



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa



Monitorização de Desreguladores Endócrinos em águas de rede e águas residuais por SPE-UPLC-ESI-MS/MS

Empresa Portuguesa das Águas Livres (EPAL)

Ana Rita Martins de Carvalho

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia do Ambiente

Orientador: Doutor Vítor Vale Cardoso

Co-Orientador: Doutora Elizabeth da Costa Neves Fernandes de Almeida Duarte

Júri:

Presidente: Doutora Maria Teresa Marques Ferreira da Cunha Cardoso, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.


Vogais: Doutora Elizabeth da Costa Neves Fernandes de Almeida Duarte, Professora Catedrática do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Maria Margarida Cabrita Xavier Delgado, Investigadora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor Vítor Vale Cardoso

Lisboa, 2012



*“E todavia imprevisível,
Eterno, Primordial,
Corre o rio do intangível,
Imperioso, Indefinível,
Matriz de tudo, afinal!”*

Ana Vidal

Citado em “A Menina Dança”, de Rita Ferro

Agradecimentos

Ao Doutor Vítor Cardoso, orientador deste trabalho, um especial apreço pela possibilidade da realização da dissertação numa empresa como a EPAL e pela disponibilidade, sugestões, conhecimentos e apoio durante o estágio.

À Professora Doutora Elizabeth de Almeida Duarte, co-orientadora deste trabalho, a mais sincera gratidão por todo o apoio manifestado ao longo de todos os anos de estudo no Instituto Superior de Agronomia, pela disponibilidade, interesse, conselhos, conhecimentos, sugestões e pela presença constante durante a elaboração da dissertação.

Ao Doutor Alexandre Rodrigues, pelos conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade e amabilidade, pela alegria, pelo empenho e pela paciência inesgotável durante o trabalho experimental.

À EPAL, o meu mais profundo agradecimento pelo acolhimento, em particular à Eng^a Maria João Benoiel, diretora do Laboratório Central da EPAL, que permitiu a colaboração com o Instituto Superior de Agronomia, possibilitando assim a elaboração da dissertação apresentada.

À Doutora Elisabete Ferreira, responsável pela Unidade de Análises, pela simpatia, amabilidade e por tornar possível a realização deste trabalho na área laboratorial de Química Orgânica.

A todos os colegas que tive o prazer de conhecer na EPAL. À Doutora Ana, António, Doutora Carina, Cristina, Conceição, Eng^a Luísa, Judite, Dora, um especial apreço pelo ambiente de trabalho, pela camaradagem, pela simpatia, pelo encorajamento e pela forma com que me receberam no meio da sua rotina.

À Charlotte, Marina e Andreia, estagiárias da EPAL, que tornaram a minha presença no laboratório mais feliz, mais leve e menos rotineira. Obrigada pelo apoio, compreensão, ajuda, amizade, gargalhadas, conversas sérias e sugestões.

Às minhas colegas de Mestrado, pelo excelente ambiente que sempre tivemos, pelo convívio e pelas horas de estudo, pela troca de sugestões, por todo o apoio.

Aos meus amigos de sempre, que me acompanharam em todas as etapas importantes do meu percurso académico e que nunca me deixaram sozinha.

Às minhas colegas de casa, Maria João, Maria Eduarda e Ana Paula, a minha segunda família, por toda a paciência, amizade, cumplicidade. Um especial agradecimento à Maria João, minha melhor-amiga, minha confidente, meu porto-de abrigo.

Ao meu irmão, Rui, por ser meu amigo desde sempre, por ser um dos meus pilares e por ser a pessoa com a maior noção de partilha e de amizade.

Aos meus avós, Joaquim e Quitéria, por tudo o que sempre fizeram por mim. Pelo apoio, pelo amor, pelo colo, pela compreensão, pelo orgulho imenso que têm.

Aos meus pais, José e Rosa, por interessarem-se sempre pelo meu trabalho, pelos telefonemas diários, pelo orgulho que têm em mim, por nunca me deixarem faltar nada, por nunca deixarem que desistisse, pelo amor, pelos valores, por quem sou. Este trabalho é vosso.

Resumo

A água é um fator essencial à vida e a sua problemática ambiental é um tema atual e de extrema importância para a saúde humana.

Os desreguladores endócrinos afetam o sistema endócrino, alterando significativamente as funções vitais nos seres vivos. Assim, é essencial proceder-se à monitorização dos sistemas aquáticos para que a exposição e bioacumulação destes compostos seja mitigada.

O objetivo deste trabalho é a monitorização da presença de dez desreguladores endócrinos em 60 amostras de água distribuída pela EPAL e em 24 amostras de águas residuais provenientes de uma estação de tratamento de águas residuais, utilizando um método de análise previamente implementado no laboratório central da empresa.

O método de análise utilizado neste trabalho foi a de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência associada à Espectrometria de massas *tandem* (UPLC-MS/MS), utilizando como técnica de extração a extração em fase sólida (SPE) e como método de ionização a ionização por *electrospray* (ESI).

Os compostos em estudo foram o estriol, bisfenol A, dietilestilbestrol, estrona, estradiol, etinilestradiol, progesterona, octilfenol, mestranol e nonilfenol, tendo sido calculados os limites analíticos para cada composto utilizados na identificação e quantificação dos mesmos nas amostras de água em estudo.

Palavras-Chave: água, desreguladores endócrinos, cromatográfica de ultra resolução, extração em fase sólida, espectrometria de massa *tandem*

Abstract

Water is an essential factor in the life and environmental issues and is a current topic of extreme importance to human health. Endocrine disruptors affect the endocrine system, significantly altering the vital functions in living beings. Thus, it is essential to undertake the monitoring of aquatic systems that exposure to and bioaccumulation of these compounds is mitigated. The objective of this study is to monitor the presence of ten EDC in 60 water samples distributed by EPAL and in 24 samples of wastewater from a treatment plant wastewater, using a method of analysis previously implemented in the company's central laboratory. The analysis method used in this work was to Ultra Performance Liquid Chromatography Efficiency associated with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) using the extraction technique as solid phase extraction (SPE) and as a method of ionization ionization electrospray (ESI). The compounds under study were estriol, bisphenol A, diethylstilbestrol, estrone, estradiol, ethinyl estradiol, progesterone, octylphenol, nonylphenol and mestranol, having the analytical limits calculated for each compound used in the identification and quantification of the same in water samples under study.

Keywords: water, endocrine disruptors, ultra resolution liquid chromatography, solid phase extraction, tandem mass spectrometry

Extended Abstract

Water is a natural resource that occurs in a dynamic cycle of rainfall, runoff and evaporation, suffering variations either in quantity or in quality.

The physical parameters of quality such as turbidity and color were the first focus of attention. However, a great concern has been raised about the presence of some chemicals, catalogued as endocrine disruptors, in water matrix.

Endocrine disruptors compounds (EDC) are characterized by acting like hormones in the endocrine system and disrupt the physiological function of endogenous hormones. Studies have linked endocrine disruptors to adverse biological effects in animals, giving rise to concerns that low-level exposure might cause similar effects in humans. An extensive bibliography has been documented on the presence of EDC and their presence after conventional water treatment facilities.

EDC object of study in this work are naturally occurring (estriol, estrone, estradiol and progesterone) and artificially synthesized (bisphenol A, diethylstilbestrol, ethinyl estradiol, octylphenol, nonylphenol and mestranol).

The occurrence of EDC in the environment arises through point sources or point sources, with the polluting action of these compounds on water manifests itself essentially water quality, making it essential to monitor the presence of these compounds in the aquatic environment.

Given the wide range of chemicals used in society, it is almost certain the presence of EDC in industrial and domestic wastewater. Thus, treatment plants can contain these compounds and the treated effluent can contaminate drinking water, however the most favorable target for decreasing the concentration of EDC in water.

Chromatography can separate compounds from complex mixtures with great precision, benefiting from different adsorption affinities of the components of the mixtures, thus occupying a prominent place among the modern analytical methods.

There are various chromatography techniques, may be classified according to the mechanism of separation phase type, type of surface, among other criteria. However, generally speaking, the operating principle of the LC passes through elution of the mobile phase on a stationary phase (solid or liquid), and the separated solutes according to their interaction with phases with the first eluate which have higher affinity for the mobile phase and later, those with higher affinity for the stationary phase.

The technique of high performance liquid chromatography (HPLC) is a technique which uses LC as solid phase a solid adsorbent through which and by using a high pressure passes the mobile phase and sample.

HPLC equipment consists of a pump, an injector, a chromatographic column, a detector and a data processing system (computer).

The liquid chromatography ultra efficiency (UPLC) received the continuous technological advances in the performance of chemical particles, the optimization of separation systems, types of detectors and data processing and control. In addition to these advances, the technique also gave

improvements in three areas: analysis of speed, resolution and sensitivity using chromatographic particle size of less than 2 μ m, having been developed from the HPLC.

The spectrometry associated with liquid chromatography tandem mass (LC-MS/MS) is the most suitable choice for the analysis of substances that exhibit low volatility and / or thermal instability, since the LC is very effective in the separation of analytes and MS / MS allows for the identification and / or confirmation in trace concentrations.

However, the analysis organic pollutant concentration level vestigial exists beyond the separation step analytical / detection of compounds, the step of sample preparation is critical to the analytical procedure.

The main goal of sample preparation is to concentrate the analytes of interest (lower limits of quantification) and eliminate interferences present in the samples, providing a chromatographic separation free of interfering with an adequate detection and analysis of a reasonable time.

The solid phase extraction (SPE) is a sample preparation technique best reputation in terms of speed and selectivity.

The SPE involves the interaction of a liquid or gaseous sample with a solid phase sorbent or where the analyte is selectively adsorbed on the surface of the solid phase. The solid phase is then separated from the solution and other solvents are added. The first solvent used is intended to remove possible adsorbed matrix components; any one eluting solvent is placed in contact with the sorbent to selectively desorb the analyte.

In more comprehensive SPE procedures include five stages, namely, the choice of filling, the conditioning of adsorbent, sample introduction, cleaning and drying of the column and elution and collection of the analyte.

In this study, 84 were analyzed in water samples network and wastewater by the method of liquid chromatography ultra efficiency associated with tandem mass spectrometry with electrospray ionization and sample preparation by solid phase extraction (SPE-UPLC-ESI -MS/MS), implemented in the laboratory of EPAL, for detection and quantification of 10 EDC study. Subsequently, shows the results of chromatographic analysis and respective discussion thereof, as compared with the analytical limits calculated for each compound.

Índice Geral

1. Capítulo I: Desreguladores Endócrinos	1
1.1. Introdução	1
1.1.1. A Água	1
1.1.2. Preocupação com a qualidade da água: nota histórica	1
1.1.3. Preocupação com a qualidade da água: atualidade	2
1.2. Desreguladores Endócrinos.....	3
1.2.1. Conscientização para o efeito dos compostos emergentes na desregulação do sistema endócrino	3
1.2.2. Sistema endócrino	5
1.2.3. A desregulação endócrina	6
1.2.4. Substâncias com potencial de desregulação endócrina	6
1.2.5. Fontes de EDC no ambiente	9
1.2.6. A desregulação endócrina e a saúde	9
1.2.7. A EPAL	10
1.2.8. A ETAR de Beirolas: Presença de EDC em águas residuais	11
1.3. Legislação	12
1.3.1. Legislação comunitária relativamente aos EDC e qualidade da água.....	12
1.3.2. Legislação nacional relativa à qualidade da água.....	13
1.3.3. Legislação relativa às águas residuais.....	14
2. Capítulo II: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência associada à Espectrometria de massas	15
2.1. Cromatografia Líquida.....	15
2.1.1. Desenvolvimento histórico.....	15
2.1.2. Princípios gerais e classificação dos processos cromatográficos	15
2.1.3. Conceitos teóricos	17
2.1.4. Equipamento de HPLC	20
2.1.5. Funcionamento do HPLC	21
2.2. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)	22
2.2.1. Do HPLC ao UPLC	22
2.2.2. Princípio básico do UPLC e principais vantagens.....	23

2.3. Espectrometria de massa como sistema de detecção	24
2.3.1. Métodos de ionização.....	25
2.3.2. Analisador de massas	25
2.4. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência associada à espectrometria de massas tandem, com ionização em <i>electrospray</i> (UPLC-ESI-MS/MS)	26
2.4.1. Técnica hifenada	26
2.4.2. Espectrometria de massas tandem (MS/MS).....	26
2.4.3. Ionização em <i>electrospray</i> (ESI)	27
2.4.4. Funcionamento da técnica hifenada UPLC-ESI-MS/MS.....	27
3. Capítulo III: Extração em fase sólida (SPE).....	29
3.1. Preparação da amostra: introdução.....	29
3.2. Desenvolvimento histórico da SPE	29
3.3. Princípios Gerais.....	30
3.4. Conceitos teóricos.....	30
3.5. Principais Etapas da SPE	31
3.6. Vantagens da SPE.....	33
3.7. Eficiência da SPE.....	33
4. Capítulo IV: Metodologia de Análise de Amostras de Água	34
4.1. Plano de Amostragem.....	34
4.2. Padrões analíticos.....	34
4.3. Solventes e gases	35
4.4. Preparação de soluções	35
4.5. Material e Equipamentos	37
4.6. Procedimento de Higienização	38
4.7. Preparação das amostras: SPE.....	38
4.8. Ensaio em Branco.....	40
4.9. Ensaio de Recuperação	40
4.10. Análise cromatográfica: condições	40
4.11. Campo de aplicação do método.....	43
5. Capítulo V: Resultados e Discussão	44

5.1. Curva de calibração para cada composto	45
5.2. Cromatograma característico de cada composto	47
5.3. Amostras analisadas	48
5.3.1. Águas da rede da EPAL (N=60)	48
5.3.2. Águas da ETAR de Beirolas (N=24)	56
5.4. Resumo dos resultados da análise das 84 amostras de água	69
6. Capítulo VI: Conclusões e Perspetivas futuras	71
7. Capítulo VII: Referências bibliográficas	73
Anexos	
Anexo I: Identificação das amostras de água de rede da EPAL	xviii
Anexo II: Concentrações de cada composto nos padrões de trabalho utilizados na análise cromatográfica	xx
Anexo III: Concentrações (ng/l) de cada composto nas 60 amostras de água de rede da EPAL	xxi
Anexo IV: Concentrações (ng/l) de cada composto em cada uma das 24 amostras de águas provenientes da ETAR de Beirolas	xxiii

Índice de Figuras

Figura 1.1. - Sistema Endócrino	6
Figura 1.2. - Esquema-tipo do funcionamento de uma ETAR para identificação dos pontos de amostragem	12
Figura 2.1. - Classificação da cromatografia quanto ao tipo de superfície	16
Figura 2.2. - Cromatogramas a ilustrar o tempo de retenção e identificação de compostos	18
Figura 2.3. - Principais zonas analíticas na análise de compostos	20
Figura 2.4. - Equipamento de HPLC.....	20
Figura 2.5. - Curva de Van Deemter, ilustrando a evolução do tamanho das partículas nos últimos 30 anos	23
Figura 2.6. - Componentes básicos de um espectrómetro de massas	24
Figura 2.7. - Triplo quadrupolo MS	28
Figura 3.1. - Etapas gerais da técnica de preparação de amostra em SPE	31
Figura 4.1. - Esquema tipo da filtração a vácuo	38
Figura 4.2. - Equipamento de SPE	39
Figura 4.3. - Equipamento de concentração de amostras (Turbovap)	39
Figura 4.4. - Condições de fluxo e gradiente de bomba	41
Figura 4.5. - Janela de programação do MS Method	41
Figura 4.6. - Condições de operação do espectrómetro de massa - Fonte e analisador	42
Figura 5.1. - Curva de calibração do estriol	45
Figura 5.2. - Curva de calibração do bisfenol A	45
Figura 5.3. - Curva de calibração do dietilestilbestrol.....	45
Figura 5.4. - Curva de calibração da estrona	45
Figura 5.5. - Curva de calibração do estradiol	45
Figura 5.6. - Curva de calibração do etinilestradiol	45
Figura 5.7. - Curva de calibração da progesterona	46
Figura 5.8. - Curva de calibração do octilfenol	46
Figura 5.9. - Curva de calibração do mestranol.....	46

Figura 5.10. - Curva de calibração do estriol	46
Figura 5.11. - Cromatograma característico de cada EDC em estudo	47
Figura 5.12. - Concentrações de estriol em cada uma das 60 amostras de água da rede da EPAL, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho	48
Figura 5.13. - Concentrações de estriol em cada uma das 60 amostras de água da rede da EPAL, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas no S/N.....	49
Figura 5.14. - Concentrações de bisfenol A em cada uma das 60 amostras de água da rede da EPAL, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho	50
Figura 5.15. - Concentrações de bisfenol A em cada uma das 60 amostras de água da rede da EPAL, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas no S/N	50
Figura 5.16. - Concentrações de dietilestilbestrol em cada uma das 60 amostras de água da rede da EPAL, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho	51
Figura 5.17. - Concentrações de estrona em cada uma das 60 amostras de água da rede da EPAL, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho	52
Figura 5.18. - Concentrações de octilfenol em cada uma das 60 amostras de água da rede da EPAL, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho	53
Figura 5.19. - Concentrações de mestranol em cada uma das 60 amostras de água da rede da EPAL, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho	54
Figura 5.20. - Concentrações de nonilfenol em cada uma das 60 amostras de água da rede da EPAL, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho	55
Figura 5.21. - Concentrações de estriol em cada uma das 4 amostras provenientes da estação elevatória, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho.....	56
Figura 5.22. - Concentrações de estriol em cada uma das 4 amostras provenientes do afluente da ETAR, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho.....	57
Figura 5.23. - Concentrações de estriol em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente do desarenador, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho ..	57
Figura 5.24. - Concentrações de estriol em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente da decantação primária, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho	58

Figura 5.25. - Concentrações de bisfenol A em cada uma das 4 amostras provenientes da estação elevatória, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho	59
Figura 5.26. - Concentrações de Bisfenol A em cada uma das 4 amostras provenientes do afluente da ETAR, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na Gama de Trabalho	60
Figura 5.27. - Concentrações de bisfenol A em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente do desarenador, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho	60
Figura 5.28. - Concentrações de bisfenol A em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente da decantação primária, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho	61
Figura 5.29. - Concentrações de bisfenol A em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente da decantação secundária, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho	62
Figura 5.30. - Concentrações de bisfenol A em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente de saída da ETAR, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho	62
Figura 5.31. - Concentrações de mestranol em cada uma das 4 amostras provenientes do afluente da ETAR, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho	64
Figura 5.32. - Concentrações de mestranol em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente de decantação primária, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho	65
Figura 5.33. - Concentrações de mestranol em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente de decantação secundária, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho	65
Figura 5.34. - Concentrações de mestranol em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente de saída da ETAR, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho	66
Figura 5.35. - Concentrações de nonilfenol em cada uma das 4 amostras provenientes da estação elevatória, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho	66

Figura 5.36. - Concentrações de nonilfenol em cada uma das 4 amostras provenientes da do afluente da ETAR, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho	67
Figura 5.37. - Concentrações de nonilfenol em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente do desarenador, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho	67
Figura 5.38. - Concentrações de nonilfenol em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente da decantação primária, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho	68
Figura 5.39. - Concentrações de nonilfenol em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente da decantação secundária, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho	68
Figura 5.40. - Concentrações de nonilfenol em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente de saída da ETAR, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho	69

Índice de Tabelas

Tabela 1.1. – Compostos emergentes que têm sido reportados como substâncias com potencial de ação desreguladora ou desreguladores endócrinos	3
Tabela 1.2. – Evolução dos estudos sobre os EDC.....	4
Tabela 3.1. - Ensaio de recuperação em águas brutas e águas de consumo para os compostos em análise	33
Tabela 4.1. - Concentrações aproximadas das soluções padrão individuais	36
Tabela 4.2. - Concentrações aproximadas de cada composto na solução padrão conjunta	36
Tabela 4.3. - Condições de extração utilizadas em SPE	39
Tabela 4.4. - Condições de concentração do extrato com corrente de azoto (Turbovap).....	39
Tabela 4.5. - Condições de injeção e da coluna cromatográfica	40
Tabela 4.6. - Voltagens de cone utilizadas para a formação do ião precursor para cada composto e energias de colisão aplicadas para formação de iões produto de quantificação e de qualificação	42
Tabela 4.7. - Limite de determinação global do método e gamas de linearidade	43
Tabela 5.1. - Resumo dos resultados da análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS para as amostras de água da rede da EPAL	70
Tabela 5.2. - Resumo dos resultados da análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS para as amostras de água da ETAR de Beirolas	70

Símbolos e Abreviaturas

- Δ_c - Variação da concentração do analito na amostra
- Δ_y - Variação do sinal analítico
- μ ou v - Velocidade da fase móvel
- APCI - Ionização Química à pressão atmosférica*
- BPA -Bisfenol A*
- CCE - Comissão das Comunidades Europeias
- CE - Do Parlamento Europeu e do Conselho
- CI - Ionização Química*
- DBCP - Dibromocloropropano
- DDT - Dicloro-Difenil-Tricloroetano
- DGRN - Direção Geral dos Recursos Naturais
- DQA -Diretiva Quadro de Água
- EDC - Desregulador(es) Endócrino(s)*
- EI - Ionização por Impacto Eletrónico*
- EMARLIS - Empresa Municipal de Águas Residuais de Lisboa
- EPAL - Empresa Portuguesa de Águas Livres
- ESI - Ionização por *Eletrospray**
- ETA - Estação de Tratamento de Água
- ETAR - Estação de Tratamento de Águas Residuais
- EUA - Estados Unidos da América
- FAB - Ionização por Átomos Rápidos*
- FSH - Hormona Foliculoestimulina*
- Full Scan* - Modo de Varrimento Contínuo*
- GC - Cromatografia Gasosa*
- GH - Hormona do crescimento*
- H - Altura equivalente a um prato teórico
- HETP - Altura equivalente a um prato teórico*
- HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/Resolução*
- IEH- Instituto do Ambiente e da Saúde*
- INAG - Instituto da Água
- INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde*
- IPCS - Programa Internacional de Segurança Química*
- L - Comprimento da Coluna Cromatográfica
- LC - Cromatografia Líquida*
- LC-MS - Cromatografia Líquida associada à Espectrometria de massa
- LC-MS/MS - Cromatografia Líquida associada à Espectrometria de massa tandem*
- LD - Limite de Detecção
- LLE - Extração Líquido-Líquido*
- LQ - Limite de Quantificação

LTH - Hormona Luteotrófica*

m/z - razão massa/carga

MALDI - Ionização por Desorção a laser assistida por matriz*

MRM - Monitorização de Reações Múltiplas*

MRM1 - Monitorização de Reações Múltiplas (1ª Transição)*

MRM2 - Monitorização de Reações Múltiplas (2ª Transição)*

MS - Espectrómetro(s) de massa*

MS/MS - Espectrometria de massa tandem ou em série*

n - Número de amostras analisadas

N - Número de pratos teóricos

OCDE - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico*

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPES - Etoxilatos de Octilfenol*

p.a. - pureza analítica

PBDES - Éteres de difenil polibromados*

PCB- Bifenilos Policlorados*

PCDD - Dibenzodioxinas Policloradas*

PCDF - Dibenzofuranos Policlorados*

PCP - Pentaclorofenol*

PFOS - Perfluoro

Q₁ - Primeiro Quadrupolo

Q₂ - Segundo Quadrupolo ou Célula de Colisão

Q₃ - Terceiro Quadrupolo

R: - Natureza dos Riscos específicos atribuídos às substâncias perigosas

r - Coeficiente de Correlação da reta

r² - Coeficiente de Determinação da reta de calibração

REACH - Registo, Avaliação, Autorização e Restrição dos Químicos*

REAP - Regime do Exercício da Atividade Pecuária

R_s - Resolução

S - Sensibilidade

S/N - Razão Sinal/Ruído*

SEPA - Agência de Proteção do Ambiente da Escócia*

S/M - Monitorização Seletiva de Iões*

SPE - Extração em Fase Sólida*

SPE-UPLC-ESI-MS/MS - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência/Resolução associada à Espectrometria de massa tandem, com extração em fase sólida e ionização por Eletrospray*

S_{x0} - Desvio Padrão correspondente a várias leituras do branco ou da solução com concentração mais baixa da gama de linearidade

TOF - Tempo de voo*

TQ - Triplo Quadrupolo

T_R - Tempo-de-Retenção

TSH - Hormona Tirotrópica*

TSP - Ionização por *Termospray**

Turbovap - Equipamento de concentração de amostras com corrente de azoto

UE - União Europeia

UPLC - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência/Resolução*

UPLC-ESI-MS/MS - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência/Resolução associada à Espectrometria de massa tandem, com ionização por *Eletrospray**

US EPA - Agência de Proteção do Ambiente dos EUA*

*Abreviaturas anglicizadas

1. Capítulo I: Desreguladores Endócrinos

1.1. Introdução

1.1.1. A água

A água é um recurso natural essencial à vida, limitado e precioso, cuja simplicidade química parece disfarçar a extrema importância para o desenvolvimento e preservação de todas as formas de vida existentes na Terra (Almeida, 1993).

A procura por água doce tem crescido exponencialmente ao longo dos anos. No entanto, uma variedade de fatores, nomeadamente, o crescimento populacional, a poluição da água, o progresso económico, as alterações nos usos do solo e as alterações climáticas, tornam a água um recurso natural de disponibilidade incerta no futuro (Davies & Simonovic, 2011).

Contrariamente aos recursos estáticos, tais como a terra, a água ocorre num ciclo dinâmico de pluviosidade, escoamento e evaporação, com elevadas variações temporal e espacial, bem como variações na qualidade. Devido a este carácter dinâmico, a água é considerada como um bem valioso quer para as pessoas, quer para os ecossistemas (Rijsberman, 2006). Assim sendo, todas as atividades que desregulem o ciclo hidrológico, que condicionem a quantidade e qualidade da água de forma irreversível, são criminosas e não devem, ou melhor, não podem ocorrer (Direção Geral dos Recursos Naturais (DGRN), 1988).

A proteção do ambiente, e em particular dos recursos hídricos, tem vindo a ser enfatizada ao longo dos tempos. A sua importância para a saúde pública, para a qualidade de vida das populações, para o desenvolvimento regional e local é indiscutível, pelo que tem-se procedido à normalização das regulamentações existentes a nível da comunidade europeia (Portugal, 2004).

De acordo com Portugal (2004), o aumento de resíduos de poluentes orgânicos na água resulta essencialmente da urbanização, do exponencial crescimento populacional, dos processos industriais, do desenvolvimento agrícola e da utilização de uma grande quantidade e variedade de pesticidas e substâncias tóxicas, o que tem provocado um impacto fortemente negativo no ambiente e na saúde pública. Como resultado da crescente preocupação relativamente a esta problemática, surgem os cada vez mais essenciais programas de monitorização da qualidade da água.

