p. 137-143, 1992.

YANG, L. et al. Partitions and vertical profiles of 9 endocrine disrupting chemicals in an estuarine environment: effect of tide, particle size and salinity. **Environmental Pollution**, v. 211, p. 58-66, 2016.

YING, G.-G. et al. Occurrence and implications of estrogens and xenoestrogens in sewage effluents and receiving waters from South East Queensland. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 18, p. 5147-5155, 2009.

YOUNG, et al. **Proposed predicted-no-effect-concentrations (PNECS) for natural and synthetic steroid oestrogens in surface waters**. Bristol: Environment Agency, 2004. 180 p. R&D Technical Report P2-T04/1. Disponível em: <[http://www.salmon-trout.org/pdf/EA.%20\(2004\).%20Proposed%20predicted%20no-effect%20concentration%20\(PNECs\).pdf](http://www.salmon-trout.org/pdf/EA.%20(2004).%20Proposed%20predicted%20no-effect%20concentration%20(PNECs).pdf)>. Acesso em: 6 jul. 2016

ZHANG, X. et al. Levels of estrogenic compounds in Xiamen Bay sediment, China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 8, p. 1210-1216, 2009.

ZHOU, X. et al. Distribution of estrogens along Licun River in Qingdao, China. **Procedia Environmental Sciences**, v. 10, pt. C , p. 1876-1880, 2011.

ZOCOLO, G. J. et al. Determination of estrogens (estriol,  $\beta$ -estradiol, estrone and 17 $\beta$ -ethynylestradiol) in river water from a rural area in Midwest Brazil. **Toxicology Letters**, v. 196, p. S63, 2010. Supplement.

ZUO, Y.; ZHANG, K.; DENG, Y. Occurrence and photochemical degradation of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol in Acushnet River Estuary. **Chemosphere**, v. 63, n. 9, p. 1583-1590, 2006.