1.1.2. Preocupação com a qualidade da água: nota histórica

Em 1831, a Inglaterra foi assolada pela primeira epidemia da Cólera asiática. Esta doença foi vinculada ao transporte marítimo e os resultados foram devastadores, sendo que a primeira grande ocorrência deu-se na aldeia de Upwell (Reino Unido), perto do porto de Wisbeck, com a morte de 60 pessoas de todas as idades e sexos (Newsom, 2006).

Mais tarde, após um período sem ocorrências, a epidemia reapareceu, em 1848 e novamente em 1853. As causas eram desconhecidas e a única certeza era de que a doença provinha do exterior do país. Face a estas incertezas, o Dr. John Snow fez os primeiros estudos relativamente à Cólera,

tendo ficado convencido que esta era uma doença do intestino e que era transmitida de forma fecal-oral (Salvaterra, 2009; Newson, 2006).

Paralelamente aos estudos de Snow, o Dr Semmelweis desenvolveu a primeira abordagem eficiente das doenças transmitidas pela água. Estes estudos, independentes entre si, tiveram como base a morte de cerca de 500 pessoas num curto período de tempo, tendo sido o Dr. Snow a localizar a origem da infeção numa bomba de água manual e a terminar com a propagação da doença. Assim sendo, no século dezanove, a qualidade da água tornou-se o principal foco de atenção das pessoas, ocorrendo a introdução do cloro como agente de desinfecção, de forma a garantir a qualidade bacteriológica da água (Salvaterra, 2009; Newson, 2006).

1.1.3. Preocupação com a qualidade da água: Atualidade

Atualmente, um dos tópicos mais relevantes na química ambiental é, tal como já foi dito, a qualidade da água. O aumento do conhecimento relativo à contaminação da água por substâncias orgânicas levou ao alargamento do número de compostos objeto de estudo. Mais de 2000 contaminantes químicos de todos os tipos foram encontrados na água e cerca de 750 foram identificados na água para consumo humano. Destes, mais de 600 eram substâncias orgânicas, incluindo muitas que são biologicamente ativas (Rios *et al*, 2004; Almeida, 1993).

Segundo Salvaterra (2009), aliado à preocupação com os parâmetros físicos a analisar, surge a preocupação com os parâmetros químicos e, mais recentemente, com a problemática dos micropoluentes – poluentes que estão presentes no ambiente em concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} – a qual tem aumentado expressivamente nos últimos anos. Há, pois, grande interesse científico nos designados “Compostos Emergentes”, que abrangem os novos poluentes no ambiente e que, conseqüentemente, ainda se encontram em fase de estudo, quer ao nível dos seus efeitos adversos na saúde humana, quer no seu impacte ambiental.

Citando Daughton (2005), a lista de compostos emergentes que devem ser considerados como prioritários, para que haja uma mitigação dos efeitos que a sua existência infere ao ambiente, encontra-se em constante atualização, sendo que não é fácil precisar quais e quantos são os produtos que nela constam à luz do conhecimento atual.

Ao longo dos anos, paralelamente com a preocupação relativa à emergência de novos compostos, tem-se verificado uma preocupação acrescida com a ação perturbadora que diversos poluentes orgânicos desencadeiam ao nível do sistema endócrino. A constatação repetida de efeitos nefastos, causados em várias populações da fauna selvagem e até no próprio Homem, foi o ponto de partida para a eclosão mundial de inúmeras pesquisas em busca dos designados Desreguladores Endócrinos (EDC). Estes produtos químicos são descarregados para o meio aquático através de fontes pontuais (tratamento de águas residuais urbanas, agrícolas e industriais) e fontes difusas (Diniz *et al*, 2010; Nogueira, 1999). Na Tabela 1.1. apresentam-se alguns compostos emergentes e a sua potencial ação desreguladora no sistema endócrino.

Tabela 1.1. - Compostos emergentes que têm sido reportados como substâncias com potencial de ação desreguladora ou desreguladores endócrinos (Adaptado de: (Filho,2007)).

Compostos emergentes	Exemplos de substâncias
Pesticidas	Atrazina, lindano, triclosan, dibromocloropropano, pentaclorofenol, trifluralina
Esteróides naturais	Androgénios, estrogénios, fitoestrogénios
Fármacos	Fluoxetina, medetomidina, propranolol, hormonas sintéticas
Produtos químicos industriais	Alquifenóis, bisfenol A, estireno, retardantes de chama bromados (PBDE), surfactantes

1.2. Desreguladores Endócrinos

1.2.1. Conscientização para o efeito dos compostos emergentes na desregulação do sistema endócrino

A qualidade ambiental é a base para a preservação da vida das futuras gerações, sendo a água o recurso essencial à subsistência e estruturação da humanidade. Consequentemente, tornou-se necessário incentivar uma postura que visasse garantir o valor de uso e o valor intrínseco da água.

Durante décadas o ar, o solo e a água foram os receptores involuntários de toneladas de resíduos industriais perigosos, nomeadamente, hidrocarbonetos aromáticos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, hidrocarbonetos halogenados, metais pesados bem como de diversos produtos químicos, como os fertilizantes (Tyler, 1998).

A problemática ambiental, mais concretamente a água como fator essencial à vida, é um tema atual, a nível nacional e internacional. Devido à sua importância na saúde humana, a regulamentação e legislação internacional e nacional que garantem a qualidade da água para consumo humano, tem acompanhado os passos da investigação e tem evoluído de forma a abranger não só a ação dos vários constituintes da água na saúde pública mas também as técnicas analíticas que permitam a sua determinação de forma precisa e inequívoca (Kopplin-Schimitt, 2003).

O desenvolvimento de metodologias analíticas que permitem a identificação e quantificação de resíduos de compostos químicos em concentrações cada vez menores e os dados sobre os seus efeitos biológicos tem, no entanto, chamado a atenção da comunidade científica para novos contaminantes considerados emergentes (Kopplin-Schimitt, 2003).

Nas décadas de 70/80, foram detetados os primeiros efeitos de desregulação endócrina, associados ao dietilestilbestrol. Nesta época, este composto foi sintetizado e utilizado para evitar abortos espontâneos em mulheres e, de forma ilegal, para potenciar o crescimento em bovinos (Boenke *et al*, 2002).

Segundo Kavlock (1999) e Tyler (1998), desde o início dos anos 90 tem havido um crescente interesse no fenómeno de desregulação endócrina devido ao possível efeito adverso que águas contaminadas podem provocar na saúde do Homem e dos animais. Até à data, estes efeitos haviam sido detetados em espécies selvagens com exposições relativamente elevadas para determinados compostos, tais como, organoclorados (por exemplo, Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT) e os seus metabolitos), Bifenilos Policlorados (PCB) e Dioxinas (Dibenzodioxinas Policloradas (PCDD) e

Dibenzofuranos Policlorados (PCDF)) ou em animais domésticos em contato com plantas com elevadas concentrações de fitoestrogénios.

A principal evidência do fenómeno da desregulação endócrina foi relatada pela primeira vez no ano de 1950, na região dos Grandes Lagos (América do Norte e Canadá), onde se verificaram mudanças significativas num grande número de espécies faunísticas (Henriques *et al*, 2010).

Os primeiros desenvolvimentos efetuados na temática da desregulação endócrina, surgiram no seguimento de efeitos documentados ou com presumida função endócrina alterada observados em animais selvagens, ocorrendo sob a forma de feminização de fetos masculinos, disfunções reprodutivas, alterações comportamentais e problemas de desenvolvimento (Henriques *et al*, 2010). Estes efeitos incluem mutações em moluscos expostos a grupos alquilo; indução vitelogénea em peixes em contato com águas residuais; desenvolvimento reprodutivo anormal em jacarés do Lago Apopka (Flórida, EUA), na sequência de um derrame de agrotóxicos; a quase extinção dos recém-nascidos de Truta, no Lago Ontário, presumivelmente devido à exposição a dioxinas; efeitos na casca do ovo em aves expostas ao DDT e aos seus metabolitos; e defeitos no nascimento dos Corvos-Marinheiros expostos a PCB, no Lago Michigan (Chicago, EUA) (Bila & Dezotti, 2007; Kavlock, 1999).

Nos últimos anos, vários organismos internacionais, autoridades nacionais e associações científicas têm compilado toda a documentação disponível sobre a desregulação endócrina e fornecido informação mais objetiva, tal como sugere a Tabela 1.2. (Gelbke *et al*, 2004).

Tabela 1.2. - Evolução dos estudos sobre os EDC (Bila & Dezotti, 2007)

Ano	Organização	Objetivos dos estudos
1995	Agência Ambiental Federal Alemã	Discussão sobre ocorrência e impacto dos DE e riscos potenciais que podem causar aos humanos e outros animais
1995	US EPA	Seminário para avaliar os riscos à saúde e efeitos ambientais dos DE
1995	Ministério do meio ambiente e energia da Dinamarca	Avaliação dos efeitos de substâncias estrogénicas no desenvolvimento e nas funções do sistema reprodutivo masculino
1996	US EPA	Seminário para desenvolvimento de estratégia para avaliar o risco dos DE ao meio ambiente
1996	US EPA	Desenvolvimento de programa de testes e análises (“screening”) para avaliar a ação dos DE
1997	US EPA	Relatório sobre os DE presentes no meio ambiente
1998	US EPA	Revisão e discussão das informações científicas disponíveis sobre os DE
1998	OECD	Desenvolvimento de métodos de ensaio para os DE
1999	CSTEE	Revisão da literatura existente e opinião científica nas evidências dos DE, em particular, avaliação dos riscos ecológicos e diretrizes de ensaios toxicológicos
1999	Comissão das Comunidades Europeias	Identificação do problema dos DE, suas causas, conseqüências e definição das medidas adequadas para dar uma resposta ao problema
2001	Comissão das Comunidades Europeias	Primeiro relatório sobre o progresso dos trabalhos da comunidade europeia sobre os DE
2002	Comissão das Comunidades Europeias	Programa COMPREHEND: Avaliação das evidências dos DE no ambiente aquático na Europa
2002	OECD	Avaliação dos métodos de ensaios para as substâncias estrogénicas
2002	WHO	Avaliação global do estado da arte da ciência dos DE
2003	IEH	Relatório de avaliação do progresso internacional da pesquisa dos DE
2004	Comissão das Comunidades Europeias	Segundo relatório sobre o progresso dos trabalhos sobre os DE

Na União Europeia, no âmbito da Diretiva Quadro da Água (DQA), foram identificados 33 poluentes considerados prioritários, existindo ainda uma proposta de outros xenobióticos para o mesmo efeito. Como consequência, os estados-membros têm à sua responsabilidade o

estabelecimento de programas de monitorização para um determinado número de poluentes prioritários e emergentes (Belgiorno *et al*, 2007).

De acordo com Belgiorno *et al* (2007), as substâncias que são identificadas como prioritárias na DQA caracterizam-se pela elevada toxicidade, elevada persistência ambiental, elevada afinidade com substâncias apolares (lipofílicas), conduzindo à bioacumulação em cadeias alimentares, colocando em risco a saúde humana e ambiental. De fato, muitas destas substâncias já foram comprovadas como sendo EDC ou com potencial para o ser, uma vez que pertencem a uma vasta gama de químicos naturais ou sintéticos que interferem com o normal funcionamento do sistema endócrino.

Um EDC é definido pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US EPA, 2011) como um xenobiótico (substância estranha ao organismo) que interfere com a síntese, secreção, transporte, ação, ligação ou eliminação de hormonas naturais nos organismos vivos, responsáveis pela manutenção da sua homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento (Belgiorno *et al*, 2007).

A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE) define ainda um EDC como sendo uma substância ou mistura de substâncias exógenas que alteram as funções do sistema endócrino, causando efeitos adversos na saúde de um organismo vivo, na sua progenia ou em (sub) populações (Bars *et al*, 2011).

1.2.2. Sistema Endócrino

O sistema endócrino é constituído por uma complexa rede de sinais e mensagens químicas que controla as funções e reações corporais em quase todos os animais, vertebrados e invertebrados, interagindo diretamente com o sistema nervoso (Fauci *et al*, 2008).

O mecanismo que aciona o sistema endócrino inicia-se na reação das células nervosas a determinado estímulo (ex.: fome, medo ou a alteração da temperatura corporal), enviando posteriormente um sinal às glândulas endócrinas (Fauci *et al*, 2008).

Por sua vez, as glândulas endócrinas libertam as hormonas adequadas que irão conduzir as instruções para as células-alvo. Aqui, essas instruções ligar-se-ão a receptores específicos, localizados no núcleo das células. Após a ligação, o recetor interpreta a mensagem hormonal e faz a tradução da mesma, ocorrendo um dos seguintes processos celulares: ou ordena a síntese de novas proteínas ou a alteração de proteínas já existentes na célula. (Fauci *et al*, 2008)

Em suma, o sistema endócrino é constituído por um conjunto de glândulas, como a tiróide, as gónadas e as glândulas supra-renais, e pelas hormonas que elas produzem, como a tiroxina, os estrogénios, a testosterona e a adrenalina, que ajudam a guiar o desenvolvimento, o crescimento, a reprodução e o comportamento dos animais, incluindo os seres humanos. As hormonas são moléculas de sinalização, que percorrem a corrente sanguínea e suscitam respostas noutras partes do corpo (CCE, 1999), tal como o esquematizado na Figura 1.1..

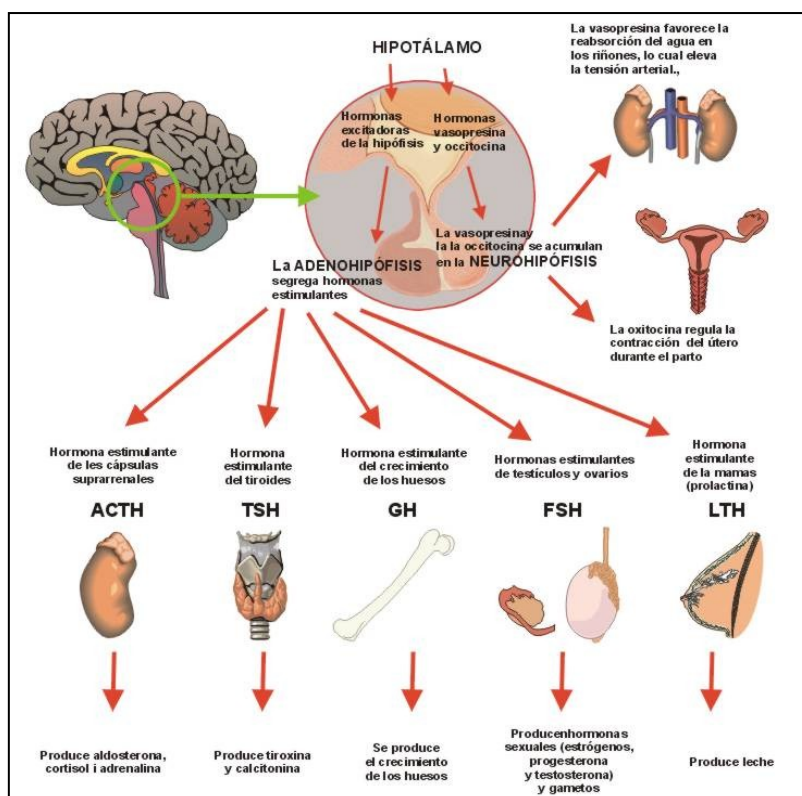


Figura 1.1. - Sistema Endócrino (Jimeno, 2006)

1.2.3. A Desregulação Endócrina

Originalmente, a apreensão relativamente à desregulação endócrina baseava-se exclusivamente em efeitos perceptíveis no sistema reprodutivo. Mais tarde, concluiu-se que os desreguladores endócrinos afetavam muito para além do sistema reprodutivo, interagindo não só com as hormonas sexuais mas com todas as outras hormonas recetoras características do sistema endócrino (Acosta *et al*, 2005).

Os desreguladores endócrinos afetam o sistema endócrino e, conseqüentemente, as funções vitais nos seres vivos, imitando, bloqueando ou provocando o colapso das hormonas esteróides, sendo o mecanismo para esta desregulação complexo e diversificado (Acosta *et al*, 2005).

A alteração ou desregulação da função endócrina pode estar associada a interferências na síntese, secreção, transporte, ligação e ação ou eliminação das hormonas naturais do organismo, conduzindo a uma nova resposta hormonal, fraca ou forte, que resulta num sinal inexacto para o recetor (Nogueira, 1999).

Neste contexto, dado o caráter por vezes imprevisível deste tipo de compostos, é imperativo o alerta para os potenciais riscos associados à exposição e bioacumulação dos mesmos. É igualmente importante a monitorização dos sistemas aquáticos, principais veículos de dispersão ambiental, assim como uma monitorização periódica da água destinada ao consumo humano .

1.2.4. Substâncias com potencial de desregulação endócrina

O grupo de substâncias que podem ter potencial de desregulação endócrina são produtos químicos com atividade hormonal e incluem compostos sintéticos ou naturais (Henriques *et al*, 2010).

De acordo com Henriques *et al* (2010), os compostos sintéticos englobam uma grande variedade de produtos, tais como, produtos farmacêuticos (incluindo hormonas sintéticas), pesticidas (como o DDT, Dieldrina, Lindano e Atrazina), produtos industriais (como PCB, ftalatos, bisfenol A (BPA) e alquilfenóis) e o seu tratamento por sub-produtos (como as dioxinas e os furanos). Alguns destes produtos industriais são utilizados em materiais de embalagem de alimentos (como plastificantes), tubagens de água, revestimentos de reservatórios de água, produtos de higiene pessoal e na limpeza e desinfeção de produtos químicos.

As hormonas naturais, cujo aparecimento na água pode dever-se simplesmente ao processo de excreção natural em todas as espécies de mamíferos, podem provir de efluentes domésticos, agrícolas e industriais que são descarregados constantemente no meio recetor natural (Henriques *et al*, 2010).

Os estrogénios e os progestagénios são hormonas dotadas de numerosas ações fisiológicas. Nas mulheres, estas hormonas influenciam o desenvolvimento, o controlo da ovulação, a preparação do ciclo reprodutor para a fertilização e implantação dos óvulos, bem como aspetos fisiológicos do metabolismo de minerais, glúcidos, prótidos e lípidos. Nos homens, os estrogénios têm ações relevantes sobre os ossos, espermatogénese e no comportamento (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde (INFARMED), 2011).

Segundo o INFARMED (2011), o uso terapêutico mais comum dos estrogénios e progestagénios é o tratamento da menopausa através da terapêutica hormonal de substituição e na contraceção, mas os componentes específicos e as doses usadas são muito diversas nas duas situações.

A maior parte dos EDC são produtos químicos orgânicos sintéticos (xenobióticos), introduzidos no ambiente pelas atividades antropogénicas. Contudo, hormonas estrogénicas podem ser produzidas naturalmente e conseqüentemente encontram-se presentes em ambientes aquáticos receptores de águas residuais efluentes (Belgiorno *et al*, 2007).

No presente trabalho, os EDC que serão objeto de monitorização são: Estriol, Bisfenol A, Dietilestilbestrol, Estrona, β -Estradiol, Etinilestradiol, Progesterona, Octilfenol, Mestranol e Nonilfenol.

a) Estriol

O estriol é um dos três principais estrogénios de ocorrência natural e é sintetizado em grandes quantidades durante a gravidez, a partir da aromatização placentária de hormonas fetais de origem supra-renal, apresentando um potencial estrogénico inferior ao do estradiol e da estrona (Soares *et al*, 2002).

b) Bisfenol A

O BPA é uma substância química orgânica utilizada na produção de resinas epóxido e de plásticos à base de policarbonato, para aplicações domésticas e industriais. Assim sendo, é comum aparecer nas águas residuais industriais (Diniz *et al*, 2010).

Segundo Diniz *et al* (2010), o BPA tem potência estrogénica, podendo provocar alterações adversas no sistema reprodutivo e na fecundidade de animais e humanos.

c) Dietilestilbestrol

O Dietilestilbestrol é um estrogénio sintético não-esteróide, utilizado, entre outras aplicações, no tratamento da insuficiência ovárica (amenorreia, perturbações da menopausa) e do cancro da próstata (INFARMED, 2011).

d) Estrona

A Estrona é um dos três principais estrogénios, juntamente com o Estradiol e o Estriol, sendo mais potente que este último e é produzida primeiramente a partir da androstenediona, que tem origem nas gónadas e córtex adrenal, e apresenta baixa atividade biológica quando comparada com o Estradiol e é o principal estrogénio circulante após a menopausa (Faculdade de Farmácia do Porto, 2007).

e) β - Estradiol

Segundo Soares *et al* (2002), o Estradiol é o estrogénio mais ativo e importante na mulher em idade reprodutiva. É também produzido pelas glândulas adrenais, testículos e pela conversão periférica da testosterona, sendo responsável pelo desenvolvimento de características sexuais femininas secundárias.

f) Etinilestradiol

O Etinilestradiol é o principal estrogénio sintético desenvolvido para uso médico em terapias de reposição e métodos contraceptivos, podendo ser até dez vezes mais potente que o estradiol (Batista *et al*, 2011).

g) Progesterona

A Progesterona é uma hormona esteróide que se forma nos ovários e é segregada pelo corpo lúteo. A principal função desta hormona passa pelo espessamento e desenvolvimento do endométrio, essencial à implantação e desenvolvimento do ovo fecundado (SEPA, 2006).

h) Octilfenol

O Octilfenol é um composto sintético que pertence a um grupo mais abrangente, os Etoxilatos de Octilfenol (OPES). Estes são extremamente tóxicos para os organismos dos animais, particularmente os que vivem no meio aquático, tendo também um comportamento preocupante enquanto desregulador endócrino no organismo animal. Estes compostos, quando se apresentam na forma de Octilfenol, tornam-se ainda mais prejudiciais e persistentes no ambiente (Agência Escocesa de Proteção do Ambiente (SEPA, 2006).

i) Mestranol

O Mestranol é um composto sintetizado artificialmente e que contém uma combinação de hormonas femininas que impedem a ovulação, sendo conseqüentemente utilizado como contraceção para evitar a gravidez, entre outros fins, tendo por isso potencial de desregulação endócrina (Ngamniyom *et al*, 2012).

j) Nonilfenol

O Nonilfenol surge pela utilização dos respetivos etoxilatos como surfatantes numa variedade de aplicações, incluindo detergentes industriais e domésticos, lubrificantes, emulsificantes e encontram-se presentes em formulações de pesticidas, de tintas e de produtos de higiene pessoal. As possíveis rotas de entrada desta substância no ambiente ocorrem durante a sua produção, uso e eliminação (Bila & Dezotti, 2007).

Este composto é de natureza orgânica e tem origem sintética artificial (xenobiótico), formando-se durante o processo de alquilação de fenóis, particularmente na síntese de detergentes polietoxilatos (Staples *et al*, 2008).

1.2.5. Fontes de EDC no ambiente

A ação da poluição sobre os recursos hídricos não se manifesta na quantidade mas sim na qualidade desta, condicionando a sua utilização nos setores doméstico, agrícola e industrial (Bila & Dezotti, 2007).

Os EDC surgem no ambiente através de fontes pontuais ou de fontes difusas. A poluição por fontes pontuais tem solução relativamente fácil, pois são facilmente identificadas e diagnosticadas e, assim sendo, podem ser aplicadas medidas de controlo. Estas fontes são geralmente associadas a descargas de efluentes de estações de tratamento, estações de tratamento de águas residuais (ETAR), fossas sépticas e ao próprio esgoto bruto (Salvaterra, 2009).

De acordo com Salvaterra (2009), a poluição de origem difusa não é facilmente detetável, uma vez que resulta da atividade humana mais dispersa, ocorrendo em áreas extensas, chegando à água através da chuva e escoamento desta.

Os efeitos dos EDC no ambiente não dependem somente das suas concentrações mas também de outros fatores, tais como, lipofilia, persistência, bioacumulação, tempo de exposição, mecanismos de biotransformação e de excreção, entre outros (Bila & Dezotti, 2007).

Citando Bila & Dezotti (2007), a monitorização da presença de EDC no meio recetor natural tem sido implementada numa variada gama de estudos por todo o mundo. No ambiente aquático, essas substâncias podem ser detetadas nas águas superficiais e subterrâneas, sedimentos marinhos, solo, efluentes e lamas biológicas das ETAR e, ainda, na água potável, sendo continuamente introduzidas no ambiente em concentrações detetáveis, podendo afetar significativamente a qualidade da água, a saúde dos ecossistemas e, potencialmente, potenciar a escassez de água para consumo.

1.2.6. A desregulação endócrina e a saúde

De acordo com a Comissão das Comunidades Europeias (CCE) (1999), pensa-se que os desreguladores endócrinos interferem com o funcionamento deste sistema complexo pelo menos de três formas possíveis:

- ✓ Imitando a ação de uma hormona produzida naturalmente, como o estrogénio ou a testosterona, e desencadeando deste modo reações químicas semelhantes no corpo;
- ✓ Bloqueando os receptores nas células que recebem as hormonas (receptores hormonais), impedindo assim a ação das hormonas normais; ou

✓ Modificando a síntese, o transporte, o metabolismo e a excreção das hormonas, alterando dessa forma as concentrações de hormonas naturais.

Tendo como principais consequências alterações ao nível do crescimento, desenvolvimento, reprodução e até mesmo ao nível comportamental, sendo os efeitos desreguladores bastante variáveis, quer pela sua composição, quer pela composição do organismo (CCE, 1999).

Seguindo esta linha de raciocínio, de acordo com Bila e Dezotti (2007), vários estudos relacionam a poluição ambiental das águas com anomalias no sistema reprodutivo e no desenvolvimento de espécies de animais.

A exposição a EDC pode ocorrer sob diferentes formas, seja através do contato direto no local de trabalho ou em casa ou através do contato indireto pela ingestão de água, ar ou alimentos contaminados e pelo contato com o solo. Uma das maiores exposições da população aos EDC é através da ingestão de alimentos contaminados, estimando-se que no ser-humano, cerca de 90% destas substâncias são absorvidas por via digestiva (Salvaterra, 2009; Bila & Dezotti, 2007).

De acordo com Salvaterra (2009) e Bila & Dezotti (2007), os efeitos dos EDC têm sido observados em moluscos, peixes, répteis, aves e mamíferos.

1.2.7. A EPAL

A Empresa Portuguesa de Águas Livres, S.A. (EPAL) é a maior empresa de abastecimento de água potável em Portugal, sendo responsável pela produção, transporte e distribuição de água (Penetra *et al*, 2010).

O sistema de abastecimento da EPAL desenvolve-se desde a albufeira de Castelo do Bode até à cidade de Lisboa, numa extensão superior a 2 100 Km, integrando o sistema de produção e transporte e o sistema de distribuição (EPAL, 2011).

De um modo global, o sistema de produção e transporte é responsável pela captação, tratamento e transporte da água e compreende 3 captações superficiais, 23 subterrâneas, cerca de 700 Km de adutores, 2 estações de tratamento e 31 estações elevatórias (EPAL, 2011).

O sistema de distribuição é responsável pela gestão e exploração da rede geral de distribuição, com mais de 1 400 Km, sendo constituído por 14 reservatórios, 10 estações elevatórias e mais de 83 mil ramais de ligação aos prédios, proporcionando o abastecimento domiciliário (EPAL, 2011).

De acordo com Penetra *et al* (2010), o sistema de produção convencional inclui duas estações de tratamento de água (ETA), a da Asseiceira e a de Vale da Pedra. Estas são responsáveis pela captação e tratamento de águas superficiais provenientes da barragem de Castelo do Bode e do rio Tejo, respetivamente.

Na ETA da Asseiceira estão instaladas 2 linhas distintas de tratamento que compreendem as seguintes operações unitárias: uma pré - cloragem (se necessário), correção de agressividade e remineralização, coagulação, floculação, flotação por ar dissolvido, ozonização, filtração (de dupla camada – areia e antracite - na linha 1 e de monocamada - areia - na linha 2), ajuste de pH e desinfecção final (pós-cloragem), de modo a garantir um residual de cloro na água aduzida e na

distribuição em alta. A água à saída da ETA consiste numa mistura de águas tratadas nas duas linhas de tratamento (Penetra *et al*, 2010).

A ETA de Vale da Pedra possui uma linha de tratamento que inclui pré-cloragem, condicionamento de pH e remineralização, coagulação, floculação, decantação, filtração (monocamada – areia), correção de pH da água tratada e desinfecção final (pós-cloragem) que permite estabelecer um residual de cloro na água aduzida (Penetra *et al*, 2010).

1.2.8. A ETAR de Beirolas: a presença de EDC em águas residuais

A vasta gama de produtos químicos orgânicos utilizados na sociedade moderna induz a presença quase certa de determinados compostos nas águas residuais industriais e domésticas. Estes compostos, sem o devido tratamento, podem resultar na exposição dos seres humanos e do ambiente a efeitos adversos (Belgiorno *et al*, 2006).

De acordo com o Decreto-Lei nº 152/97, de 19 de Junho, a classificação das águas residuais é feita com base na origem das mesmas. Assim sendo, classificam-se em:

Águas residuais urbanas: águas residuais domésticas ou a mistura de águas residuais domésticas com águas residuais industriais e/ou águas de escoamento pluvial; Águas residuais domésticas: águas residuais de serviços e instalações residenciais e essencialmente provenientes do metabolismo humano e de atividades domésticas;

Águas residuais industriais: todas as águas residuais provenientes de instalações utilizadas para todo o tipo de comércio ou indústria que não sejam de origem doméstica ou de escoamento pluvial.

A estrutura química de um dado composto influencia a sua taxa de degradação e remoção num dado sistema de tratamento. Assim sendo, o destino final destes compostos varia com a natureza dos mesmos (Leite *et al*, 2010).

De acordo com Leite *et al* (2010), as ETAR podem conter uma grande variedade de compostos de natureza orgânica, como os EDC, pelo que os efluentes tratados e descarregados no meio hídrico podem posteriormente contaminar a água potável. Assim, ao longo dos anos foram surgindo inúmeros estudos, principalmente na Europa e EUA, que comprovam que os EDC não são totalmente removidos durante o processo convencional de tratamento de águas residuais.

Os compostos Etinilestradiol e Estradiol foram identificados ao longo de várias investigações como os compostos orgânicos com maior contribuição para o potencial estrogénico dos efluentes das ETAR. Esta constatação pode ser justificada pela origem dos ditos compostos, que são maioritariamente expelidos do organismo humano pela urina e fezes (Chambel, 2011).

Atualmente, os efluentes que contenham compostos com potencial estrogénico devem ser direcionados para as ETAR. Estas, ainda que não sejam totalmente eficazes na sua remoção, continuam a ser o destino mais favorável para a diminuição da concentração destes tipos de compostos nas águas (Chambel, 2011).

A ETAR de Beirolas é uma das três ETAR inseridas no Sistema de Tratamento de Águas Residuais de Lisboa, cuja exploração e gestão é da competência da Empresa Municipal de Águas Residuais de Lisboa (EMARLIS) e dispõe de duas linhas de tratamento, tendo capacidade de tratar as águas residuais de uma população equivalente a 213.500 habitantes (Figueiredo, 2001).

Do conjunto de órgãos em funcionamento na ETAR de Beirolas, foram escolhidos enquanto pontos de amostragem uma estação elevatória, o afluente de entrada na ETAR, o efluente de saída do desarenador, o efluente de saída dos decantadores (primário e secundário) e ainda o efluente de saída da ETAR, tal como o esquematizado na Figura 1.2..



Figura 1.2. – Esquema-tipo do funcionamento de uma ETAR para identificação dos pontos de amostragem. (Adaptado de: (Rosa, 2008))

1.3. Legislação

Atualmente, a satisfação das necessidades de água levanta sérios problemas às Entidades Reguladoras. Adicionalmente às elevadas quantidades de água exigidas, algumas das utilizações prejudicam fortemente a qualidade da água que, se restituída aos meios naturais sem tratamento prévio, para além de não poder ser utilizada, é nociva ao próprio ecossistema. O impacto negativo do uso intensivo de substâncias, tais como pesticidas, fármacos, produtos industriais, entre outros, é cada vez maior na qualidade dos recursos hídricos (Gaffney, 2011),

Por razões de saúde pública, a Organização Mundial de Saúde (OMS), a União Europeia (UE) e a própria legislação portuguesa, estabeleceram normas relativamente à qualidade da água para consumo humano. Estas normas obrigam a que esta água obedeça a um conjunto de características e recomendações (Salvaterra, 2009).

1.3.1. Legislação Comunitária relativamente aos EDC e qualidade da água

Para esclarecer, desenvolver estratégias e solucionar o problema dos desreguladores endócrinos, várias organizações governamentais e não-governamentais, como a UE, EPA, OMS, Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) e a OCDE, investigaram a questão dos EDC (Bila & Dezotti, 2007).

Em termos de legislação comunitária aplicável ao meio aquático, a Diretiva 2000/60/CE de 23 de Outubro, estabelece um quadro de ação comunitária no domínio da política da água, sendo por isso designada por Diretiva Quadro da Água (DQA). Esta estabelece uma abordagem abrangente e integrada de proteção e gestão da água, com um objetivo a médio prazo de que a globalidade das águas atinja um nível de qualidade bom até 2015.

A transposição da DQA para o direito nacional é assegurada pela Lei nº 78/2005, de 29 de Dezembro, e pelo Decreto-Lei nº 77/2006, de 30 de Março, que estabelecem as bases para a gestão sustentável das águas e definem o novo quadro institucional para o setor.

A DQA cria um quadro jurídico para proteger e restaurar o bom estado da água em toda a UE e assegurar a sua utilização sustentável e a longo prazo, adotando uma abordagem inovadora de gestão da água, com base nas bacias hidrográficas e unidades geográficas e hidrológicas naturais, e

estipula prazos específicos para os Estados-Membros protegerem os ecossistemas aquáticos (Instituto da Água (INAG), 2012).

No sentido de tentar resolver o problema das cerca de 100 000 substâncias que circulam no mercado Europeu sem uma correta avaliação dos seus riscos, a UE propôs e acabou por aprovar, no final de 2006, o Regulamento REACH - Registo, Avaliação, Autorização e Restrição dos Químicos. Este regulamento visa o controlo das substâncias químicas contidas em produtos, visando reduzir a contaminação das massas de água (Regulamento N° 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 18 de Dezembro).

A Diretiva 91/414/CE, na qual existe a norma 80/778/CE relativa às águas de consumo humano, estipula que a concentração máxima de cada pesticida deverá ser de 0,1 µg/l, nunca ultrapassando o total de 0,5 µg/l.

A Diretiva 98/8/CE, de 16 de Fevereiro, regulamenta a colocação de produtos biocidas no mercado a fim de assegurar um elevado nível de proteção para o Homem e o ambiente e o bom funcionamento do mercado.

A Diretiva dos Nitratos (Diretiva 2006/118/CE) limita a poluição dos compostos de azoto contidos nos fertilizantes e no estrume.

Na conceção de medidas destinadas a controlar a poluição química com origem em todas estas fontes, a DQA adota uma abordagem combinada: considera a poluição em termos do que é libertado para o ambiente e da resiliência das águas recetoras (INAG, 2012).

1.3.2. Legislação Nacional relativa à qualidade da água

O Decreto-Lei 236/98 de 1 de Agosto estabelece as normas, critérios e objetivos da qualidade tendo em vista a proteção do meio aquático através da melhoria da qualidade das águas em função dos seus principais usos. É aplicável a águas doces superficiais e subterrâneas destinadas à produção de água para consumo humano. É uma transposição da Directiva 75/440/CE, do Conselho, de 16 de Junho, relativa à qualidade das águas doces superficiais destinadas à produção de água para consumo humano, e a Directiva 79/869/CE, do Conselho, de 9 de Outubro, relativa aos métodos analíticos e à frequência das amostragens e da análise das águas superficiais destinadas à produção de água para consumo humano.

O Decreto-Lei 103/2010, de 24 de Setembro, que revoga o Decreto-Lei 236/98 no que diz respeito a alguns parâmetros das águas superficiais, como cádmio, chumbo, hidrocarbonetos dissolvidos, entre outros, estipula que a norma de qualidade ambiental para as substâncias prioritárias nonilfenol e octilfenol é, respetivamente, 0,30 µg/l e 0,10 µg/l.

Deve ser tida em conta também a Decisão nº 2455/2001/CE, de 20 de Novembro, que estabelece a lista das substâncias prioritárias no domínio da política da água e que altera a Diretiva 2000/60/CE, de 23 de Outubro e que estabelece um quadro de ação comunitária no domínio da política da água.

A Diretiva 98/83/CE, de 3 de Novembro, tem como objetivo proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes de qualquer contaminação da água destinada ao consumo humano, assegurando a sua salubridade e limpeza.

O Decreto-Lei 243/2001, de 5 de Setembro, regula a qualidade da água destinada ao consumo humano e transpõe a Diretiva 98/83/CE, referida anteriormente

O Decreto-Lei 306/2007, de 27 de Agosto, regula a qualidade da água para consumo humano e corresponde à revisão do Decreto-Lei 243/2001, de 5 de Setembro.

1.3.3. Legislação relativa às águas residuais

O Decreto Regulamentar 23/95, de 23 de Agosto, visa o regulamento geral de Sistemas Públicos e Prediais de Distribuição de água e drenagem de águas residuais.

Relativamente às unidades agro-pecuárias, o Decreto-Lei 214/2008, de 10 de Novembro, estabelece o regime de exercício da atividade pecuária (REAP).

Ao nível das unidades industriais, a Portaria 809/90, de 10 de Setembro, estabelece normas de descarga de águas residuais aplicadas aos matadouros e unidades de processamento de carnes; a Portaria 512/92, de 22 de Junho, estabelece normas de descarga de águas residuais aplicadas a unidades industriais de Curtumes; a Portaria 1030/93, de 14 de Outubro, estabelece normas de descarga de águas residuais aplicadas aos estabelecimentos industriais que procedam a tratamentos e revestimentos eletrolíticos, tratamentos e revestimentos químicos, tratamentos térmicos em banhos de sais fundidos e decapagem, desengorduramento e preparação de superfícies; o Despacho Conjunto 118/2000, de 3 de Fevereiro, emite o programa para aplicação de medidas de modernização ambiental no setor dos lagares de azeite; e o Despacho Conjunto 626/2000, de 6 de Junho, estabelece normas para a utilização de águas residuais na rega de solos agrícolas.

No que diz respeito às águas residuais urbanas, o Decreto-Lei 152/97, de 19 de Junho, transpõe a Diretiva 91/271/CEE, relativa ao tratamento de águas residuais urbanas; o Decreto-Lei 348/98, de 9 de Novembro, altera o Decreto-Lei 152/97 - Anexo I, artigo 2º; o Decreto-Lei 149/2004, de 22 de Junho, altera o Decreto-Lei 152/97; e o Decreto-Lei 198/2008, de 8 de Outubro, altera o Decreto-Lei 152/97.

2. Capítulo II: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência associada à Espectrometria de Massa

A cromatografia é um processo de separação muito especial, na medida em que permite separar compostos de misturas complexas com grande precisão (Mota *et al*, 2004), através das diferentes afinidades de adsorção dos componentes das misturas. Os processos de separação cromatográfica são extremamente poderosos quando as exigências de resolução e pureza são elevadas (Klatt *et al*, 2000).

A cromatografia ocupa um lugar de destaque entre os métodos analíticos modernos, podendo ser utilizada isoladamente ou acoplando as suas potencialidades com outras técnicas instrumentais de análise (Rutz, 2009).

2.1. Cromatografia Líquida

2.1.1. Desenvolvimento Histórico

A descoberta da cromatografia enquanto método de separação deu-se no século passado, em 1903, e é creditada ao botânico russo Mikhail Semenovich Tswett (Engelhardt, 2004).

De acordo com Engelhardt (2004), Tswett desenvolveu vários trabalhos experimentais no domínio da separação de extratos de plantas por adsorção diferencial em colunas, utilizando carbonato de cálcio como fase estacionária e disulfureto de carbono como eluente. Nestas experiências verificou-se a formação de bandas de cores diferentes nas colunas utilizadas devido à adsorção diferencial dos pigmentos corados, que percolavam com velocidades diferentes e emergiam separadamente da coluna.

O nome de Tswett está associado não só à descoberta da cromatografia enquanto método de separação mas também à invenção do próprio termo em si. No seguimento da separação dos pigmentos numa série de bandas coloridas, surge o nome cromatografia, resultante da junção dos termos gregos “*chroma*” (=cor) e “*graphein*” (=escrita) (Abraham, 2004).

A aplicação da técnica de Tswett, atualmente descrita como cromatografia de fase normal (NP), demonstrou-se pouco viável quando os analitos solúveis da água tinham de ser separados. Esta particularidade impôs a necessidade de se desenvolver a cromatografia de partição ou cromatografia líquido-líquido ou cromatografia líquida (LC), responsabilidade de Martin e Synge, no ano de 1941 (Engelhardt, 2004). Contudo, de acordo com Engelhardt (2004), esta técnica foi antecipada pela cromatografia gasosa (GC) e só em 1952 foi finalmente introduzida.

2.1.2. Princípios Gerais e Classificação dos processos cromatográficos

Define-se por Cromatografia o processo de separação de componentes de uma amostra pela sua distribuição entre um fluido corrente (fase móvel) e um adsorvente (fase estacionária) (Mota *et al*, 2004).

Citando Rutz (2009), esta técnica analítica tem como princípio básico o deslocamento diferencial dos componentes de uma mistura, de acordo com as diferentes interações entre duas fases

imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionário. Assim sendo, trata-se de um método físico-químico que se baseia no equilíbrio estabelecido entre a fase móvel e a fase estacionária (Mota *et al*, 2004).

Existem várias técnicas cromatográficas (Figura 2.1.), que vão das mais simples como a cromatografia de coluna em camada fina até às mais sofisticadas e computadorizadas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Klatt *et al*, 2000). Esta variedade resulta dos diferentes critérios de classificação empregues, nomeadamente, o mecanismo de separação, técnica eleita, tipo de fase utilizada e o tipo de superfície na qual ocorre a separação. Contudo, o critério mais utilizado é este último (Rutz, 2009).

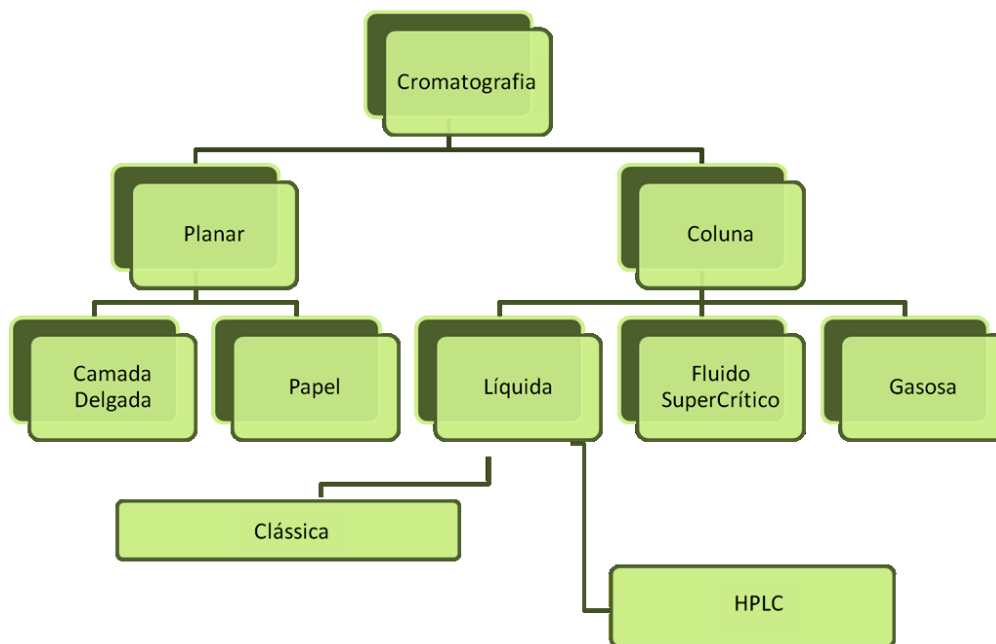


Figura 2.1. - Classificação da cromatografia quanto ao tipo de superfície. (Rutz, 2009)

A cromatografia em coluna divide-se em cromatografia gasosa, cromatografia com fluido supercrítico e cromatografia líquida (LC), podendo esta última ser classificada em cromatografia líquida clássica, cromatografia líquida de alta resolução e, mais recentemente, Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) (Rutz, 2009).

As técnicas de separação por LC oferecem um enorme poder de resolução, deteção, quantificação, bem como uma grande rapidez e aplicabilidade a diferentes tipos de amostras (Rutz, 2009), sendo a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC) a técnica utilizada neste trabalho.

De um modo geral, a fase estacionária utilizada na LC, como na GC, pode ser um sólido ou um líquido e como fase móvel utiliza-se um líquido no qual o soluto está dissolvido. Assim sendo, enquanto a fase móvel elui sobre a fase estacionária, os solutos são separados de acordo com a interação destes com as fases, sendo eluído primeiro os que têm maior afinidade com a fase móvel e posteriormente os que têm maior afinidade com a fase estacionária (Scott, 2003).

Existem vários tipos de cromatografia líquida, sendo a sua classificação função do tipo de fase estacionária adotada. Esta escolha é feita de acordo com o tipo de composto que pretendemos

separar. Assim, e tendo em conta que a fase móvel será sempre um líquido de baixa viscosidade, se a fase estacionária for um adsorvente sólido através do qual e por recurso a uma alta pressão se faz passar a fase móvel e a amostra, temos a HPLC (Scott, 2003).

2.1.3. Conceitos Teóricos

Quando a técnica de LC é abordada, é essencial conhecer-se determinados conceitos teóricos, indispensáveis ao entendimento de toda a técnica de análise cromatográfica.

- **Precisão**

A precisão é um termo teórico cujo objetivo é avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, realizados sob condições definidas e sobre a mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões. Esta dispersão é avaliada através do mínimo, valor intermédio e máximo da variabilidade dos resultados, que correspondem, respetivamente, à repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade do método (Acúrcio, 2007).

- **Exatidão**

A exatidão de um método de ensaio define-se como a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro e pode ser avaliada através de materiais de referência certificados, ensaios interlaboratoriais e testes comparativos (Acúrcio, 2007).

- **Resolução**

Considera-se que a resolução de um determinado método cromatográfico corresponde ao poder de separação de todo o sistema cromatográfico em relação a determinados componentes da mistura em análise (Marcos, 2011).

A resolução (R_s) pode ser expressa pela seguinte equação:

$$R_s = 2[(T_{R1} - T_{R2}) / (W_2 + W_1)]$$

(Equação 2.1.)

Onde, T_{R1} e T_{R2} correspondem aos tempos de retenção de dois solutos diferentes e W_1 e W_2 correspondem à largura da base dos picos correspondentes aos solutos.

- **Sensibilidade**

A sensibilidade (S) de uma análise cromatográfica corresponde ao nível mais baixo detetado para um dado componente e é função do sinal-ruído (S/N) da deteção. (Marcos, 2011) Este parâmetro avalia a capacidade de um dado método de distinguir exíguas diferenças de concentração do analito (Portugal, 2004).

$$S = \Delta\gamma / \Delta_C$$

(Equação 2.2.)

Onde Δ_y corresponde à variação do sinal analítico e Δ_c corresponde à variação da concentração do analito na amostra.

- **Tempo de Retenção**

O tempo que um dado analito demora a passar através da coluna cromatográfica designa-se por tempo de retenção (T_R). Este permite a identificação qualitativa dos compostos, pelo que cada molécula terá um T_R único numa dada coluna e para um dado solvente (Lough & Wainer, 1995), o que é demonstrado na Figura 2.2..

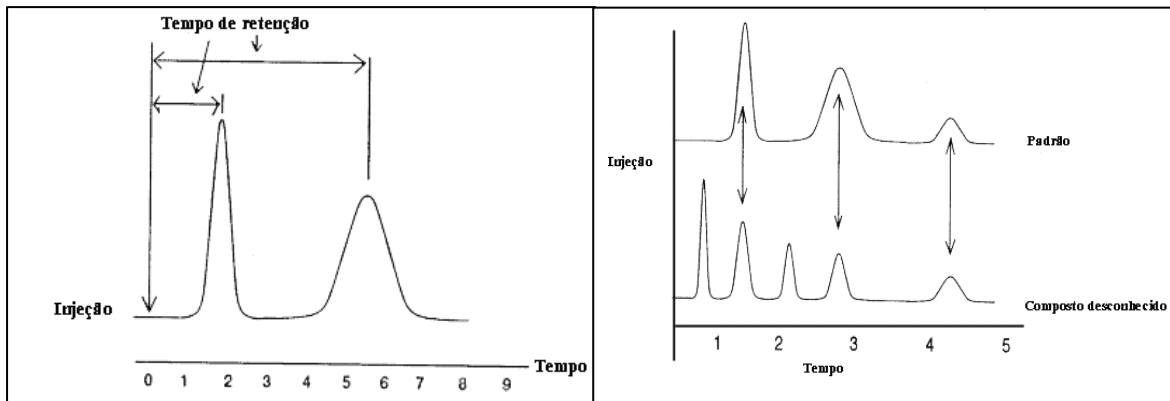


Figura 2.2. – Cromatogramas a ilustrar o tempo de retenção e identificação de compostos (Willard *et al*, 1974)

- **Eficiência da coluna**

A eficiência da coluna (H ou HETP) é expressa como o número de pratos teóricos (N) produzidos pela coluna.

O potencial de uma dada coluna na separação de dois solutos é diretamente proporcional ao número de pratos teóricos (Portugal, 2004).

$$H = L/N$$

(Equação 2.3.)

Onde H ou HETP corresponde à altura equivalente do prato teórico, N é o número de pratos teóricos e L é o comprimento da coluna. (Acúrcio, 2007).

A eficiência da coluna cromatográfica pode ser expressa também pela altura equivalente a um prato teórico, através da equação de Van Deemter. (Equação 2.6.)

- **Áreas dos picos**

A área dos picos dos cromatogramas permite a análise quantitativa dos compostos (Valente *et al*, 2003; Lough & Wainer, 1995).

De acordo com Lough & Wainer (1995), à medida que um dado composto migra ao longo de uma coluna, os picos tendem a alargar, reduzindo a eficiência e a resolução da coluna cromatográfica, ou seja, a área do pico é diretamente proporcional à concentração do composto eluído.

Os picos obtidos apresentam uma distribuição gaussiana e surgem a partir de movimentos aleatórios de moléculas à medida que migram ao longo da coluna, originando uma gama de tempos de retenção para cada analito (Lough & Wainer, 1995).

- **Curvas de calibração**

Quando é feita uma análise quantitativa, a calibração é uma etapa essencial para obter-se uma resposta do sistema face a uma dada substância. Esta resposta obtém-se através das curvas de calibração, traçadas através da função que relaciona o sinal do equipamento em função da concentração das soluções padrão, que abrangem toda a gama de trabalho (Portugal, 2004).

- **Gama de trabalho**

A gama de trabalho de um procedimento de análise cromatográfico corresponde ao intervalo entre a concentração mais alta e a mais baixa dos compostos onde o método de ensaio é aplicável e para a qual foi demonstrado que o procedimento analítico tem uma precisão, exatidão e linearidade aceitáveis (Gaffney, 2011).

- **Limiares analíticos do método**

- **Limite de Detecção (LD)**

O LD corresponde a um limiar mínimo de concentração acima do qual um dado analito pode ser detetado, com uma certeza estatística razoável (Portugal, 2004; Coleman *et al*, 1997). Contudo, de acordo com Portugal (2004), uma leitura inferior a este limite não exprime obrigatoriamente a ausência do analito da amostra.

$$LD = 3 \times S_{x_0}$$

(Equação 2.4.)

Onde S_{x_0} corresponde desvio padrão correspondente a várias leituras do branco ou da solução com concentração mais baixa da gama de linearidade.

Através da razão Sinal/Ruído (S/N), comparam-se o sinal das soluções contendo o analito em concentrações muito baixas com o sinal de um ensaio em branco, sendo a razão 3:1 a utilizada mais frequentemente.

- **Limite de Quantificação (LQ)**

O LQ corresponde à mais baixa concentração que pode ser quantificada dentro dos limites de precisão e exatidão do método, durante as operações de rotina do laboratório e em condições usuais. (Portugal, 2004)

$$LQ = 10 \times S_{x_0}$$

(Equação 2.5.)

Onde S_{x_0} corresponde desvio padrão correspondente a várias leituras do branco ou da solução com concentração mais baixa da gama de linearidade.

Através da razão Sinal/Ruído (S/N), comparam-se o sinal das soluções contendo o analito em concentrações muito baixas com o sinal de um ensaio em branco, sendo a razão 10:1 a utilizada mais frequentemente.

Quando se fala em limiares analíticos, deve-se ter em conta que existem três zonas analíticas principais (Figura 2.3.), sendo que o LD corresponde ao início da zona em que é possível distinguir com confiança estatística (95%) o sinal do branco do sinal da amostra, sendo possível indicar se o analito está ou não presente; a gama entre LD e LQ é considerada como a zona de detecção qualitativa e o LQ a zona de detecção quantitativa (Currie, 1999; Currie, 1968).

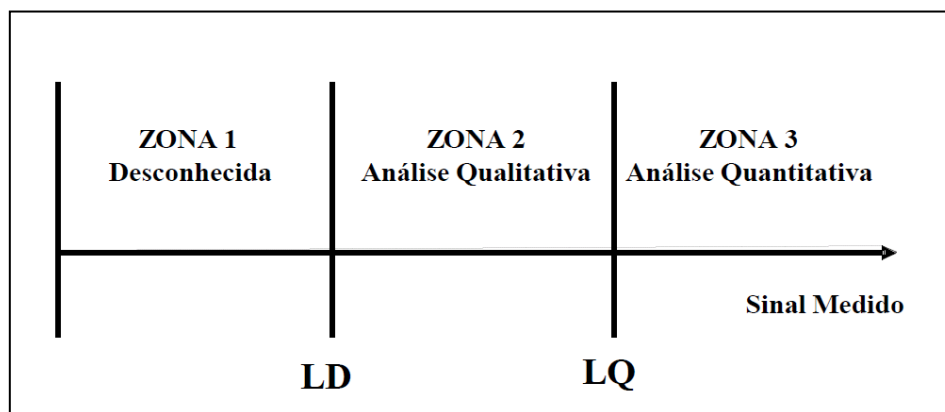


Figura 2.3. - Principais zonas analíticas na análise de compostos (Adaptado de: (Currie, 1968))

2.1.4. Equipamento de HPLC

Um equipamento de HPLC é constituído por uma bomba, um injetor, uma coluna cromatográfica, um detetor e um sistema de tratamento de dados (computador) (Neng, 2011; Marcos, 2011), tal como ilustrado na Figura 2.4..

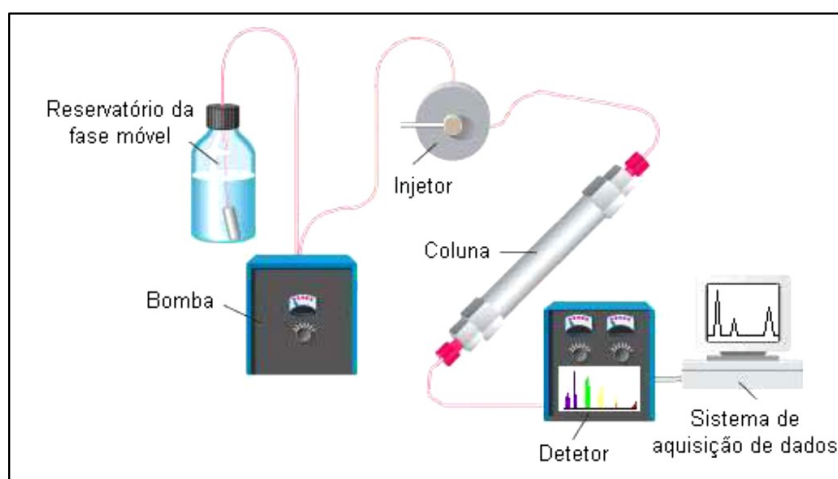


Figura 2.4. – Equipamento de HPLC (Neng, 2011)

- **Coluna Cromatográfica**

A coluna cromatográfica é a componente do sistema de LC onde ocorre a separação e, regra geral, são revestidas por tubos de aço inoxidável e nos seus extremos possuem filtros de titânio

poroso, possibilitando assim a obtenção de um fluxo uniforme (Acúrcio, 2007; Santos, 2000; Rodrigues, 1999).

A temperatura da coluna é um fator muito importante, uma vez que permite o controlo da viscosidade do solvente. Assim, quando a coluna é aquecida, a viscosidade é reduzida, diminuindo assim a pressão requerida e viabilizando a passagem de maiores fluxos. Contudo, deve-se ter em consideração que temperaturas demasiado elevadas podem degradar a fase estacionária e diminuir o tempo de vida da coluna cromatográfica (Acúrcio, 2007; Santos, 2000; Rodrigues, 1999).

A cromatografia de fase reversa utiliza fases estacionária e móvel, respetivamente, apolar e polar. Contrariamente à cromatografia clássica, a eluição dos compostos polares ocorre primeiro do que a dos apolares (Acúrcio, 2007).

- **Fase Móvel**

Os solventes utilizados num sistema de HPLC devem de ser puros, ou seja, é necessário uma filtração a vácuo prévia. Esta condição é essencial para que não ocorra degradação das colunas dispendiosas e para que o ruído de fundo no detetor seja mínimo (Rodrigues, 1999).

Os reservatórios da fase móvel são de vidro ou aço inoxidável e os tubos que são aí colocados possuem um filtro muito fino que rejeita partículas com mais de 2-5 μm (Santos, 2000).

- **Bomba**

O desempenho da bomba afeta diretamente o tempo de retenção, a reprodutibilidade, a sensibilidade do detetor e a estabilidade do fluxo produzido (Santos, 2000), afetando também o desempenho de todo o processo cromatográfico (Acúrcio, 2007).

Podem construir-se gradientes até quatro solventes, sendo a mistura bombeada na coluna a alta pressão. Este processo de construção do gradiente é programado e controlado eletronicamente (Santos, 2000; Rodrigues, 1999).

- **Válvula de injeção**

O método mais utilizado para a injeção de amostras está baseado num sistema de injeção que contém um tubo capilar de aço, com diferentes dimensões, que mede um volume fixo. A amostra é introduzida na válvula através da seringa e enche o espaço exterior do tubo capilar (Acúrcio, 2007; Santos, 2000; Rodrigues, 1999).

- **Detetores**

A escolha do detetor a utilizar depende das propriedades exibidas pelos compostos a analisar (Acúrcio, 2007).

A função do detetor é monitorizar o fluxo da fase móvel na saída da coluna, medindo de forma contínua as propriedades físicas ou físico-químicas da amostra ou da solução que a contém. Esta medição é feita quando o eluato da coluna com os componentes separados passa através do detetor, sendo que o sinal registado é diretamente proporcional à concentração do componente na amostra (Rutz, 2009; Santos, 2000).

De acordo com Rutz (2009), considera-se o detetor ideal aquele que possui alta sensibilidade, elevada estabilidade, linearidade, forneça leituras contínuas e uma resposta universal.

2.1.5. Funcionamento do HPLC

O funcionamento de um equipamento de cromatografia líquida começa com a injeção da amostra no início da coluna. De seguida, a bomba de alta pressão impele a passagem da fase móvel e dos analitos através da coluna, onde ocorre a separação dos componentes. Quando a separação termina, cada componente é eluído da coluna e registado sob a forma de pico, de acordo o seu tempo de retenção, originando o cromatograma. Posteriormente, os dados são processados no sistema de tratamento de dados selecionado para o efeito (Marcos, 2011).

2.2. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)

A HPLC é uma técnica que ganhou relevância nos últimos 30 anos. Esta é uma técnica de valor comprovado e tem sido utilizada em laboratórios de todo o mundo (Swartz, 2005).

As técnicas de separação por cromatografia líquida oferecem um enorme poder de resolução, deteção, quantificação, bem como uma grande rapidez e aplicabilidade a diferentes tipos de amostras e sofreram uma grande evolução até ao HPLC, e mais recentemente ao UPLC, permitindo separar e analisar amostras complexas (Rutz, 2009).

2.2.1. Do HPLC ao UPLC

O método de HPLC é o método de separação clássico, possuindo determinadas vantagens, nomeadamente, robustez, facilidade de uso, boa seletividade e sensibilidade ajustável (Srivastava *et al*, 2010). Ao utilizar este método, a escolha do tamanho das partículas deve ser um fator a considerar, uma vez que à medida que o tamanho da partícula é menor, maior a pressão a que a coluna do sistema de HPLC está sujeita. Assim sendo, esta pode ser uma limitação preponderante neste tipo de método (Nováková *et al*, 2006).

A popularidade da HPLC deve-se às vantagens que apresenta face à LC clássica. As separações cromatográficas que ocorriam durante horas ou mesmo dias utilizando a LC clássica, podem atualmente demorar apenas minutos ou segundos com recurso à HPLC (Silva, 2010). Contudo, ao longo de vários anos, os investigadores cingiram a sua pesquisa à rapidez dos métodos cromatográficos, negligenciando a resolução das análises em função de um menor tempo de corridas das mesmas (Swartz, 2005).

A técnica de UPLC beneficiou dos contínuos avanços tecnológicos obtidos no desempenho químico das partículas, na optimização dos sistemas de separação, nos tipos de detetores e no processamento e controlo dos dados (Swartz, 2005). Aliado a estes avanços, a técnica concedeu ainda melhorias em três áreas: velocidade de análise, resolução e sensibilidade cromatográfica (Srivastava *et al*, 2010).

Utilizando partículas com dimensões inferiores a 2 μm e fases móveis com elevadas velocidades lineares aliadas a uma instrumentação que opera a pressões mais elevadas do que as adoptadas em HPLC, a técnica de UPLC promove aumentos na resolução, sensibilidade e velocidade das análises

(Figura 2.5.). Esta nova categoria da ciência de separação analítica mantém a objetividade e os princípios da técnica de HPLC, possibilitando uma melhoria funcional no desempenho cromatográfico (Swartz, 2005).

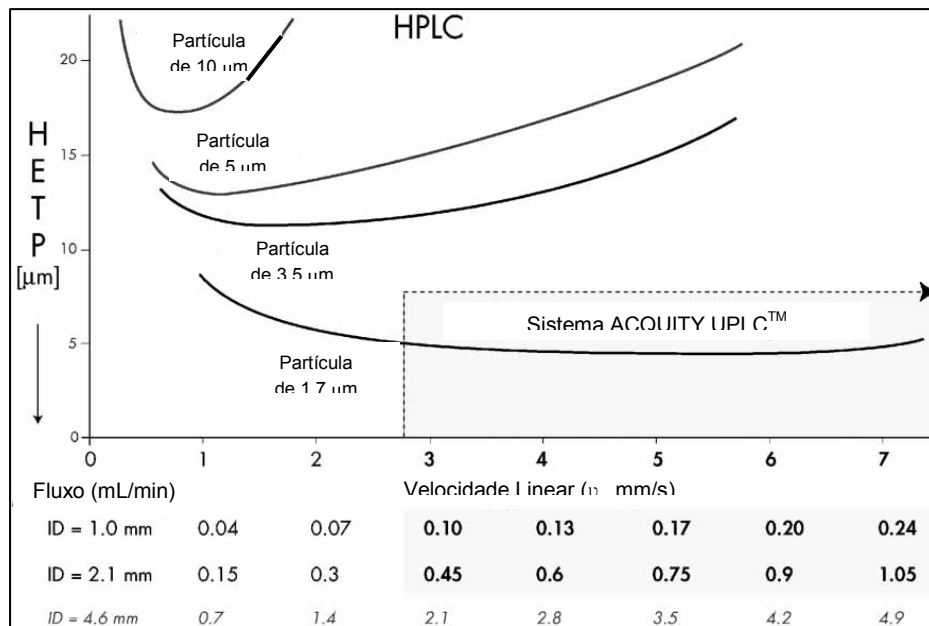


Figura 2.5. - Curva de Van Deemter, ilustrando a evolução do tamanho das partículas nos últimos 30 anos (Swartz, 2005).

A evolução de uma técnica para a outra, exigiu o desenvolvimento de um novo sistema instrumental para cromatografia líquida, podendo esta extrair dividendos ao nível do desempenho de separação e da consistência das pressões. A eficiência é proporcional ao comprimento da coluna e inversamente proporcional ao tamanho de partícula, podendo assim diminuir-se o tamanho da coluna sem perda de resolução da técnica (Srivastava *et al*, 2010).

2.2.2. Princípio básico do UPLC e principais vantagens

De acordo com Srivastava *et al* (2010), a técnica de UPLC tem como base a técnica de HPLC e pode ser considerada como uma nova direção para a cromatografia líquida.

Sendo uma evolução da técnica de HPLC, a UPLC funciona de acordo com os mesmos princípios de separação. Assim sendo, os princípios subjacentes a esta evolução são também regidos pela equação de Van Deemter (Equação 2.6.), fórmula empírica que descreve a relação entre a velocidade linear e a altura equivalente a um prato teórico (H ou HETP). Assim sendo, o desempenho cromatográfico de um dado composto pode ser investigado traçando uma curva associada a esta equação (Swartz, 2005).

$$H = A + \frac{B}{v} + C v$$

(Equação 2.6.)

Onde,

H - Altura equivalente a um prato teórico

- Velocidade linear da fase móvel

A - constante de alargamento dos picos devidos aos diferentes caminhos seguidos pelas moléculas do analito

B - Constante relacionada com a difusão longitudinal ou difusão do soluto na fase móvel

C - Constante de transferência de massa do analito entre a fase móvel e a fase estacionária (Swartz, 2005).

As vantagens associadas à técnica de UPLC são óbvias, uma vez que os mecanismos de alteração e os princípios cromatográficos permanecem inalterados, ocorrendo melhorias significativas na sensibilidade, velocidade e resolução (Srivastava *et al*, 2010; Nováková *et al*, 2006).

A principal vantagem do ponto de vista da análise é a expressiva redução do seu tempo-de-corrída, o que incita a diminuição do consumo do solvente utilizado (Nováková *et al*, 2006).

De acordo com Srivastava *et al* (2010) e Nováková *et al* (2006), esta técnica também possui algumas desvantagens comparativamente com a técnica convencional de HPLC, sendo que as mais evidentes estão associadas à pressão de trabalho, que leva a uma diminuição do tempo-de-vida das colunas e a uma maior necessidade de manutenção do sistema; bem como à diminuição da repetibilidade das áreas dos picos dos cromatogramas.

2.3. Espectrometria de Massa como Sistema de Detecção

Os espectrómetros de massa (MS) funcionam através da ionização das moléculas e posterior separação e identificação dos iões e podem ser divididos em três partes fundamentais: fonte de iões, onde são produzidos os iões, o analisador de massas que os separa e o detetor (Madeira, 2010; Gonçalves, 2007), tal como o indicado na Figura 2.7..

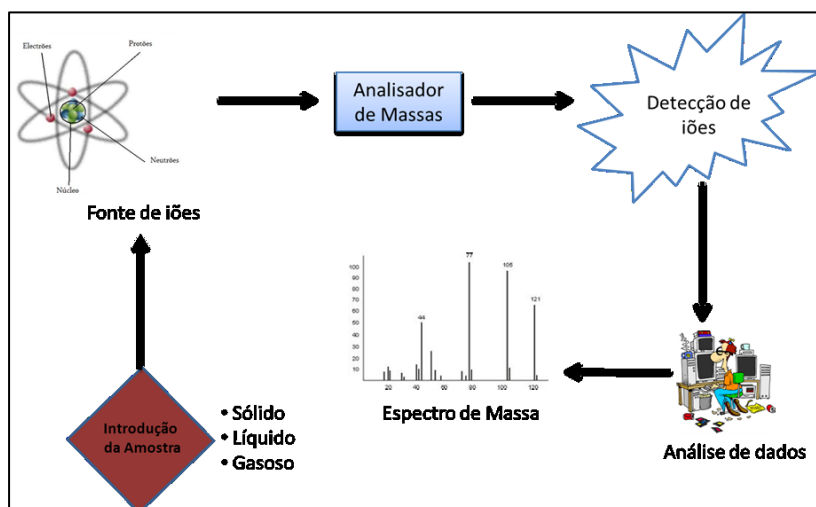


Figura 2.6. - Componentes básicos de um Espectrómetro de Massas (Adaptado de: (Gaffney, 2011))

Os MS (Figura 2.6.) funcionam através da ionização das moléculas e posterior separação e identificação dos iões de acordo com a razão massa/carga (m/z), registando a abundância relativa dos iões em função desta razão (Madeira, 2010).

O funcionamento de um MS inicia-se com a introdução da amostra na fonte de ionização do instrumento, onde as moléculas são ionizadas. Posteriormente, os iões são conduzidos para o analisador de massas, onde são separados de acordo com a respetiva razão m/z . De seguida ocorre a deteção dos iões, conseguida através de sistemas que medem e registam a abundância relativa, dando origem a um espectro de massa. Por fim, este espectro é registado num sistema informático de aquisição de dados (Madeira, 2010; Gonçalves, 2007).

2.3.1. Métodos de ionização

A primeira etapa da análise de moléculas por espectrometria de massa consiste na formação de iões (Ramos, 2005).

Segundo Ramos (2005), a geração de um grupo de iões característicos de uma substância a partir das suas moléculas originais e o registo das respetivas abundâncias relativas em função das respetivas razões massa/carga constitui o espectro de massa dessa substância.

Atualmente existem diversos métodos de ionização, consoante as substâncias em análise e as diferentes aplicações. (Ramos, 2005), tais como ionização por impacto eletrónico (EI), ionização química (CI), bombardeamento por átomos rápidos (FAB), Termospray (TSP), ionização por Eletrospray (ESI), ionização química à pressão atmosférica (APCI) e ionização por desorção por laser assistida por matriz (MALDI) (Gonçalves, 2007).

2.3.2. Analisador de Massas

A principal função do analisador de massa é separar os iões formados na fonte de ionização, de acordo com as suas razões m/z (Gaffney, 2011).

O desenvolvimento de espetrómetros de massas de múltiplos estágios, nomeadamente dos triplos e pentaquadrupolos, *Ion Traps*, *TOF*, entre outros, permitiu o acesso a técnicas de espectrometria de massa em série (MS/MS) e a um aumento das potencialidades analíticas desta técnica (Diniz, 2011).

Em cromatografia líquida associada à espectrometria de massa (LC-MS), um dos analisadores mais comuns é o Quadrupolo, que utiliza a estabilidade da trajetória em campos elétricos oscilantes para proceder à separação dos iões (Gaffney, 2011).

Um Quadrupolo pode operar em Modo de Varrimento Contínuo (*Full Scan*) e em Modo de Monitorização Seletiva de Iões (*SIM*) (Gaffney, 2011).

Em *Full Scan*, os iões resultantes dos processos de ionização e fragmentação na fonte são detetados, correspondendo à totalidade do espectro de massa, permitindo a identificação dos compostos em análise. Contudo, o número de iões a detetar é maior, diminuindo a sensibilidade do analisador (Gaffney, 2011).

Em Modo *SIM*, a detecção é seletiva e é realizada apenas a um íon ou a um pequeno grupo de íons característicos dos analitos objeto de estudo, aumentando a sensibilidade da detecção e a sua especificidade (Gaffney, 2011).

2.4. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência associada à Espectrometria de Massa Tandem, com ionização de *Eletrospray* (UPLC-ESI-MS/MS)

2.4.1. Técnica hifenada

Quando se associa um processo como a cromatografia a outros instrumentos, constituindo um sistema analítico integrado, encontramos-nos perante uma técnica hifenada. Estas técnicas têm sido de grande utilidade em análises químicas ambientais, uma vez que são complementares, sendo que a LC separa os componentes da mistura e a espectrometria de massa identifica os compostos em estudo (Portugal, 2004).

A cromatografia líquida associada à espectrometria de massa tandem (LC-MS/MS) é a escolha mais adequada para a análise de substâncias que apresentam baixa volatilidade e/ou instabilidade térmica, uma vez que a LC é muito efetiva na separação dos analitos e a MS/MS permite a sua identificação e/ou confirmação em concentrações vestigiais, assim como a sua quantificação (Queiroz *et al*, 2011).

De acordo com Queiroz *et al* (2011), a combinação de UPLC-MS/MS fornece vantagens significativas em relação à seletividade, detetabilidade e velocidade de análise.

2.4.2. Espectrometria de Massa *tandem* (MS/MS)

A MS/MS, devido à sua versatilidade, rapidez e capacidade de analisar vários compostos importantes num único equipamento, é um dos mais importantes avanços na área da química analítica (Bakhtiar & Guan, 2006).

A MS/MS é uma configuração instrumental alongada, conferindo uma maior seletividade à análise. Este método consiste na disposição em série de três quadropolos, que permite a detecção dos valores do rácio do sinal obtido para os valores de m/z dos íons produto selecionados para cada composto em análise (Rice, 2009).

Na análise de fármacos em matrizes ambientais, o MS/MS opera no modo *Monitorização de reações múltiplas* (MRM), que consiste na seleção de reações de fragmentação específicas. Neste modo de operação, os dois quadropolos estão em modo *SIM*, não existindo varrimento, permitindo a focagem nos íons percursores e produtos por maiores períodos de tempo, conferindo ao método maior sensibilidade e seletividade (Gaffney, 2011).

De acordo com Gaffney (2011), o triplo quadropolo (TQ) é um instrumento de baixa resolução, sendo por isso necessária a seleção de um íon precursor e a aquisição de dois íons produto, por cada composto em análise. Assim sendo, o modo de operação utilizado é o MRM, sendo a monitorização dos analitos efetuada através da seleção de duas transições MRM características de cada analito (MRM1 e MRM2).

Utiliza-se a transição MRM1 para a quantificação do analito, uma vez que é a transição cujo sinal tem maior intensidade e a razão MRM1/MRM2 para a qualificação do analito, através da definição dos coeficientes de variação aplicáveis a este rácio (Gaffney, 2011).

2.4.3. Ionização em Eletrospray (ESI)

A Ionização por Eletrospray (ESI) pode operar à pressão atmosférica e pode ser associada a analisadores de massa (Ramos, 2005).

De acordo com Madeira (2010), a ESI distingue-se de outras técnicas de ionização devido:

- À sua capacidade para produzir iões multiplamente carregados,
- À capacidade de ser associada a inúmeras técnicas de separação, uma vez que as amostras para análise são introduzidas em solução; e
- Quase inexistência de fragmentação dos analitos em estudo, devido ao carácter suave da ionização.

A ESI pode ser dividida em três etapas, iniciando-se com a formação de um *spray* eletricamente carregado, ocorrendo de seguida uma redução acentuada do tamanho das gotas e, por último, a libertação dos iões completamente desolvatados (Gaffney, 2011).

A ESI possui uma característica extremamente importante do ponto de vista analítico, uma vez que este método forma iões multicarregados para determinados compostos de peso molecular elevado, estando assim a razão m/z suficientemente baixa para que os compostos possam ser detetados, independentemente dos limites de deteção dos espectrómetros de massa utilizados (Gonçalves, 2007; Ramos, 2005).

2.4.4. Funcionamento da técnica hifenada UPLC-ESI-MS/MS

Após realizada a extração de amostras por extração em fase sólida (SPE), estas são introduzidas no sistema cromatográfico que opera em modo MRM, sendo selecionados um ião precursor e dois iões-produto característicos (Adaptado de: (Tendinha, 2009)).

De seguida, após separação por UPLC, a amostra é bombeada para o MS/MS, que trabalha em modo de ionização ESI, ocorrendo a nebulização e desolvatação da amostra. Posteriormente, os iões são transferidos para o primeiro quadrupolo (Q_1), onde ocorre a filtração dos iões selecionados, de seguida para o segundo quadrupolo (Q_2), onde os iões são fragmentados e, por último, sendo reencaminhados para o terceiro quadrupolo (Q_3), onde ocorre uma nova filtração que permite isolar e analisar ao pormenor os iões produto (Tendinha, 2009), tal como ilustrado na Figura 2.7., permitindo a identificação e quantificação dos compostos em estudo.

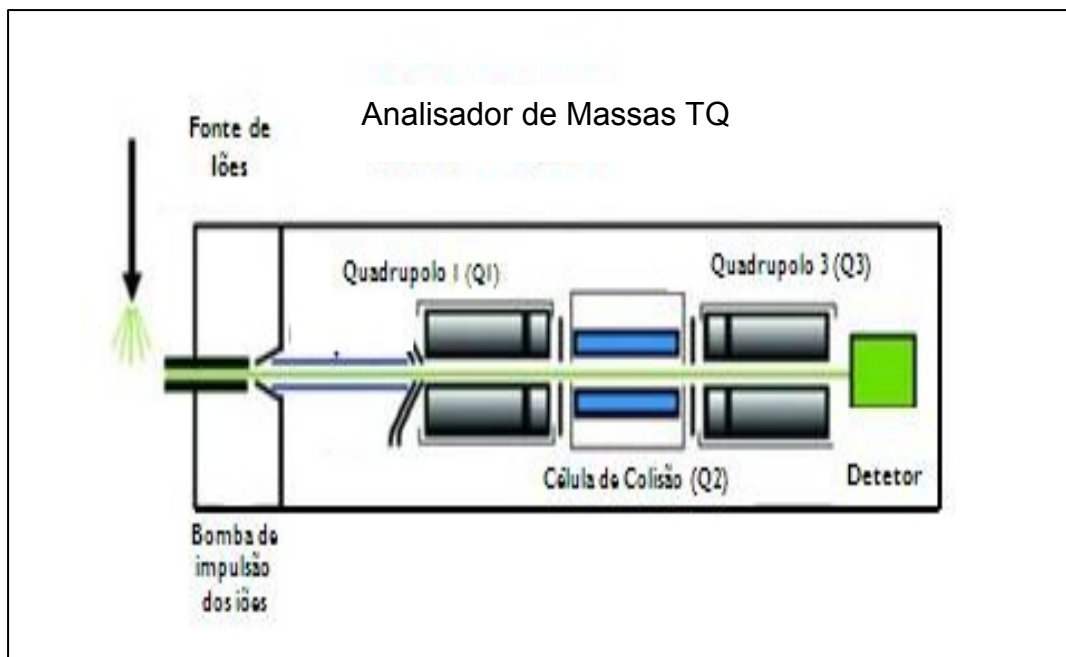


Figura 2.7. - Triplo Quadrupolo MS (Adaptado de: (Tendinha, 2009))

De um modo geral, após a separação por UPLC, os íons são transferidos para o Q_1 posicionado à direita da fonte, onde ocorre a filtração dos íons antes de chegarem à célula de colisão (Q_2) onde são fragmentados. Posteriormente, os fragmentos de íons formados na célula de colisão são enviados para o Q_3 , através de outra filtração de íons, permitindo ao operador isolar e analisar ao pormenor um íon precursor e um íon produto. Assim sendo, uma vez que os íons fragmentos constituem parte de um precursor, representando porções da estrutura completa da molécula precursora, um espectrómetro de massa TQ pode ser utilizado desta forma para identificar e quantificar determinados compostos, tais como os EDC. (Tendinha, 2009)

3. Capítulo III: Extração em fase sólida (SPE)

3.1. Introdução

Nos últimos anos, parte da investigação realizada na área da química analítica tem tido como objetivo a determinação de compostos orgânicos em concentrações vestigiais, o que implica o desenvolvimento de técnicas analíticas sensíveis e específicas, com procedimentos experimentais longos e pouco expeditos (Bila *et al*, 2007).

O desenvolvimento e aperfeiçoamento de novos métodos analíticos permitiram a identificação e avaliação dos efeitos biológicos em matrizes ambientais de outros compostos orgânicos, denominados como *Compostos Emergentes*, cujo estudo é aprofundado em linhas de investigação prioritárias dos principais organismos associados à proteção da saúde pública e do ambiente (Bila *et al*, 2007).

Na análise de poluentes orgânicos de concentrações ao nível vestigial, designados por micropoluentes, existem dois procedimentos essenciais: a separação analítica/deteção dos compostos e a preparação da amostra, esta última fundamental para o procedimento analítico (Portugal, 2004).

De acordo com Zwir-Ferenc & Biziuk (2006) e Portugal (2004), devido ao carácter vestigial da amostra, é crucial proceder-se a um tratamento prévio da amostra. Estes métodos de preparação da amostra têm como principal objetivo concentrar os analitos de interesse (diminuir os limites de quantificação) e eliminar os interferentes presentes nas amostras e, de acordo com Queiroz *et al* (2001), este processo culmina com a obtenção de uma sub-fração da amostra original enriquecida com as substâncias de interesse analítico, para que se obtenha uma separação cromatográfica livre de interferentes, com deteção adequada e um tempo razoável de análise.

A extração em fase sólida (SPE) é a técnica de preparação da amostra de melhor reputação em termos de rapidez e seletividade. A sua versatilidade permite a utilização desta técnica em diversos campos, nomeadamente, purificação, dessalinização, fracionamento, entre outros (Zwir-Ferenc & Biziuk, 2006).

3.2. Desenvolvimento histórico da SPE

A SPE remonta aos primórdios dos anos 70, altura em que foram utilizadas colunas preenchidas com resina para concentrar os poluentes orgânicos presentes em amostras de água. Contudo, o verdadeiro impulso foi dado anos mais tarde através de outros ensaios utilizando carvão ativado, de forma a acumular solutos orgânicos antes da análise (Zwir-Ferenc & Biziuk, 2006; Fritz, 1999; Hennion, 1999).

De acordo com Fritz (1999), nas décadas seguintes, o desenvolvimento e utilização da SPE difundiu-se em larga escala, tendo originado a realização de inúmeros simpósios e a publicação de artigos científicos em revistas e em livros abordando esta temática. Assim sendo, a divulgação desta técnica de preparação de amostras auferiu de grande popularidade a partir dos anos 90, tendo progredido ao longo dos tempos, muito devido às pressões existentes no sentido de redução dos

volumes dos solventes orgânicos utilizados em laboratório, bem como à necessidade de aumentar as recuperações de analitos polares parcialmente solúveis em água.

Em constante atualização, a técnica de SPE baseia-se nas propriedades das superfícies sólidas para adsorver compostos orgânicos, fenómeno reconhecido como analiticamente vantajoso durante o desenvolvimento das técnicas de cromatografia no início do século XX. Assim sendo, nas duas primeiras décadas de estudos, foi prioritária a investigação de novos tipos de adsorventes. Este estudo tem sido contínuo até aos dias de hoje, com a diferença de que atualmente se procuram obter fases sólidas apropriadas para uma determinada aplicação específica (Portugal, 2004).

3.3. Princípios Gerais

A SPE é um método de separação que utiliza uma fase sólida ou uma fase líquida sob um suporte sólido para isolar um determinado analito de uma solução (Rial-Otero *et al*, 2007).

Citando Rial-Otero (2007), a SPE é baseada na afinidade preferencial dos solutos desejáveis e indesejáveis por um material sólido ou um sólido revestido com um filme líquido ou que apresente cargas superficiais. Este método de preparação de amostras pode ser utilizado nas etapas de concentração e de lavagem e higienização (“*clean-up*”) de uma amostra antes da análise cromatográfica ou de outros métodos analíticos para quantificar os analitos presentes. A fase sólida adsorvente deve ser condicionada e ativada com um solvente apropriado para que os analitos sejam efetivamente separados da fase líquida.

A SPE envolve a interação de uma amostra líquida ou gasosa com uma fase sólida ou adsorvente, onde o analito é seletivamente adsorvido na superfície da fase sólida. A fase líquida é então separada da fase sólida e outros solventes são adicionados. O primeiro solvente utilizado tem como finalidade a remoção de possíveis componentes da matriz adsorvida; eventualmente um solvente de eluição é colocado em contato com o sorvente para seletivamente dessorver o analito (Quinete, 2005).

3.4. Conceitos teóricos

Para uma melhor compreensão deste mecanismo de extração, é importante definir alguns conceitos base, nomeadamente, a retenção, a eluição, a capacidade e a sua seletividade.

- Retenção

A retenção é o fenómeno resultante da atração existente entre o enchimento e o analito. Esta atração promove a imobilização do analito na superfície do enchimento e depende das propriedades do analito, do solvente e do enchimento, variando consoante os mesmos (Portugal, 2004; Ramos *et al*, 1996).

- Eluição

A eluição é o processo pelo qual um analito é removido do enchimento onde ficou retido. Esta remoção é feita com um solvente cuja afinidade com o analito é maior do que a afinidade ente o analito e o enchimento onde este ficou contido (Ramos *et al*, 1996).

- Capacidade

A capacidade expressa-se pela percentagem de componente retida em relação à massa total de enchimento, ou seja, este conceito é avaliado pela quantidade de analito e demais componentes/interferentes da amostra veiculados por um dado solvente que é capaz de ficar retida numa determinada massa de enchimento (Ramos *et al*, 1996).

- Seletividade

Define-se por seletividade a possibilidade que o enchimento tem em reter prioritariamente o analito pretendido entre os outros componentes da matriz. Consequentemente, a seletividade de um dado enchimento é maior quando este retém apenas um componente da matriz, que será o analito (Ramos, *et al*, 1996).

3.5. Principais etapas da SPE

O princípio da técnica de SPE é semelhante ao da extração líquido-líquido (LLE). Contudo, em vez de duas fases líquidas imiscíveis, a SPE envolve uma partição entre um líquido (matriz da amostra ou do solvente com analitos) e um sólido (que será o sorvente) (Zwir-Ference & Biziuk, 2006).

De uma forma mais abrangente, os procedimentos de SPE englobam 5 etapas: i) escolha do enchimento; ii) condicionamento do adsorvente; iii) introdução da amostra; iv) limpeza e secagem da coluna; v) eluição e recolha do analito; tal como apresentado na Figura 3.1. (Queiroz *et al*, 2001; Fritz, 1999).

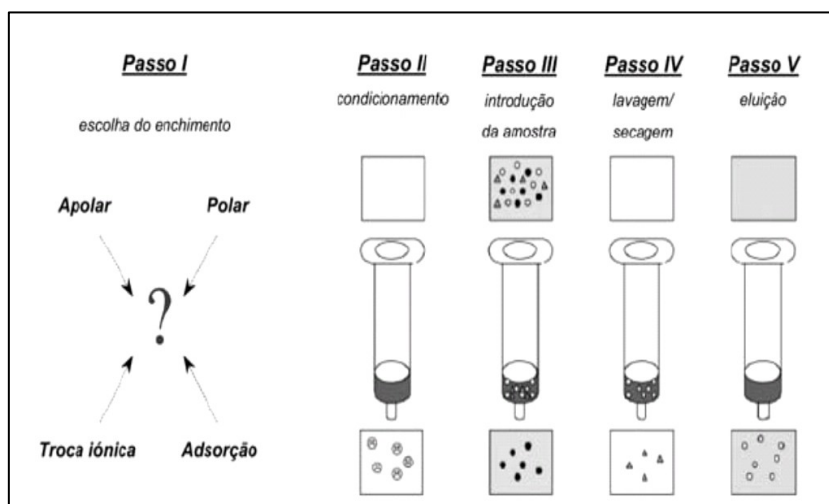


Figura 3.1. - Etapas gerais da técnica de preparação de amostra em SPE (Almeida *et al*, 2004)

- i) Escolha do enchimento

Não existe um material sólido universal capaz de reter tipos de compostos significativamente distintos nas mais variadas aplicações. Assim sendo, o tipo de enchimentos sólidos devem ser selecionados de acordo com os mecanismos de retenção pretendidos, podendo ser classificados em

enchimentos polares, apolares, de troca iónica e de adsorção (Zwir-Ferenc & Biziuk, 2006; Barceló, 2000; Ramos *et al*, 1996).

Regra geral, os materiais de enchimento por adsorção utilizados em SPE são similares aos utilizados na cromatografia líquida, ou seja, podem ser utilizados materiais tão distintos como carvão ativado, alumina, sílica gel, silicato de magnésio (Florisil), entre outros (Zwir-Ferenc & Biziuk, 2006; Queiroz *et al*, 2001).

ii) **Condicionamento**

As cadeias alquila de determinados grupos funcionais tornam a superfície da sílica hidrofóbica, embora a sílica seja um composto hidrofílico. Assim, é preponderante uma preparação prévia do adsorvente, de forma a promover um contato eficaz entre a amostra aquosa e o adsorvente, ou seja, deve-se proceder ao condicionamento do enchimento com a finalidade de ativá-lo. Este condicionamento é função da natureza do analito e baseia-se no princípio “polar dissolve polar” (Zwir-Ferenc & Biziuk, 2006; Queiroz *et al*, 2001; Barceló, 2000).

iii) **Introdução da amostra**

A amostra é forçada a passar através da fase sólida (vácuo ou pressão), a fluxo constante e para que os analitos fiquem retidos no adsorvente (Fritz, 1999).

De acordo com Zwir-Ferenc & Biziuk (2006) e Fritz (1999), os mecanismos de retenção do analito dependem da natureza deste, da natureza do solvente e do tipo de enchimento selecionado, pelo que a percentagem de retenção de um analito é variável.

iv) **Lavagem e Secagem**

Este passo é extremamente importante para a limpeza da coluna e remoção de interferentes menos retidos que o analito (Queiroz *et al*, 2001).

De acordo com Fritz (1999), a escolha do solvente de lavagem deve ser feita considerando o risco de uma eluição parcial do analito. Assim sendo, é crucial utilizar-se uma mistura de água com 5-20% de um solvente orgânico, permitindo a remoção de materiais da matriz e de sais inorgânicos.

Na secagem, aplica-se um baixo vácuo durante alguns minutos ou ocorre a passagem de ar ou azoto através da coluna, para que se remova o máximo água possível previamente à eluição (Fritz, 1999).

v) **Eluição dos analitos**

Os analitos adsorvidos na fase sólida são extraídos para uma fase líquida orgânica adequada à análise. Esta extração ocorre devido à maior afinidade dos analitos para o solvente do que para o enchimento (Fritz, 1999).

Após a eluição do analito, procede-se à concentração do mesmo para eliminação do solvente. Esta concentração é crucial para que os limites de deteção do analito em estudo sejam reduzidos. Posteriormente, o extrato da amostra, já concentrado, é introduzido no sistema cromatográfico (Almeida *et al*, 2004).

3.6. Vantagens do SPE

A SPE é uma técnica de preparação de amostras para análises cromatográficas extremamente poderosa e surgiu como uma alternativa à LLE, sendo mais simples, com menor custo e de fácil automatização (Zwir-Ferenc & Biziuk, 2006).

De acordo com Zwir-Ferenc & Biziuk (2006) e Fritz (1999), a SPE possui inúmeras vantagens comparativamente com outras técnicas de preparação mais tradicionais, tais como: simplicidade, rapidez, baixo custo, fornecer extratos relativamente livres de interferentes, elevadas recuperações, com boa exatidão e precisão para os analitos de interesse, redução dos volumes de solvente utilizados e capacidade para extrair simultaneamente analitos de várias gamas de polaridade.

3.7. Eficiência do SPE

A eficiência do SPE pode ser demonstrada através de ensaios de recuperação em matrizes diversas.

A percentagem de recuperação em águas brutas e águas de consumo para os compostos em análise encontra-se na Tabela 3.1..

Tabela 3.1. - Ensaios de recuperação em águas brutas e águas de consumo para os compostos em análise (ME 72, 2009)

Composto	Recuperação (%) em água superficial	Recuperação (%) em água subterrânea	Recuperação (%) em água de consumo
Estriol	53,3	71,1	79,9
Bisfenol A	71,9	72,8	92,0
Dietilestilbestrol	80,5	56,9	100,5
Estrona	72,5	62,7	81,2
β - Estradiol	67,0	68,4	80,0
Etinilestradiol	69,1	60,6	86,6
Progesterona	37,9	59,7	57,5
Octilfenol	81,0	49,7	86,0
Mestranol	66,2	53,1	61,9
Nonilfenol	71,3	62,7	74,8

4. Capítulo IV: Metodologia de Análise de Amostras de Água

4.1. Plano de Amostragem

No período compreendido entre 8 de Fevereiro e 10 de Abril de 2012, foram recolhidas 60 amostras de água da rede da EPAL, englobando águas brutas (captações superficiais e subterrâneas) e águas tratadas (adutores, reservatórios, rede de distribuição) (Anexo I).

No decorrer do mês de Julho, foram recolhidas 24 amostras de águas residuais provenientes da ETAR de Beirolas. Estas amostras foram recolhidas em 6 pontos de amostragem diferentes, através de um amostrador automático, de modo a garantir a representatividade da amostra.

4.1.1. Captações

Foram recolhidas 13 amostras de captações subterrâneas, sendo que 6 pertencem aos poços das Lezírias (Bacia do Tejo), 3 pertencem aos poços de Alenquer e 3 pertencem aos poços da OTA e 1 amostra de uma captação superficial (Captação do Rio Tejo em Valada do Ribatejo).

4.1.2. Estações Elevatórias

Foram recolhidas 3 amostras provenientes de Estações Elevatórias que compõem o sistema de abastecimento da EPAL.

4.1.3. Reservatórios

Foram recolhidas 33 amostras provenientes de reservatórios da rede de distribuição de Lisboa, de diferentes zonas da cidade.

4.1.4. Água Tratada

Foi recolhida uma amostra de água tratada à saída da estação de tratamento de água de Vale da Pedra.

4.1.5. Águas residuais da ETAR de Beirolas

Foram recolhidas 24 amostras de águas residuais, sendo que os 6 pontos de amostragem de águas residuais foram uma estação elevatória, o afluente de entrada na ETAR, o efluente do desarenador, o efluente proveniente da decantação primária, o efluente proveniente da decantação secundária e o efluente de saída da ETAR.

De cada um dos 6 pontos de amostragem, foram recolhidas 4 amostras compostas semanais, durante um mês.

4.2. Padrões Analíticos

- Estriol 99,5%, Dr. Ehrenstorfer
- Bisfenol A 98,5%, Dr. Ehrenstorfer
- Dietilestilbestrol 99,5%, Dr. Ehrenstorfer
- Estrona 99,5%, Dr. Ehrenstorfer
- β - Estradiol 96,0%, Dr. Ehrenstorfer
- Etinilestradiol 99,0%, Dr. Ehrenstorfer

- Progesterona 99,0%, Dr. Ehrenstorfer
- Octilfenol 98,5%, Dr. Ehrenstorfer
- Mestranol 98,0%, Dr. Ehrenstorfer
- Nonilfenol 99,3%, Dr. Ehrenstorfer

4.3. Solventes e Gases

4.3.1. Solventes

- Metanol para cromatografia líquida, Pureza $\geq 99,8\%$, Merck; tóxico, facilmente inflamável, R: 11-23/24/25-39/23/24/25, S:7-16-36/37-45;
- Acetona para análise de resíduos, Pureza $\geq 98,0\%$, Merck; facilmente inflamável, irritante, R: 11-36-66-67, S:9-16-26;
- Solução Amoníaco, 25%, Merck; Corrosivo, Perigoso para o ambiente, R: 34-50, S: 26-36/37/39-45-61;
- Água Ultrapura, Milipore.

4.3.2. Gases

- Azoto - como gás de nebulização, de desolvatação e de cone no espectrómetro de massa (proveniente do gerador de azoto). Em garrafa, como gás de auxílio na evaporação de solventes no sistema de concentração de amostras (Turbovap).
- Argon C55 - em garrafa, como gás de colisão no espectrómetro de massa.

4.4. Preparação de Soluções

A preparação de soluções foi efetuada de acordo com o método de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência associada à espectrometria de massa *tandem*, com extração em fase sólida e ionização em *electrospray* (SPE-UPLC-ESI-MS/MS), acreditado na EPAL (ME72,2009), utilizado na análise em rotina de desreguladores endócrinos nas águas da rede.

4.4.1. Soluções Padrão Primárias

Para cada composto pesou-se aproximadamente a quantidade indicada na Tabela 4.1., transferindo-se posteriormente para um balão volumétrico adequado e dissolveu-se em metanol. As soluções padrão individuais devem ser armazenadas entre 2 e 8°C, ao abrigo da luz. Estas soluções têm um prazo de validade de um ano.

Tabela 4.1. - Concentrações aproximadas das soluções padrão individuais

Grupo de EDC	Massa (g)	Volume do balão volumétrico (mL)	Concentração (mg/l)
Estriol	0,02	10	2000
Bisfenol A	0,02	10	2000
Dietilestilbestrol	0,02	50	400
Estrona	0,02	50	400
β- Estradiol	0,02	10	2000
Etinilestradiol	0,02	10	2000
Progesterona	0,02	10	2000
Octilfenol	0,08	20	4000
Mestranol	0,03	10	3000
Nonilfenol	0,02	10	2000

4.4.2. Solução Padrão Conjunta

Transferiu-se a quantidade necessária (Tabela 4.2.) de cada uma das Soluções Padrão Primárias para um balão volumétrico de 20 mL de capacidade e dilui-se em metanol. A solução padrão conjunta deve ser armazenada entre 2 e 8°C, ao abrigo da luz e tem um prazo de validade de 6 meses.

Tabela 4.2. - Concentrações aproximadas de cada composto na solução padrão conjunta

Grupo de EDC	Volume pipetado (mL)	Concentração (mg/l)
Estriol	1	100
Bisfenol A	1	100
Dietilestilbestrol	5	100
Estrona	5	100
β- Estradiol	1	100
Etinilestradiol	1	100
Progesterona	1	100
Octilfenol	0,5	100
Mestranol	0,7	100
Nonilfenol	1	100

4.4.3. Solução Padrão Intermédia I

A solução padrão intermédia I foi preparada transferindo-se 0,5 mL da solução padrão conjunta (4.4.2.) para um balão volumétrico de 25 mL, diluindo-se posteriormente em metanol. A solução padrão intermédia I deve ser armazenada entre 2 e 8°C, ao abrigo da luz e tem um prazo de validade de 3 meses, apresentando uma concentração de EDC de aproximadamente 2 mg/l.

4.4.4. Solução Padrão Intermédia II

A solução padrão intermédia II foi preparada transferindo-se 5 mL da solução padrão intermédia I (4.4.3.) para um balão volumétrico de 50 mL, diluindo-se posteriormente em uma solução Água:Metanol (7:3). Esta solução deve ser preparada em cada dia de análise.

4.4.5. Soluções Padrão de Calibração

Diluiu-se a solução preparada em 4.4.4. de acordo com os volumes estabelecidos para cada um dos compostos e, posteriormente, preparam-se cada uma das soluções numa solução água Ultrapura/metanol (7:3).

As concentrações de cada EDC nos padrões de trabalho utilizados no método cromatográfico encontram-se em anexo (Anexo II).

4.4.6. Soluções Padrão de Controlo

As soluções de controlo são preparadas a partir da solução padrão intermédia II (4.4.4.) de origem independente e os volumes utilizados são os utilizados em 4.4.5., na preparação das soluções padrão de calibração 3 e 7

4.5. Material e Equipamentos

4.5.1. Material

- Cartuchos de SPE Waters OASIS HLB, 6 mL, 200 mg;
- Tubos de concentração de 200 mL;
- Pipetas volumétricas e graduadas;
- Pipetas de Pasteur;
- Pompete;
- Balões volumétricos;
- Gobelés;
- Provetas;
- Vials de vidro de 2 mL com cápsulas de plástico e septos em Teflon;
- Espátulas;
- Kitasato com 1000 mL de capacidade;
- Funil de Büchner, com 250 mL de capacidade;
- Membranas filtrantes de celulose regenerada, 0,45 µm;
- Seringas sem agulha Terumo, 2 mL;
- Filtros de seringa GHP Acrodisc, GHP membrane, 13 mm, 0,45 µm.

4.5.2. Equipamento

- Balança Analítica Mettler Toledo (XS204);
- Sistema de SPE, AutoTrace 280, Dionex;
- Sistema de Evaporação sob fluxo de Azoto, Turbovap II, Zymark;
- Sistema de água Ultrapura, Milli-Q Academic A-10, Millipore;

- Cromatógrafo Líquido Waters UPLC Acquity;
- Espectrômetro de Massas Waters Acquity TQD (API);
- Coluna Cromatográfica ACQUITY BEH C₁₈ 2,1x50 mm, 1,7 µm;
- Bomba de vácuo, com uma pressão de 700 mbar.

4.6. Procedimento de Higienização

Devido à elevada carga orgânica das amostras de águas residuais, principalmente as brutas, foi necessário adotar-se uma etapa de limpeza anterior à extração, de modo a prevenir eventuais contaminações do equipamento de SPE. Esta etapa de higienização foi feita através de uma filtração a vácuo, tal como o representado na Figura 4.1..

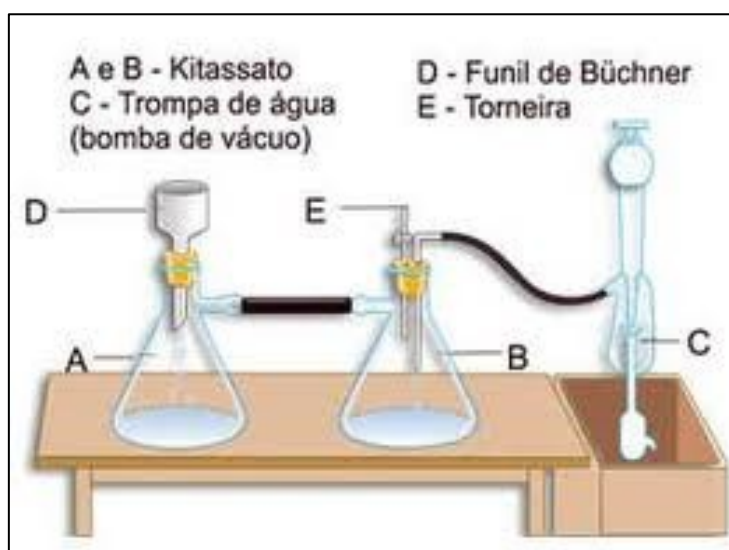


Figura 4.1. – Esquema tipo da Filtração a Vácuo (Lorencini *et al*, 2009)

4.7. Preparação das amostras: SPE

A preparação das amostras deve ser efetuada num período de 7 dias após a colheita e a sua análise num período de 40 dias após a extração.

1. Colocar o cartucho Waters OASIS HLB (6 mL, 200 mg) e o frasco com a amostra a preparar no sistema de SPE.
2. Ativar o programa já validado para a análise de EDC. Este programa executa as tarefas que constam na Tabela 4.3.
3. Concentrar o extrato final num sistema de evaporação com corrente de azoto (Turbovap), até cerca de 0,3 mL sem deixar ir à secura, com as condições da Tabela 4.4.
4. Ajustar o volume a 0,5 mL com uma solução água/metanol (7:3).
5. Transferir o extrato para um vial graduado, com tampa revestida a teflon e armazenar entre 2 a 8°C.
6. Proceder à análise cromatográfica (condições indicadas no ponto 4.9. deste capítulo)

Tabela 4.3. - Condições de extração utilizadas em SPE

Condição para o SPE	
Condicionamento	6 mL de metanol:acetona (3:2) + 6 mL de metanol + 6 mL de água Ultrapura a 10 mL/min
Aplicação da Amostra	500 mL de amostra a 30 mL/min
Lavagem	3 mL de água Ultrapura a 10 mL/min
Secagem	30 min com corrente de azoto
Eluição	4 + 2 mL de metanol:acetona (3:2) a 2 mL/min

Tabela 4.4. - Condições de concentração do extrato com corrente de azoto (TurboVap)

Condição para o TurboVap	
Pressão	0,2 bar
Temperatura do banho de água	35°C

No caso do SPE utilizado para a preparação das amostras de águas residuais, as condições são semelhantes ao apresentado na Tabela 4.2. divergindo apenas na fase da eluição. Nesta, adicionou-se 4+4+2 mL de metanol/acetona (3:2), à mesma velocidade de fluxo, uma vez que nestas amostras poderíamos ter maior quantidade de EDC e desta forma garante-se a eluição da maioria dos compostos.

Para as águas residuais, os extratos já concentrados tiveram de ser filtrados antes de serem colocados nos vials. Esta filtração foi feita através de seringas sem agulha em conjunto com os respetivos filtros de seringa, com 0,45 µm de porosidade.

Nas Figuras 4.2. e 4.3. encontram-se, respetivamente, os equipamentos de SPE e o TurboVap semelhantes aos utilizados neste trabalho.



**Figura 4.2. –
Equipamento de SPE
(Thermo Scientific, 2007)**



**Figura 4.3. – Equipamento de
concentração de amostras
(TurboVap) (Uniscience, 2010)**

4.8. Ensaio em Branco

Por cada série de amostras analisadas (máximo de 10 amostras) realizou-se em simultâneo um ensaio em branco, que integra todo o processo analítico descrito em 4.7., utilizando água ultrapura.

4.9. Ensaio de Recuperação

Por cada série de amostras analisadas (máximo de 10 amostras), foi realizado um ensaio de recuperação.

Numa primeira fase, preparou-se o padrão a utilizar no ensaio de recuperação. Assim, transferiram-se 6 mL da solução padrão conjunta (4.4.2.) para um balão volumétrico com 20 mL de capacidade.

O ensaio de recuperação foi preparado em dois balões volumétricos de 2000 mL, sendo que em apenas um deles foram pesadas 0,3 g de tiosulfato de sódio p.a. ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). De seguida, preencheu-se 2/3 do volume total dos balões com água ultrapura e adicionaram-se 2 mL do padrão de calibração 6, previamente preparado. Perfez-se os 2000 mL de volume com água ultrapura.

4.10. Análise Cromatográfica: condições

Foram utilizadas as condições para análise cromatográfica correspondentes ao método de análise de compostos desreguladores endócrinos por SPE-UPLC-ESI-MS/MS (ME72, 2009), implementado em rotina na EPAL.

4.10.1. Condições de Injeção e Coluna Cromatográfica

As condições utilizadas no injetor e na coluna cromatográfica na análise dos EDC encontram-se na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. - Condições de Injeção e da Coluna Cromatográfica

Injetor	Volume de Injeção	20 µL	
	Solventes de Lavagem	Água Ultrapura/Metanol (7:3)	600 µL
		Metanol	600 µL
Coluna Cromatográfica	Tipo de coluna	ACQUITY BEH C ₁₈ 2,1 x 50 mm, 1,7 µm	
	Tipo de Fase	Reversa	
	Temperatura	40°C	

4.10.2. Condições da Bomba

As condições utilizadas na bomba que impulsiona e controla o fluxo e pressão da fase móvel na análise dos EDC encontram-se na Figura 4.4..

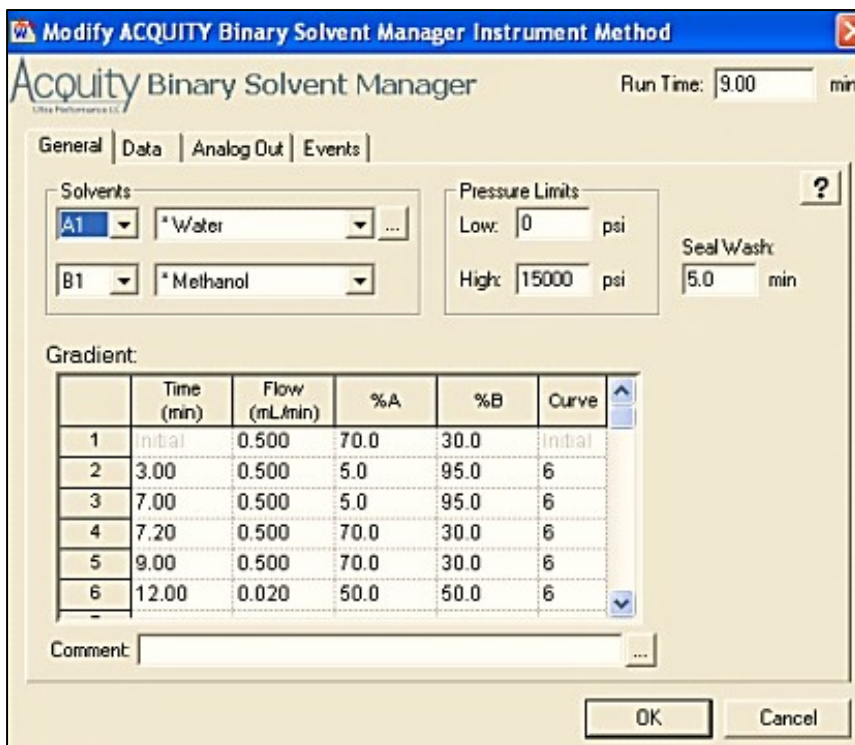


Figura 4.4. - Condições de fluxo e de gradiente da bomba

4.10.3. Condições do Espetrômetro de Massas

As condições utilizadas no espectrômetro de massas TQ estão descritas na Figura 4.5. e 4.6., sendo que a primeira mostra a programação do método utilizado e a segunda mostra as condições utilizadas na fonte de ionização e no analisador de massas.

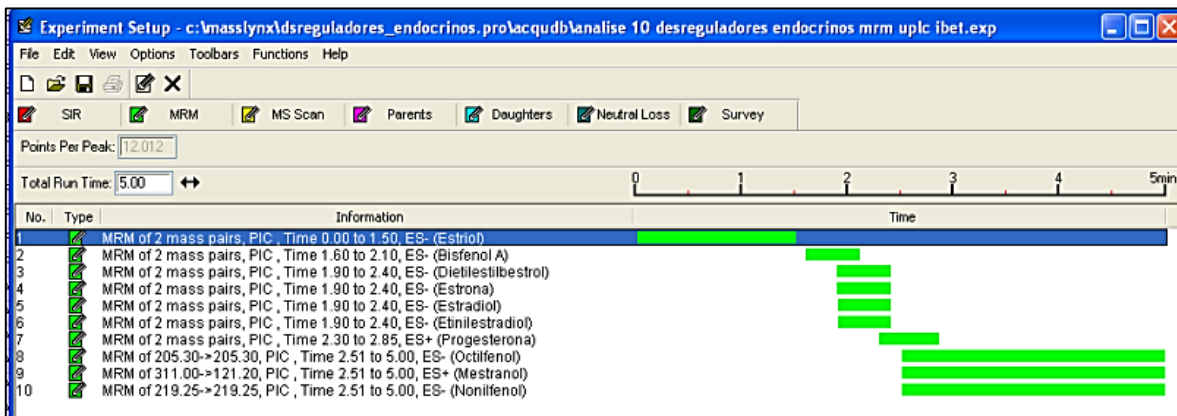


Figura 4.5. – Janela de programação do MS Method

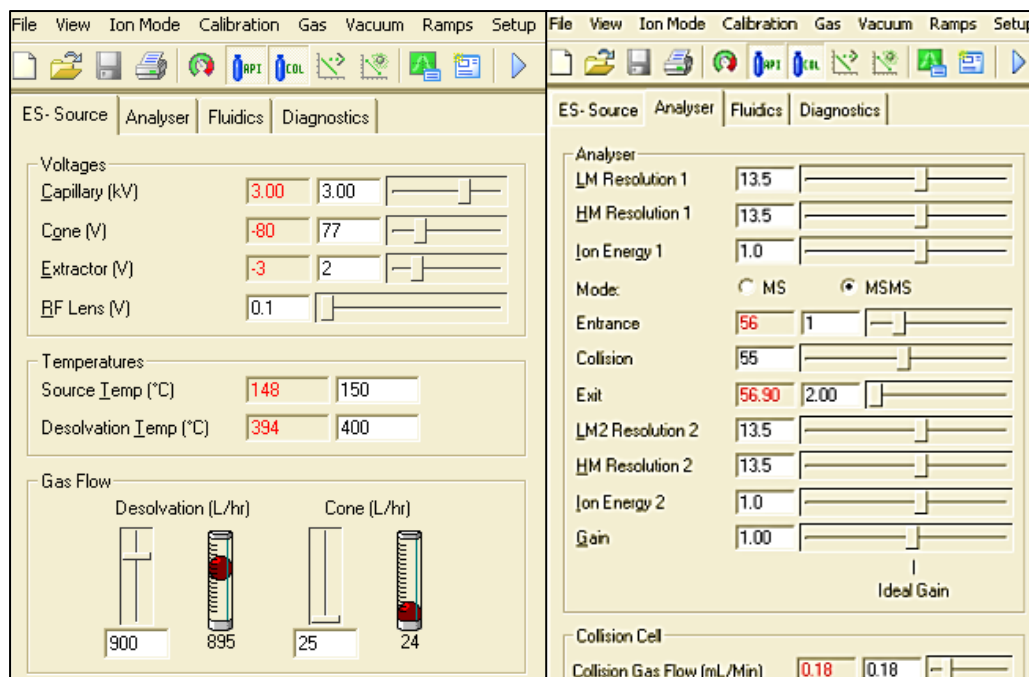


Figura 4.6. – Condições de operação do Espetrômetro de Massa – Fonte e Analisador

As voltagens de cone utilizadas para a formação do íon precursor para cada composto são apresentadas na Tabela 4.6., assim como os íões produto referentes à transição de quantificação (MRM1) e transição de qualificação (MRM2) e respectivas energias de colisão.

Tabela 4.6. - Voltagens de cone utilizadas para a formação do íon precursor para cada composto e energias de colisão aplicadas para formação de íões produto de quantificação e de qualificação

EDCs	Modo de Ionização	Íon Precursor	Voltagem de Cone (V)	Íon Produto Quantificação (MRM1)	Energia de Colisão (eV)	Íon Produto Qualificação (MRM2)	Energia de Colisão (eV)
Estriol	ES -	287.4	60	145.4	40	171.3	40
Bisfenol A	ES -	227.4	40	212.3	20	133.2	20
Dietilestilbestrol	ES -	267.3	40	251.4	25	237.4	25
Estrona	ES -	269.3	60	145.2	40	143.0	55
β-Estradiol	ES -	271.4	65	145.3	40	143.0	65
Etinilestradiol	ES -	295.4	50	145.0	39	159.0	34
Progesterona	ES +	315.4	50	96.9	20	108.9	25
Octilfenol	ES -	205.2	20	133.8	15	132.8	20
Mestranol	ES +	311.4	30	121.2	20	159.2	15
Nonilfenol	ES -	219,4	40	119,0	22	133,30	30

4.11. Campo de aplicação do método

O limite de determinação do método é definido como a razão entre a concentração do padrão mais baixo da gama de linearidade para cada EDC e o fator de concentração (1000x), tendo em conta a percentagem de recuperação.

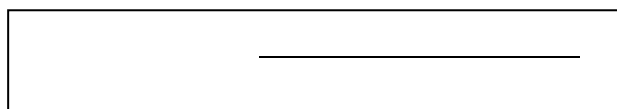
Tabela 4.7. - Limite de determinação global do método e gamas de linearidade

Grupo de EDC	Limite de Determinação do Método (µg/l)	Gamas de linearidade cromatográfica (µg/l)
Estriol	0,05	19,8 - 99,0
Bisfenol A	0,05	20,8 - 104,0
Dietilestilbestrol	0,05	19,9 - 99,5
Estrona	0,05	20,3 - 101,5
β- Estradiol	0,05	20,0 - 100,0
Etinilestradiol	0,05	19,9 - 99,5
Progesterona	0,06	20,1 - 100,5
Octilfenol	0,05	21,6 - 95,2
Mestranol	0,06	32,0 - 93,9
Nonilfenol	0,05	19,5 - 100,0

5. Capítulo V: Resultados e Discussão

No presente capítulo apresentam-se as curvas de calibração obtidas através das soluções preparadas no Capítulo IV (4.4.5.), utilizadas na quantificação de cada composto através de uma regressão linear. Nas figuras correspondentes às curvas de calibração, estão incluídos o nome do composto, coeficiente de correlação e a equação da reta obtida.

Posteriormente apresentam-se os cromatogramas característicos de cada um dos 10 compostos em estudo, bem como os gráficos de concentração (ng/l) obtidos para cada composto. Estas concentrações foram calculadas de acordo com a Equação 2.7., constante no protocolo do método de análise utilizado (ME72, 2009) e tendo sido considerada a diluição de 1000x, feita na preparação da amostra.



(Equação 2.7.)

Onde:

A_{EDC} – Área de Pico do composto na amostra

b_{EDC} – Ordenada na origem da reta de calibração do composto

m_{EDC} – Declive da reta de calibração do composto

V_{extrato} - Volume do extrato (0,5 mL)

V_{amostra} - Volume da amostra (500 mL)

Recup – Percentagem de Recuperação do composto/100

Foram calculados o limite de deteção (LD) e o limite de quantificação (LQ) para cada composto e foram discutidas as concentrações de cada composto nas amostras analisadas em função destes limites.

Por último apresentam-se duas tabelas cujo objetivo consiste em sintetizar os resultados obtidos na análise das 84 amostras, evidenciando quais os pontos de recolha de amostras de água que devem ser objeto de maior atenção. São ainda consideradas as normas de qualidade para substâncias prioritárias em águas superficiais para o nonilfenol (0,3 µg/l) e octilfenol (0,1 µg/l), do DL 103/2010.

5.1. Curva de Calibração para cada composto

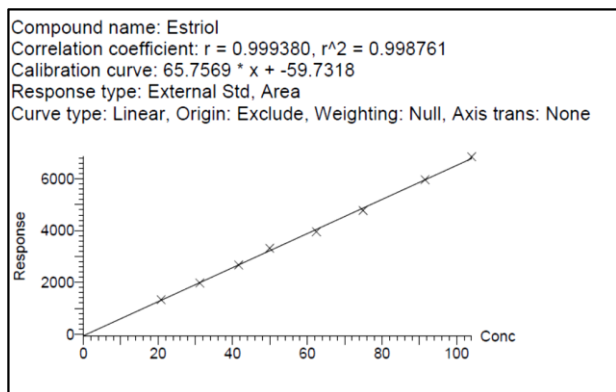


Figura 5.1. - Curva de Calibração do Estriol

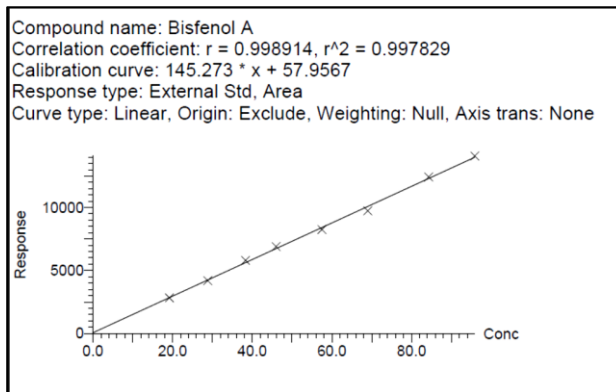


Figura 5.2. - Curva de Calibração do Bisfenol A

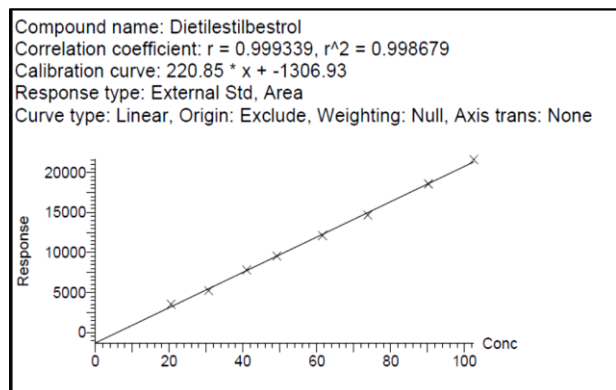


Figura 5.3. - Curva de Calibração do Dietilestilbestrol

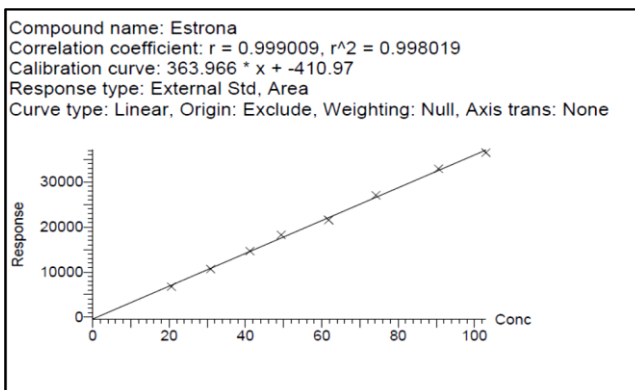


Figura 5.4. - Curva de Calibração da Estrona

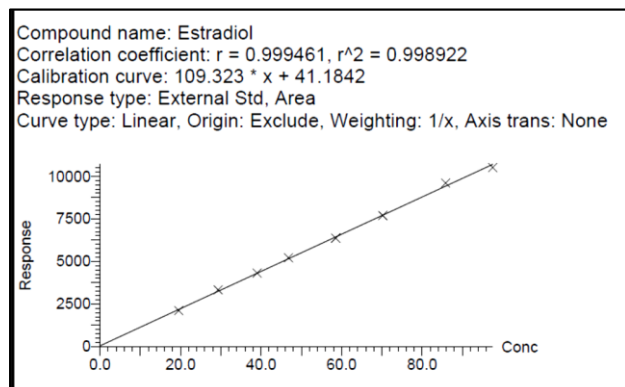


Figura 5.5. - Curva de Calibração do Estradiol

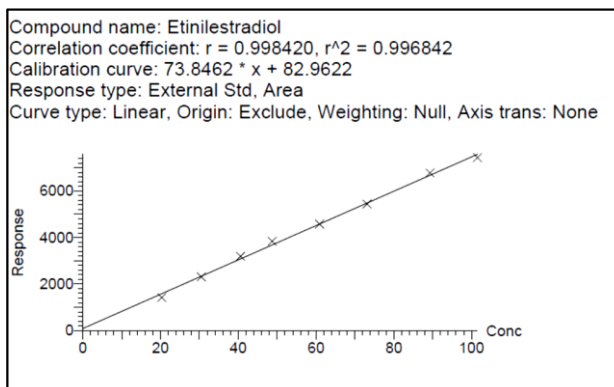


Figura 5.6. - Curva de Calibração do Etinilestradiol

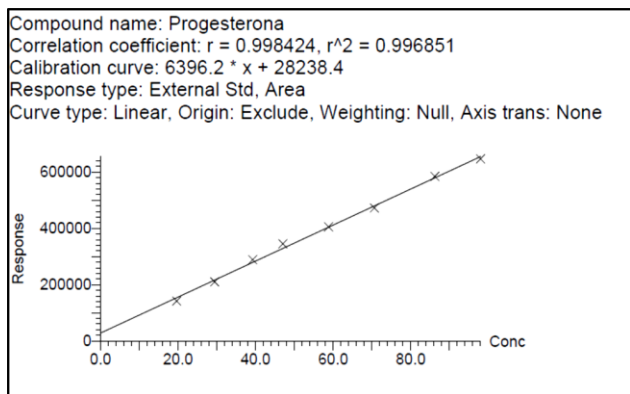


Figura 5.7. - Curva de Calibração da Progesterona

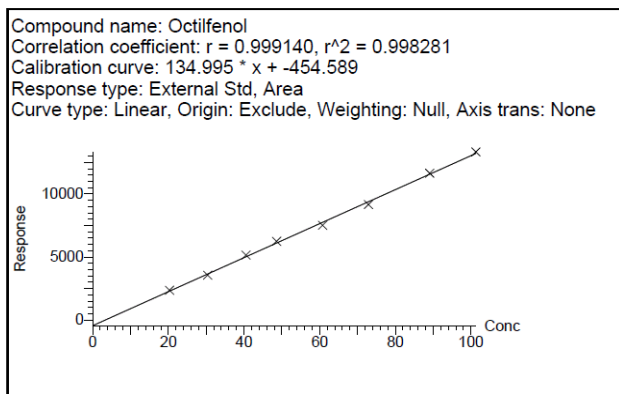


Figura 5.8. - Curva de Calibração do Octilfenol

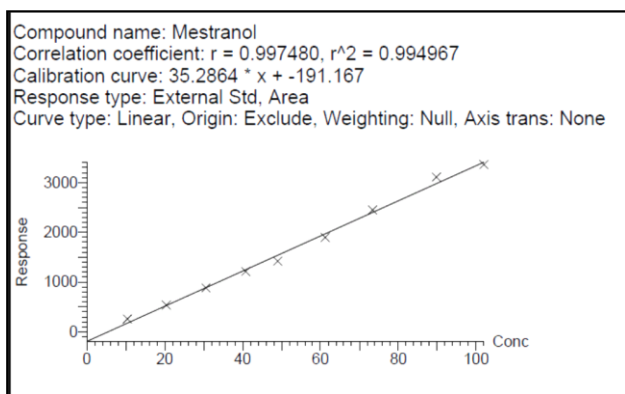


Figura 5.9. - Curva de Calibração do Mestranol

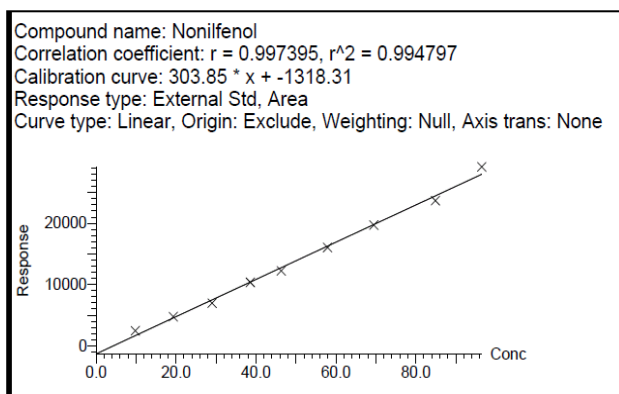


Figura 5.10. - Curva de Calibração do Nonilfenol

5.2. Cromatograma característico de cada composto

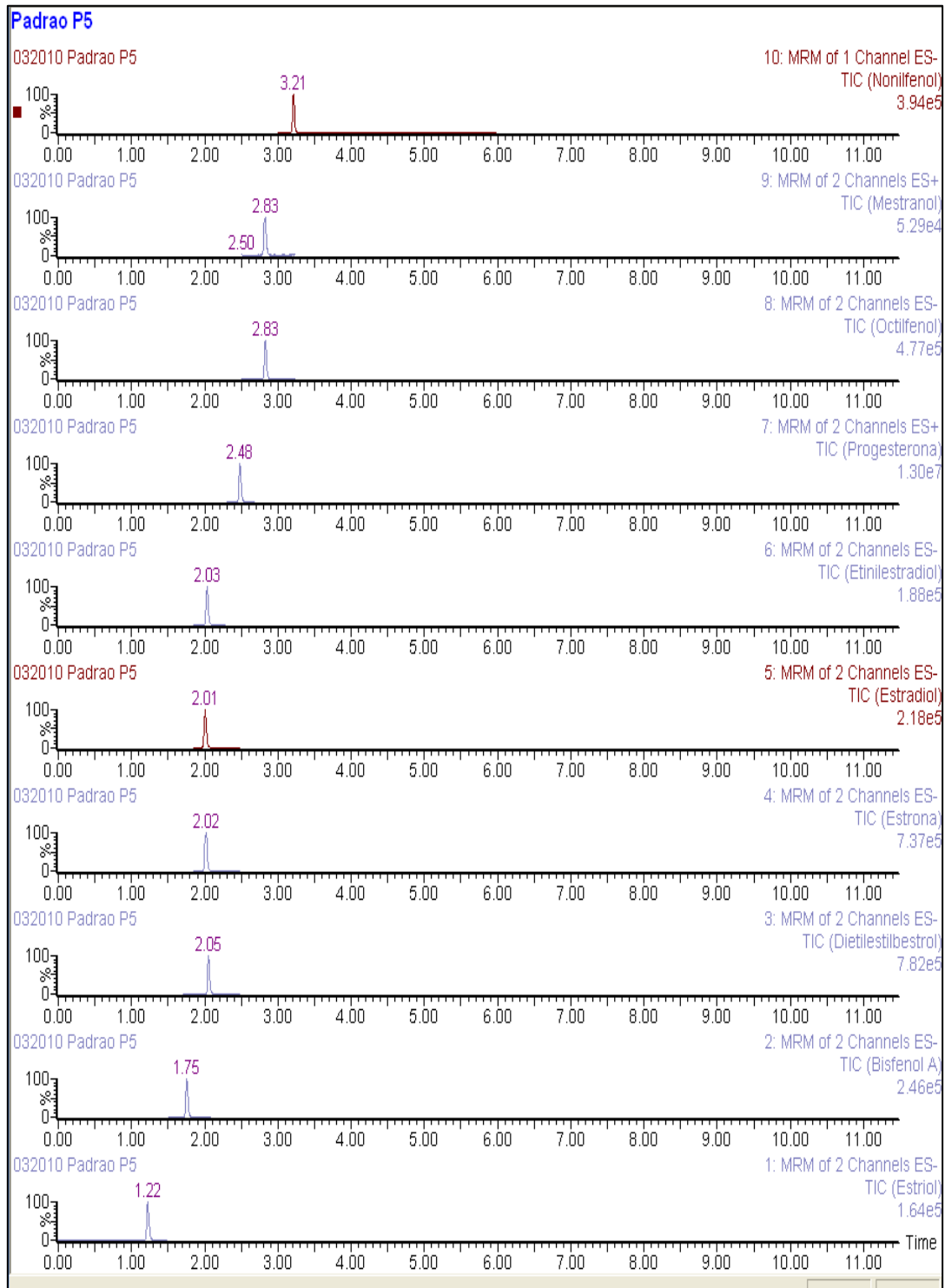


Figura 5.11. - Cromatograma característico de cada EDC em estudo

5.3. Amostras analisadas

No período compreendido entre 23 de Janeiro a 30 de Agosto de 2012, foram analisadas 84 amostras de águas da rede da EPAL e de águas residuais provenientes da ETAR de Beirolas.

Os cálculos dos LQ e LD foram baseados na gama de trabalho e na razão Sinal/ruído (S/N), tal como mencionado no Capítulo II (2.1.3.). Contudo, na discussão dos resultados serão apenas considerados dois gráficos baseados no S/N para demonstração das diferenças entre os dois métodos de cálculo dos limites.

Para cada composto em análise, foram traçados os gráficos das respetivas concentrações (ng/l) em cada uma das amostras, respetivamente, eixo das ordenadas e eixo das abcissas.

As concentrações (ng/l) de cada composto em cada uma das amostras, obtidas através do método SPE-UPLC-ESI-MS/MS (ME72, 2009), encontram-se em anexo (Anexo III - Água da rede da EPAL; Anexo IV - Água da ETAR de Beirolas).

5.3.1. Águas da rede da EPAL (n=60)

1. Estriol

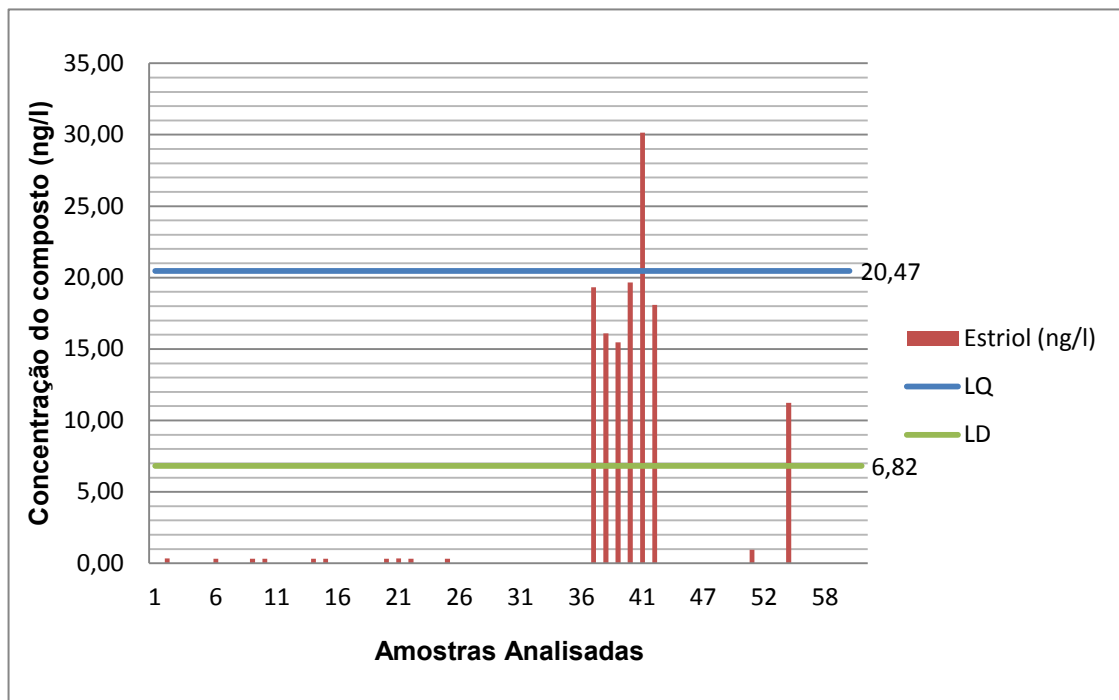


Figura 5.12. - Concentrações (ng/l) de estriol em cada uma das 60 amostras de água da rede da EPAL, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

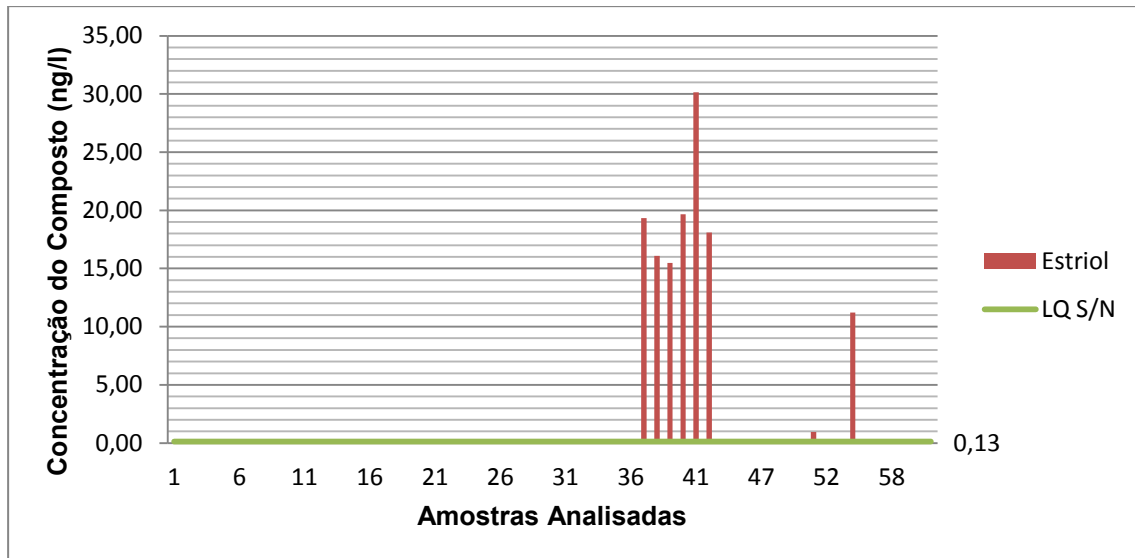


Figura 5.13. - Concentrações de estriol em cada uma das 60 amostras de água da rede da EPAL, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na razão sinal/ruído (S/N)

O LQ e o LD calculados para o estriol são, respectivamente, 20,47 ng/l e 6,82 ng/l. para a gama de trabalho e 0,13 ng/l para o S/N.

Considerando a gama de trabalho (Figura 5.12.), das 60 amostras analisadas, 7 ultrapassam o LD calculado para o estriol, sendo que apenas uma dessas tem uma concentração acima do LQ.

As amostras com valores de estriol acima do LD correspondem a 2 estações elevatórias, 4 reservatórios e a uma captação subterrânea, sendo esta última a única que ultrapassa o LQ, tendo uma concentração de 30,15 ng/l.

Considerando a razão S/N (Figura 5.13.), das 60 amostras analisadas, 8 amostras ultrapassam o LQ calculado para o estriol, uma vez que este corresponde a um valor de concentração muito inferior aos LQ e LD baseados na gama de trabalho. Assim sendo, as 8 amostras contêm concentrações de Estriol quantificáveis para os limites baseados na razão S/N.

Excluiu-se o LD baseado no S/N da Figura 5.13. pois este apresenta valores muito reduzidos, quando comparado com os valores de LQ. Assim, uma vez que as 7 amostras ultrapassam este último limite analítico, também são superiores ao LD, pelo que as amostras possuem concentrações de estriol passíveis de serem detetadas e quantificadas, de acordo com a razão S/N.

2. Bisfenol A

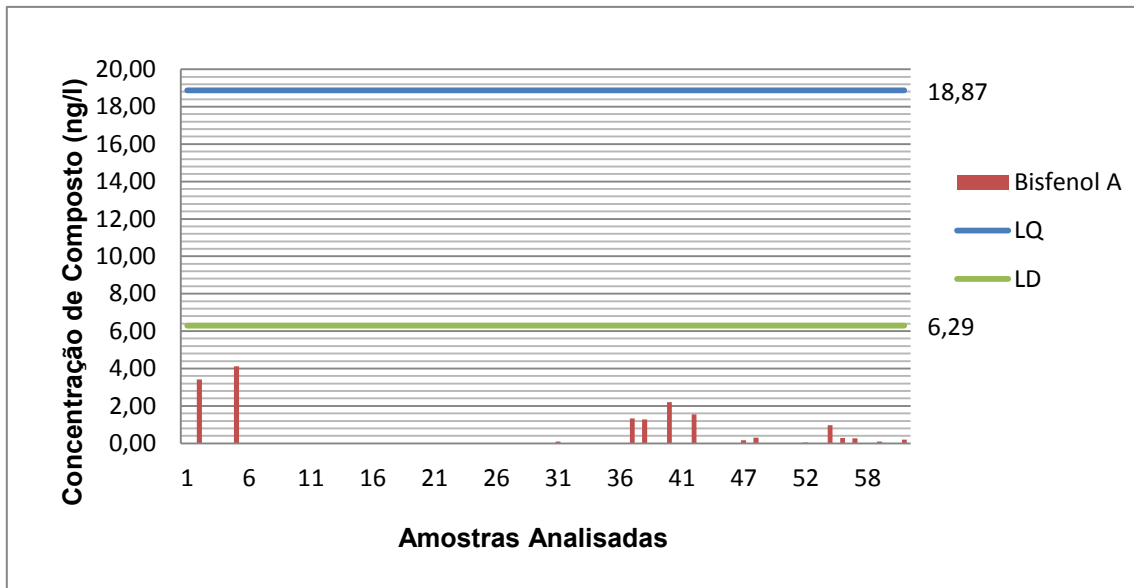


Figura 5.14. - Concentrações de bisfenol A em cada uma das 60 amostras de água da rede da EPAL, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

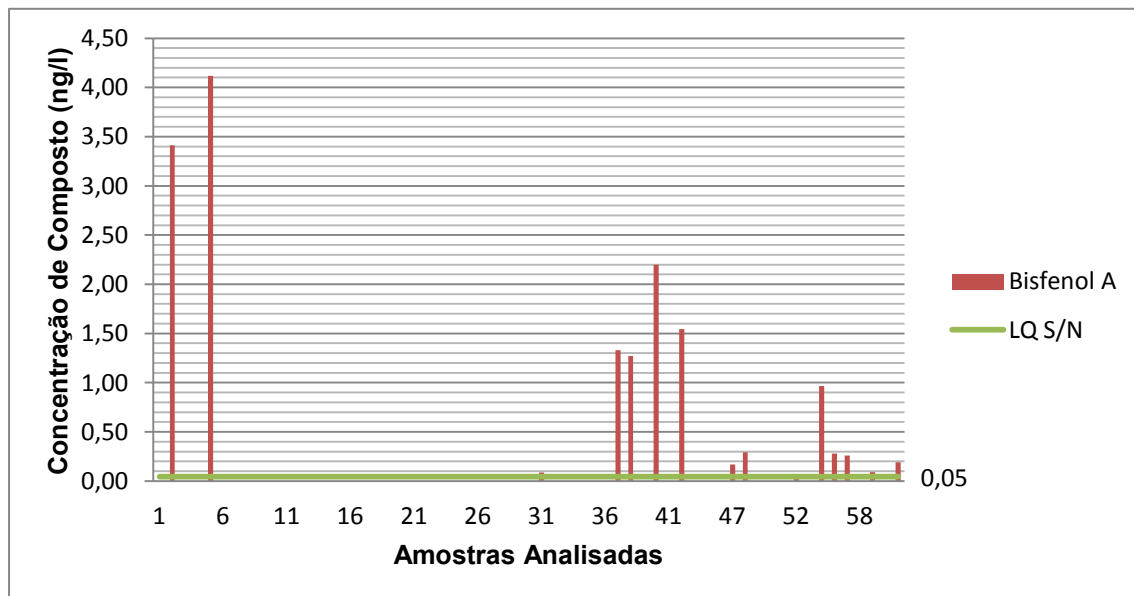


Figura 5.15. - Concentrações de bisfenol A em cada uma das 60 amostras de água da rede da EPAL, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na relação sinal/ruído (S/N)

O LQ e o LD calculados para o bisfenol A são, respetivamente, 18,87 ng/l e 6,29 ng/l. para a gama de Trabalho, sendo que o LQ calculado a partir da razão S/N corresponde a 0,05 ng/l.

Tendo em consideração a gama de trabalho (Figura 5.14.) e os LD e LQ a ela associados, podemos concluir que das 60 amostras analisadas nenhuma possui valores de concentração tais que ultrapassem os limites calculados. Contudo isto não quer dizer que não tenham sido detetadas concentrações, embora bastante diminutas, de bisfenol A nas amostras.

Se considerarmos o cálculo do LQ baseado na razão S/N (Figura 5.15.), podemos verificar que existem 14 amostras cujas concentrações são superiores ao LQ. Assim sendo, são quantificáveis essas concentrações de bisfenol A para uma amostra de uma captação subterrânea, uma amostra de uma captação superficial, duas amostras provenientes de estações elevatórias, 10 amostras de reservatórios.

Tal como o explicado para o caso do estriol, os valores de LD baseados no S/N são de tal forma reduzidos que optou-se por excluir a reta do LD da Figura 5.15., para que a leitura do gráfico seja possível.

3. Dietilestilbestrol

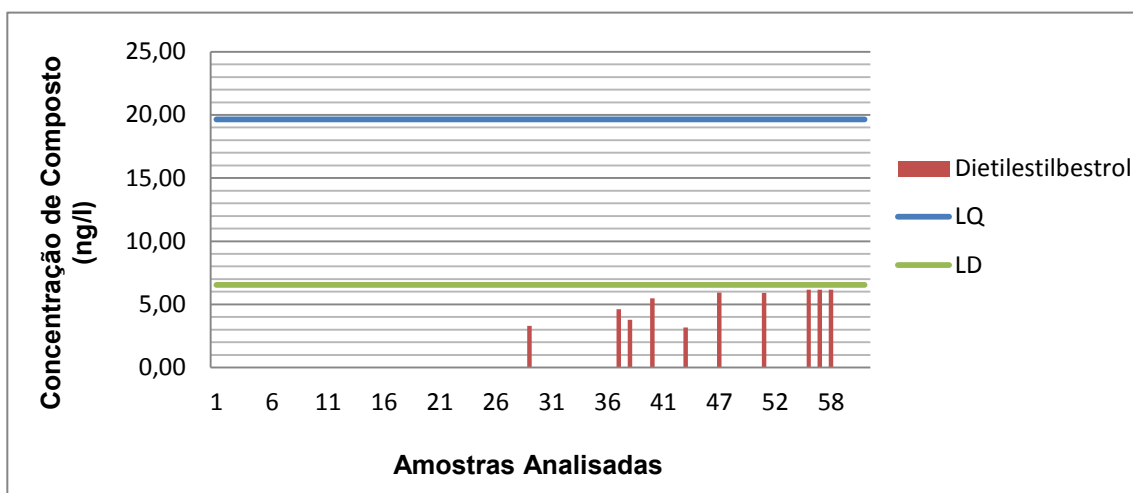


Figura 5.16. - Concentrações de dietilestilbestrol em cada uma das 60 amostras de água da rede da EPAL, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

O LQ e o LD calculados para o dietilestilbestrol são, respetivamente, 19,63 ng/l e 6,54 ng/l, tendo como base o primeiro padrão da gama de trabalho.

As concentrações obtidas para o dietilestilbestrol não ultrapassam os valores de LD e LQ calculados para a gama de trabalho. Assim sendo, não foi quantificada a presença deste composto em qualquer uma das 60 amostras. Contudo, existem concentrações bastante próximas de LD, o que pode significar que o dietilestilbestrol poderá ser detetado em determinadas amostras (como é o caso das 3 últimas barras da Figura 5.16.), ainda que em concentrações inferiores ao LD.

O LQ calculado para o dietilestilbestrol baseado na razão S/N é de 0,24 ng/l. Assim sendo, com base neste LQ, existem 10 amostras que possuem concentrações do composto em estudo passíveis de serem quantificadas.

4. Estrona

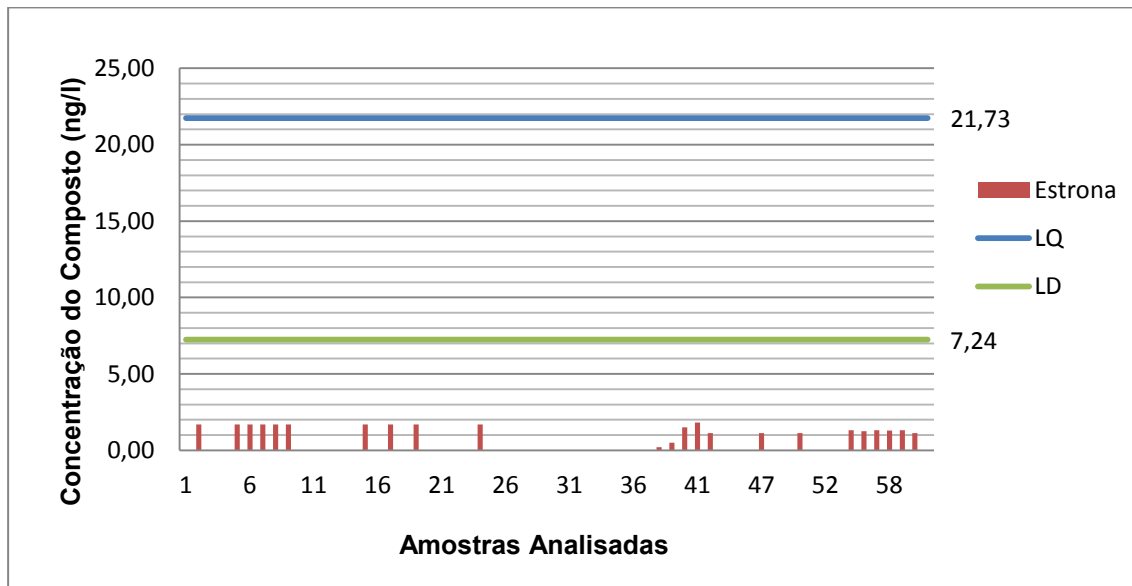


Figura 5.17. - Concentrações de estrona em cada uma das 60 amostras de água da rede da EPAL, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

O LQ e o LD calculados para a estrona são, respetivamente, 21,73 ng/l e 7,24 ng/l. para a gama de trabalho.

Tendo em consideração a gama de trabalho (Figura 5.17.), podemos concluir que das 60 amostras analisadas nenhuma possui valores de concentração que ultrapassem os limites calculados. Assim sendo, não há concentrações de estrona nas amostras que possibilitem a sua deteção e quantificação, pelo que assume-se que não há presença deste composto nas amostras de água de rede da EPAL.

O LQ calculado para a estrona baseado na razão S/N é de 0,37 ng/l. Assim sendo, com base neste LQ, existem 22 amostras que possuem concentrações do composto em estudo passíveis de serem quantificadas.

5. Estradiol

Após análise das amostras de água provenientes da rede da EPAL, pelo método SPE-UPLC-ESI-MS/MS, não foram registadas quaisquer concentrações (ng/l) de estradiol.

6. Etinilestradiol

Após análise das amostras de água provenientes da rede da EPAL, pelo método SPE-UPLC-ESI-MS/MS, não foram registadas quaisquer concentrações (ng/l) de Etinilestradiol.

7. Progesterona

Após análise das amostras de água provenientes da rede da EPAL, pelo método SPE-UPLC-ESI-MS/MS, não foram registadas quaisquer concentrações (ng/l) de progesterona.

8. Octilfenol

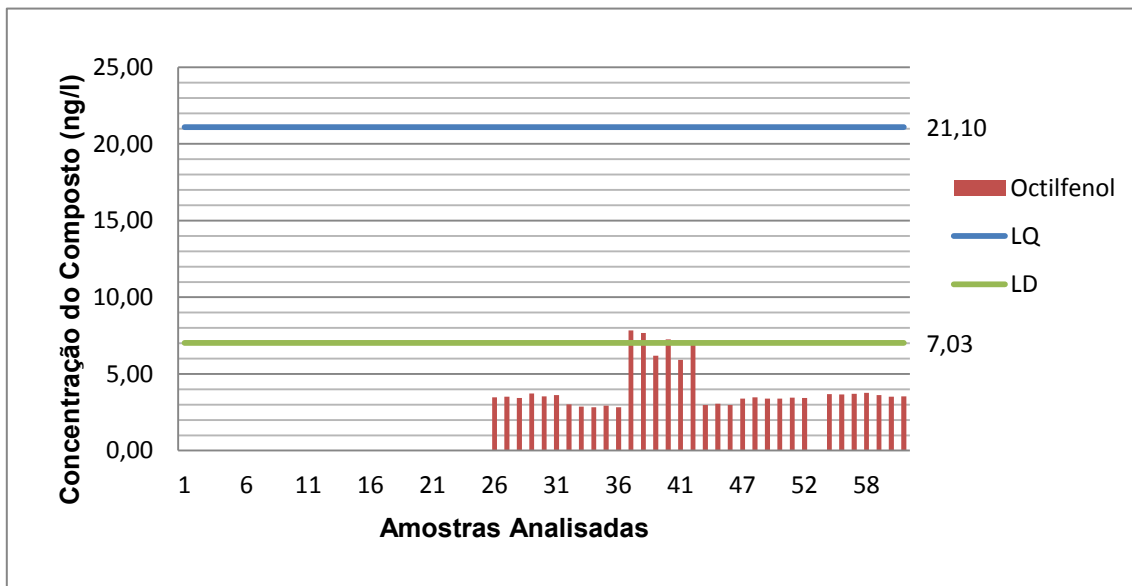


Figura 5.18. - Concentrações de octilfenol em cada uma das 60 amostras de água da rede da EPAL, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

O LQ e o LD calculados para o octilfenol são, respetivamente, 21,10 ng/l e 7,03 ng/l. para a gama de trabalho.

Considerando a gama de trabalho (Figura 5.18.), da totalidade de amostras analisadas apenas 4 possuem valores de concentração (ng/l) superiores ao LD, ou seja, foram detetadas concentrações de Octilfenol em uma amostra proveniente de uma Estação Elevatória (7,83 ng/l) e três amostras provenientes de reservatórios (7,67 ng/l, 7,24 ng/l e 6,98 ng/l). No entanto, estas concentrações encontram-se abaixo do LQ pelo que não podem ser quantificadas.

O LQ calculado para o octilfenol baseado na razão S/N é de 0,27 ng/l. Assim sendo, com base neste LQ, existem 33 amostras que possuem concentrações do composto em estudo passíveis de serem quantificadas.

Tendo em consideração que a norma de qualidade para o octilfenol corresponde a um máximo de 0,1 µg/l e que o LQ é muito inferior a este valor, não há uma preocupação relativamente à presença deste composto na águas de consumo.

9. Mestranol

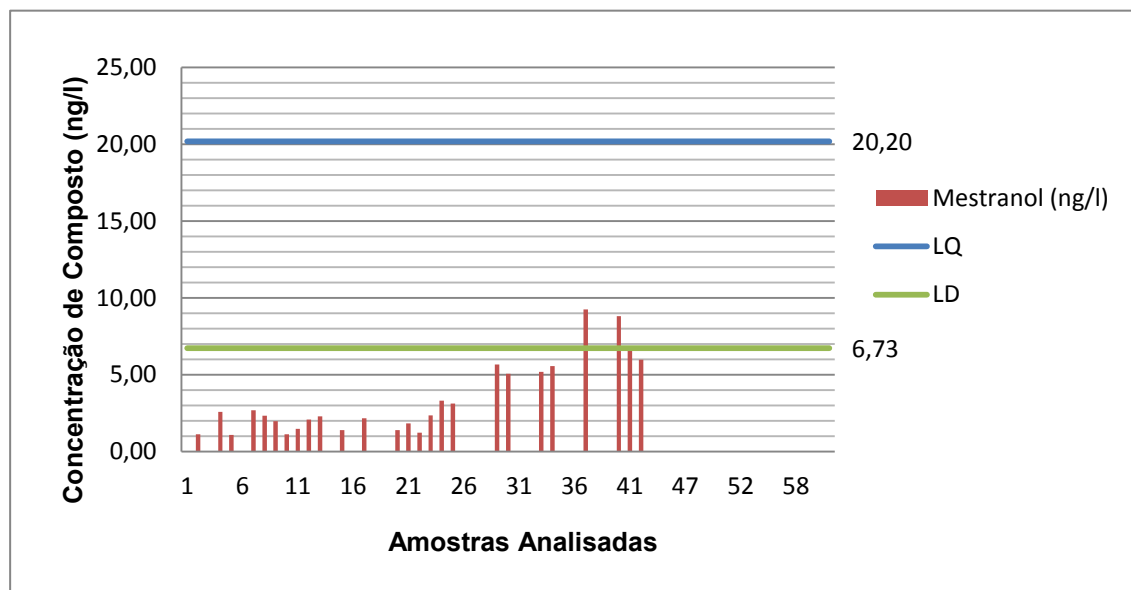


Figura 5.19. - Concentrações de mestranol em cada uma das 60 amostras de água da rede da EPAL, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

O LQ e o LD calculados para o mestranol são, respetivamente, 20,20 ng/l e 6,73 ng/l. para a gama de trabalho.

Considerando a gama de trabalho (Figura 5.19.), da totalidade de amostras analisadas apenas 3 possuem valores de concentração (ng/l) superiores ao LD, ou seja, foram detetadas concentrações de Mestranol em 2 amostras provenientes de reservatórios (9,25 e 8,81 ng/l) e numa amostra proveniente de uma captação subterrânea (6,81 ng/l). No entanto, estas concentrações encontram-se abaixo do LQ pelo que não podem ser quantificadas.

O LQ calculado para o mestranol baseado na razão S/N é de 4,12 ng/l. Assim sendo, com base neste LQ, existem 7 amostras que possuem concentrações do composto em estudo passíveis de serem quantificadas.

10. Nonilfenol

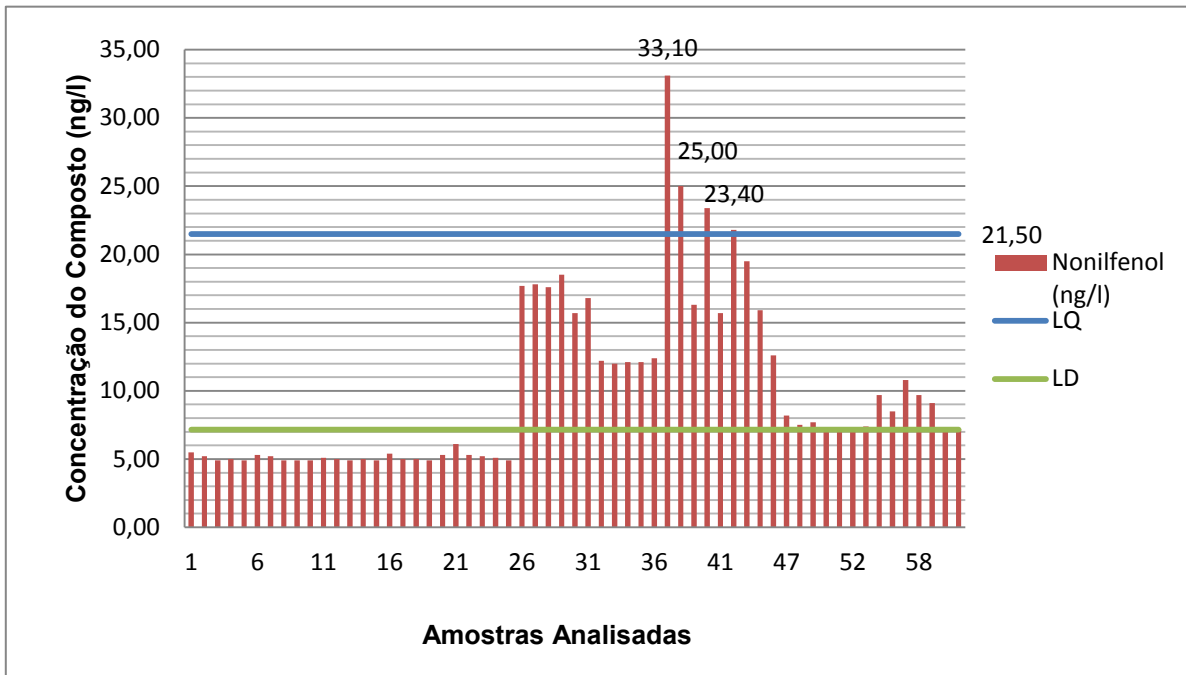


Figura 5.20. - Concentrações de nonilfenol em cada uma das 84 amostras de água da rede da EPAL, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

O LQ e o LD calculados para o nonilfenol são, respetivamente, 21,50 ng/l e 7,17 ng/l. para a gama de trabalho.

Considerando a gama de trabalho (Figura 5.20.), pode-se verificar que existe uma série de amostras cujos valores de concentração de nonilfenol estão acima do LD, ou seja, existem 28 amostras nas quais foram detetadas concentrações deste EDC. No entanto, apenas 4 destas amostras possuem valores de concentração superiores a 21,50 ng/l (LQ).

As quatro amostras cuja concentração de nonilfenol pode ser quantificada correspondem a uma estação Elevatória (33,10 µg/l) e a três reservatórios (25,00 ng/l; 23,40 ng/l; 21,80 ng/l).

O LQ calculado para o nonilfenol baseado na razão S/N é de 0,08 µg/l. Assim sendo, com base neste LQ, todas as 60 amostras possuem concentrações do composto em estudo passíveis de serem quantificadas.

Tendo em consideração que a norma de qualidade para o nonilfenol corresponde a um máximo de 0,3 µg/l e que o LQ é muito inferior a este valor, não há uma preocupação relativamente à presença deste composto nas amostras analisadas.

5.3.2. Águas da ETAR de Beirolas (n=24)

Nas amostras de água provenientes da ETAR de Beirolas, um total de 24, foram considerados 6 pontos de colheita (estação elevatória, afluente da ETAR, efluente de desarenador, efluente da decantação primária, efluente da decantação secundária e efluente de saída da ETAR) e para cada um destes pontos foram efetuadas análises através do método SPE-UPLC-ESI-MS/MS (ME 72, 2009), para a monitorização da presença de EDC nas águas residuais.

- **Estriol**

1. **Estação Elevatória**

O LD e o LQ para o Estriol, baseados na gama de trabalho, correspondem a 3,30 ng/l e 9,90 ng/l, respetivamente.

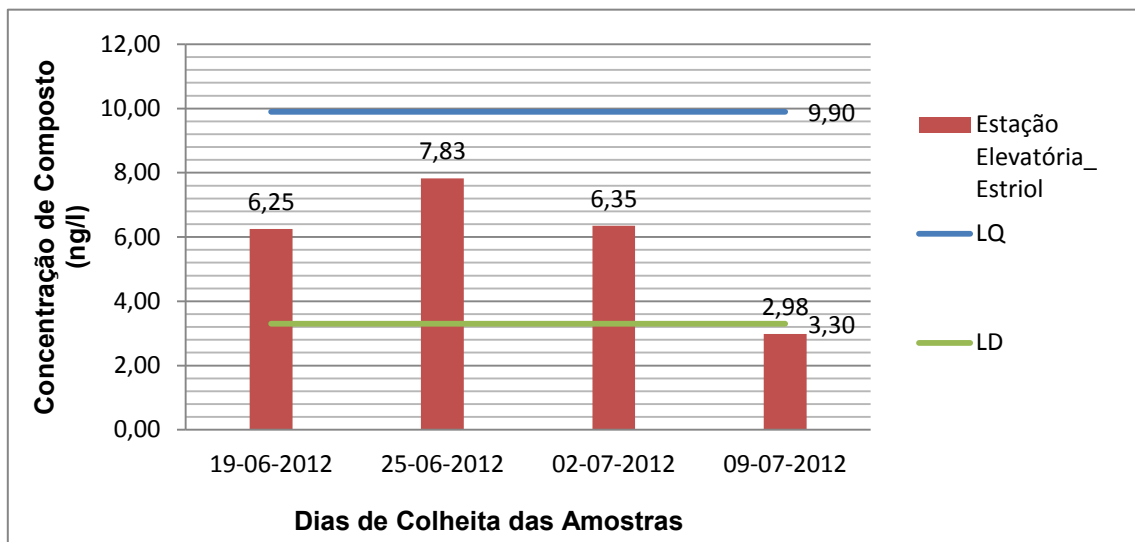


Figura 5.21. - Concentrações de estriol em cada uma das 4 amostras provenientes da estação elevatória, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

Considerando a gama de trabalho (Figura 5.21.), podemos verificar que das quatro amostras provenientes da estação elevatória, apenas a correspondente ao dia 9 de Julho se encontra inferior ao LD, não sendo à partida detetado o estriol nessa amostra. Contudo, apesar das três primeiras terem concentrações que possam ser detetadas (acima de 3,3 ng/l), nenhuma delas se encontra acima do LQ, logo não são quantificáveis valores de concentração de estriol nas amostras provenientes da estação elevatória em estudo.

2. Afluente da ETAR

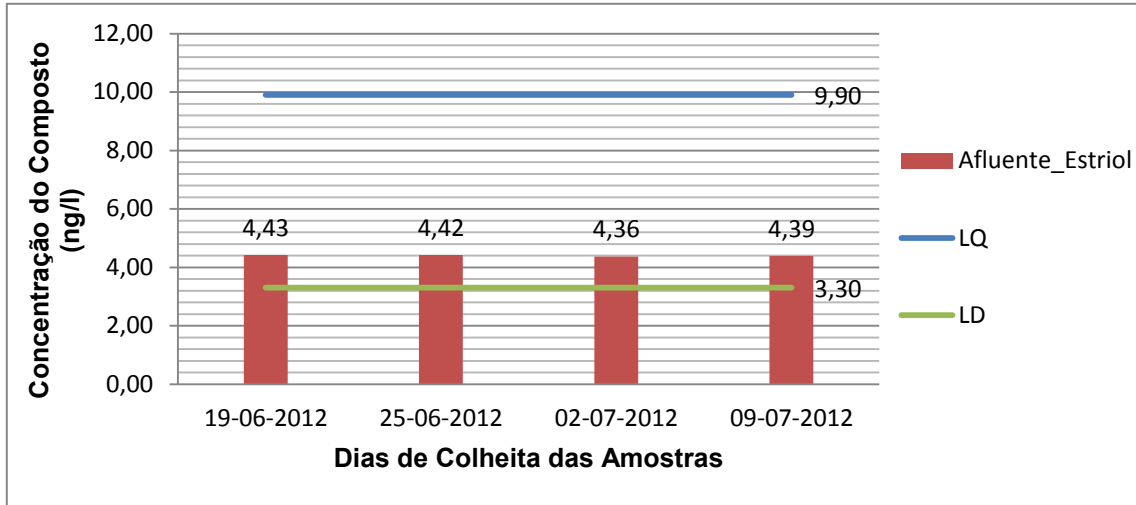


Figura 5.22. - Concentrações de estriol em cada uma das 4 amostras provenientes do afluente da ETAR, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

Tendo como base a gama de trabalho (Figura 5.22.), podemos verificar que as quatro amostras provenientes do afluente da ETAR encontram-se acima do LD, sendo por isso o estriol detetado nas amostras. Contudo, nenhuma das amostras possui concentrações (ng/l) que ultrapassem o valor de LQ e, assim sendo, não são quantificáveis valores de concentração do composto no afluente da ETAR em estudo.

3. Efluente do desarenador

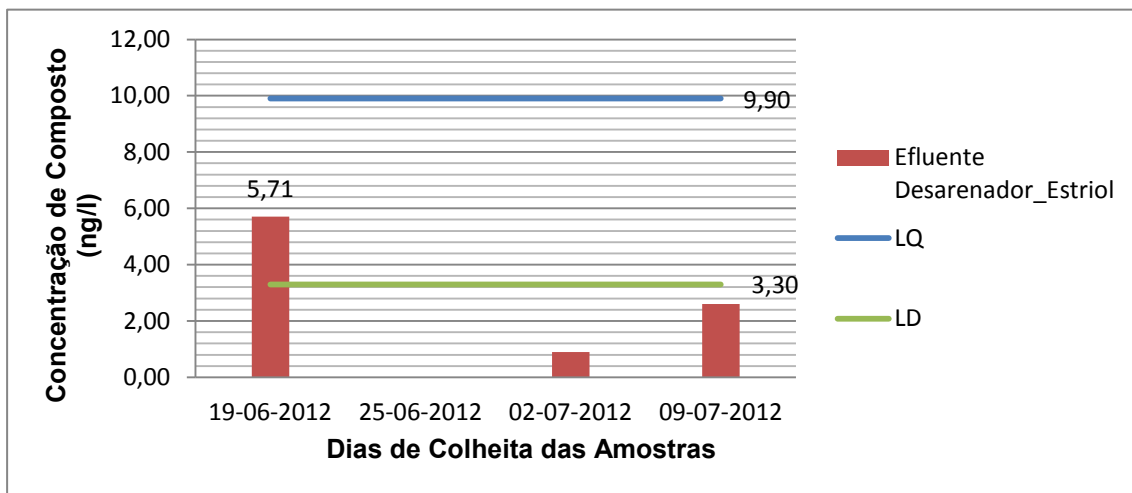


Figura 5.23. - Concentrações de estriol em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente do desarenador, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

Das quatro amostras recolhidas do efluente do desarenador da ETAR, podemos concluir através da Figura 5.23. que apenas a amostra do dia 19 de Junho possui uma concentração estimada

(ng/l) de estriol acima do LD. Contudo, apesar da concentração de estriol ser detetável, não é quantificável pois encontra-se abaixo do LQ.

As amostras dos dias 25 de Junho, 2 de Julho e 9 de Julho não possuem valores de concentração de estriol que permitam a deteção deste composto.

4. Efluente da decantação primária

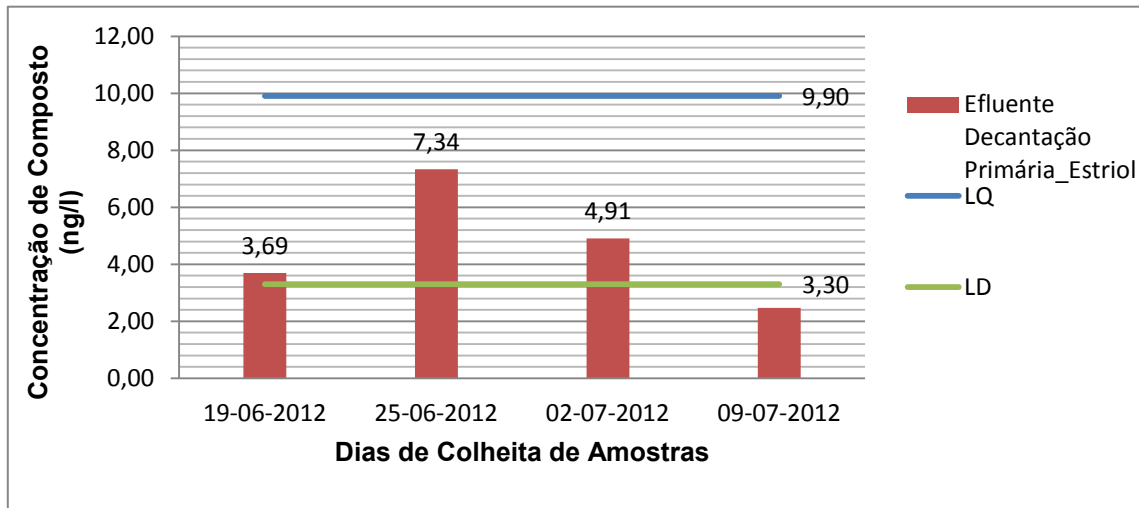


Figura 5.24. - Concentrações de estriol em cada uma das 4 amostras provenientes do Efluente da decantação primária, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na Gama de Trabalho

Considerando a gama de trabalho (Figura 5.24.), podemos verificar que das quatro amostras provenientes do efluente da decantação primária, apenas a correspondente ao dia 9 de Julho apresenta uma concentração (ng/l) encontra inferior ao LD, não sendo à partida detetado o estriol nessa amostra. Contudo, apesar das três primeiras amostras terem concentrações que possam ser detetadas (acima de 3,3 ng/l), nenhuma delas se encontra acima do LQ, logo não são quantificáveis valores de concentração de estriol nas amostras provenientes do efluente em estudo.

5. Efluente da decantação secundária e efluente de saída da ETAR

No que diz respeito aos pontos de colheita do efluente de decantação secundária e o efluente de saída da ETAR, não existem concentrações de estriol registadas na análise.

- **Bisfenol A**

O LD e o LQ para o bisfenol A, baseados na gama de trabalho, correspondem a 3,27 ng/l e 9,80 ng/l, respetivamente.

1. Estação Elevatória

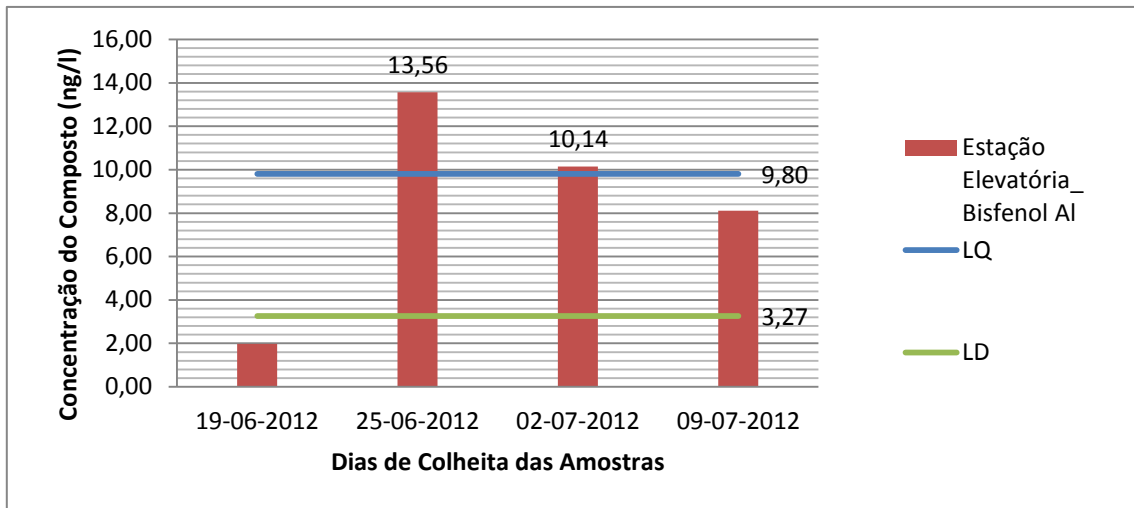


Figura 5.25. - Concentrações de bisfenol A em cada uma das 4 amostras provenientes da estação elevatória, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

Considerando a Figura 5.25., podemos verificar que apenas a amostra do dia 19 de Junho de 2012 possui uma concentração (ng/l) de bisfenol A inferior ao LD, pelo que o composto não pode ser identificado ou quantificado na amostra.

As amostras dos dias 25 de Junho e 2 de Julho de 2012 possuem valores de concentração (ng/l) acima de ambos os limites analíticos. Assim sendo, estas duas amostras provenientes da estação elevatória em estudo possuem concentrações de bisfenol A passíveis de serem discutidas qualitativa e quantitativamente.

A amostra do dia 9 de Julho de 2012 apenas possui uma concentração (8,12 ng/l) tal que ultrapassa o LD, não sendo contudo superior ao LQ. Isto significa que o bisfenol A pode ser detetado na amostra mas não pode ser quantificado.

2. Afluente da ETAR

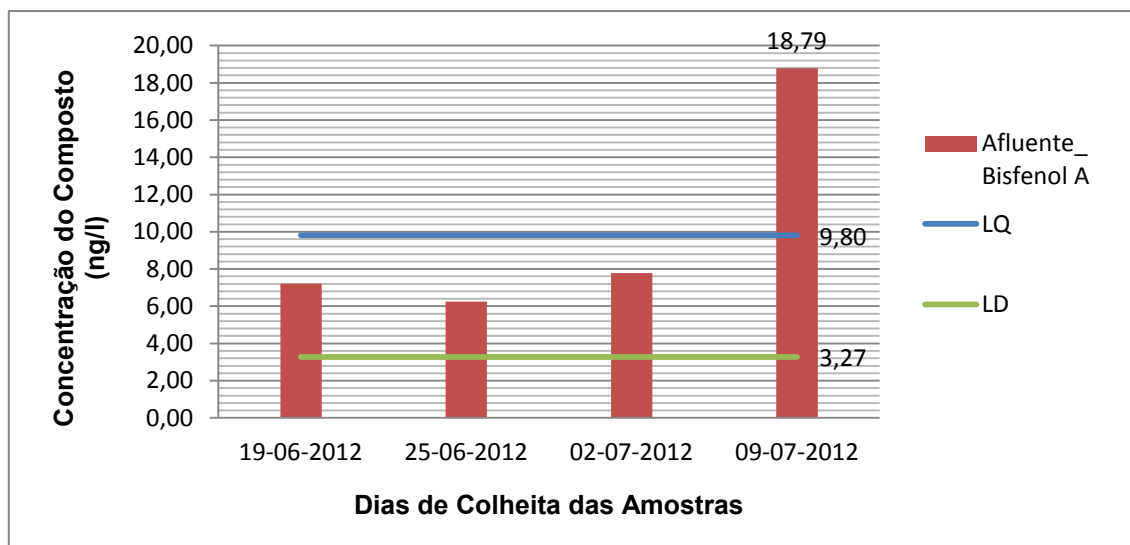


Figura 5.26. - Concentrações de Bisfenol A em cada uma das 4 amostras provenientes do afluente da ETAR, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na Gama de Trabalho

Nas quatro amostras provenientes do afluente da ETAR, podemos observar (Figura 5.26.) claramente que em todas elas é possível detetar bisfenol A, uma vez que todas possuem concentrações superiores ao LD.

A amostra correspondente ao dia 9 de Julho de 2012 possui uma concentração de, aproximadamente, 18,8 ng/l, quase o dobro do LQ. Assim sendo, esta é a única amostra passível de ser caracterizada quantitativamente.

3. Efluente do desarenador

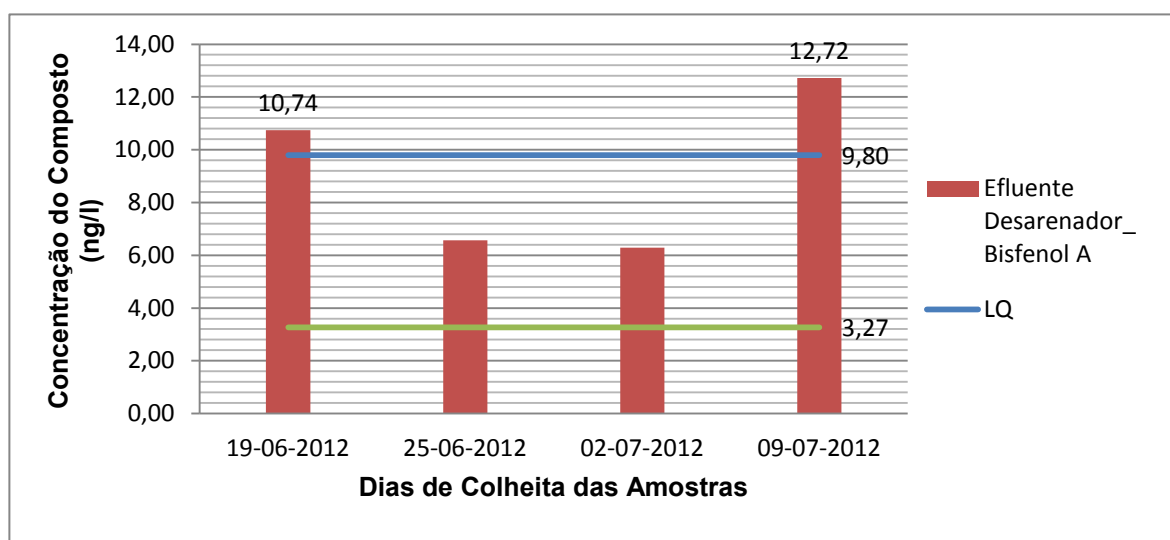


Figura 5.27. - Concentrações de bisfenol A em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente do desarenador, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

Considerando a Figura 5.27.,podemos verificar que as quatro amostras provenientes do efluente do desarenador da ETAR possuem concentrações de bisfenol A superiores ao LD, ou seja, em todas as amostras foram detetados vestígios do composto. Contudo, apenas as amostras correspondentes aos dias 19 de Junho e 9 de Julho de 2012 apresentam valores superiores ao LQ (10,74 ng/l e 12,72 ng/l, respetivamente), pelo que só nestas duas são quantificáveis os valores de bisfenol A presentes.

4. Efluente da decantação primária da ETAR

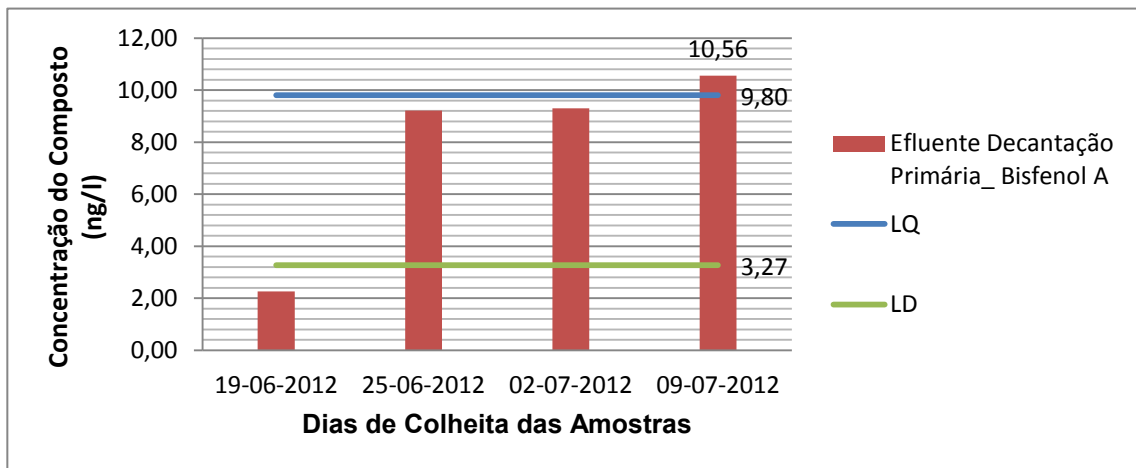


Figura 5.28. - Concentrações de bisfenol A em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente da decantação primária, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

Atendendo à informação fornecida pelo gráfico (Figura 5.28.), das quatro amostras de efluente proveniente do decantador primário, apenas a de dia 19 de Junho de 2012 possui valores de concentração inferiores a ambos os limiares analíticos, sendo que nas amostras dos dias 25 de Junho e 2 de Julho confirma-se a presença do bisfenol A mas em quantidades não quantificáveis.

A amostra correspondente ao último dia de colheita possui uma concentração de 10,56 ng/l, aproximadamente, valor superior ao LQ e que, assim sendo, permite a quantificação do bisfenol A na amostra em questão.

5. Efluente da decantação secundária da ETAR

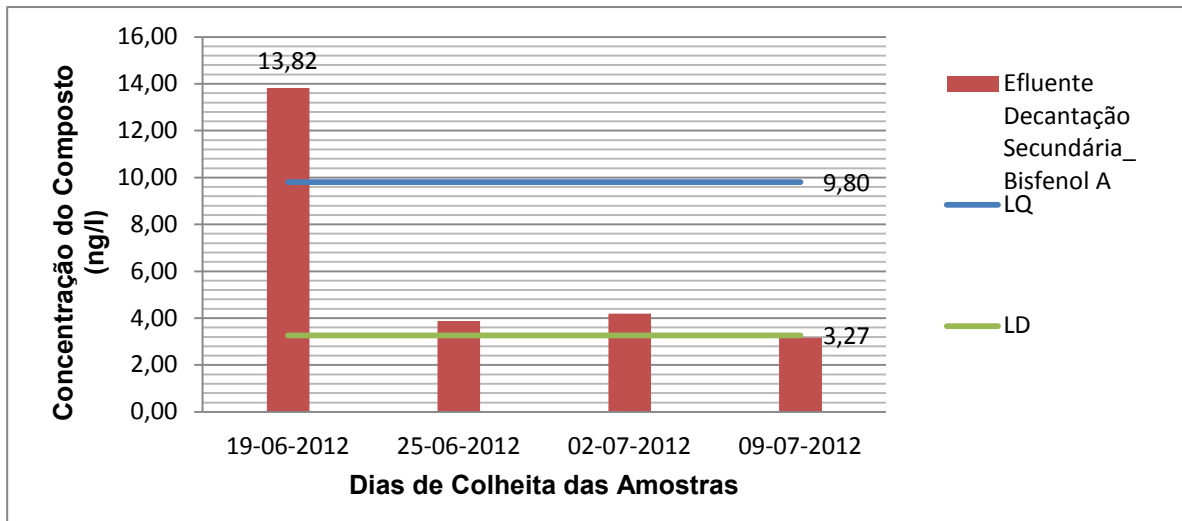


Figura 5.29. - Concentrações de bisfenol A em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente da decantação secundária, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

Considerando a Figura 5.29, podemos verificar que as três primeiras amostras provenientes do efluente da decantação secundária da ETAR possuem concentrações de bisfenol A superiores ao LD, ou seja, foram detetados vestígios do composto. Contudo, apenas a amostra correspondente ao dia 19 de Junho de 2012 apresenta concentração do composto superior ao LQ (13,82 ng/l), sendo possível a quantificação do composto em estudo.

A amostra do dia 9 de Julho de 2012 possui uma concentração de bisfenol A de 3,20 ng/l, quase idêntica ao LD. Assim sendo, consideraremos que também nesta amostra seja possível identificar a presença do composto, embora não seja quantificável.

6. Efluente de saída da ETAR

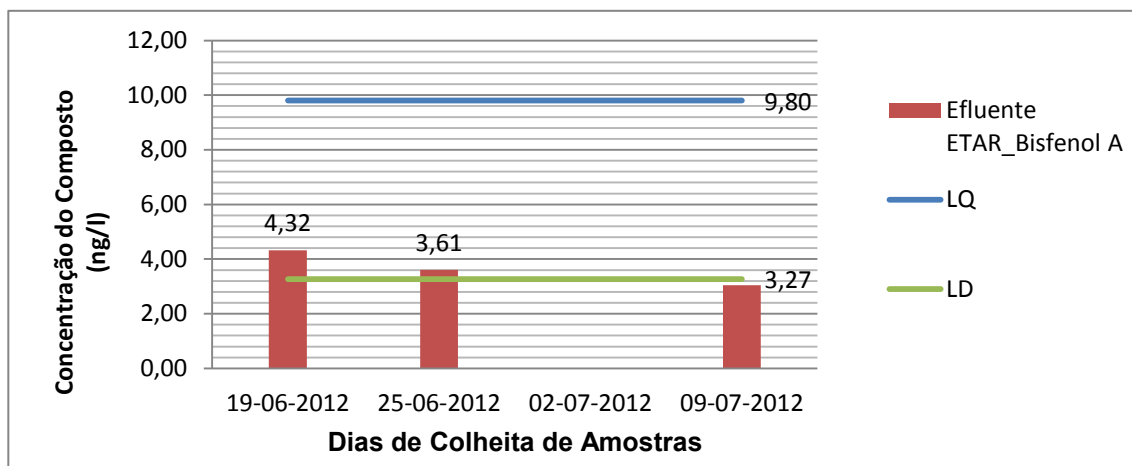


Figura 5.30. - Concentrações de bisfenol A em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente de saída da ETAR, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

Relativamente à presença de bisfenol A nas amostras provenientes do efluente de saída da ETAR, atentando à Figura 5.30., podemos concluir que em nenhuma das quatro amostras há uma concentração (ng/l) do composto que permita uma quantificação, ou seja, não há valores superiores ao LQ. Contudo, podemos considerar que, excetuando a amostra do dia 2 de Julho de 2012, todas as amostras possuem concentrações do composto em estudo que permitem a sua deteção, sendo estas superiores ao LD.

- **Dietilestilbestrol**

Em qualquer um dos seis pontos de colheita de amostras de água residual, não foram registados quaisquer valores de concentração de dietilestilbestrol, após análise laboratorial pelo método SPE-UPLC-ESI-MS/MS.

- **Estrona**

Relativamente à estrona, em qualquer um dos seis pontos de colheita de amostras de água residual, os valores de concentração registados, após análise laboratorial pelo método SPE-UPLC-ESI-MS/MS, são muito reduzidos, não sendo possível identificação do composto em estudo.

- **Estradiol**

Em qualquer um dos seis pontos de colheita de amostras de água residual, não foram registados quaisquer valores de concentração (ng/l) de estradiol, após análise laboratorial pelo método SPE-UPLC-ESI-MS/MS.

- **Etinilestradiol**

Em qualquer um dos seis pontos de colheita de amostras de água residual, não foram registados quaisquer valores de concentração (ng/l) de etinilestradiol, após análise laboratorial pelo método SPE-UPLC-ESI-MS/MS.

- **Progesterona**

Em qualquer um dos seis pontos de colheita de amostras de água residual, não foram registados quaisquer valores de concentração (ng/l) de progesterona, após análise laboratorial pelo método SPE-UPLC-ESI-MS/MS.

- **Octilfenol**

Relativamente ao octilfenol, em qualquer um dos seis pontos de colheita de amostras de água residual, os valores de concentração registados, após análise laboratorial pelo método SPE-UPLC-ESI-MS/MS, são muito reduzidos, impossibilitando a identificação do composto em estudo.

- **Mestranol**

O LD e o LQ para o Mestranol, baseados na gama de trabalho, correspondem a 3,27 ng/l e 10,40 ng/l, respetivamente.

1. Estação Elevatória

Para a estação elevatória, não foram registados quaisquer valores de concentração de mestranol, após análise laboratorial pelo método SPE-UPLC-ESI-MS/MS.

2. Afluente da ETAR

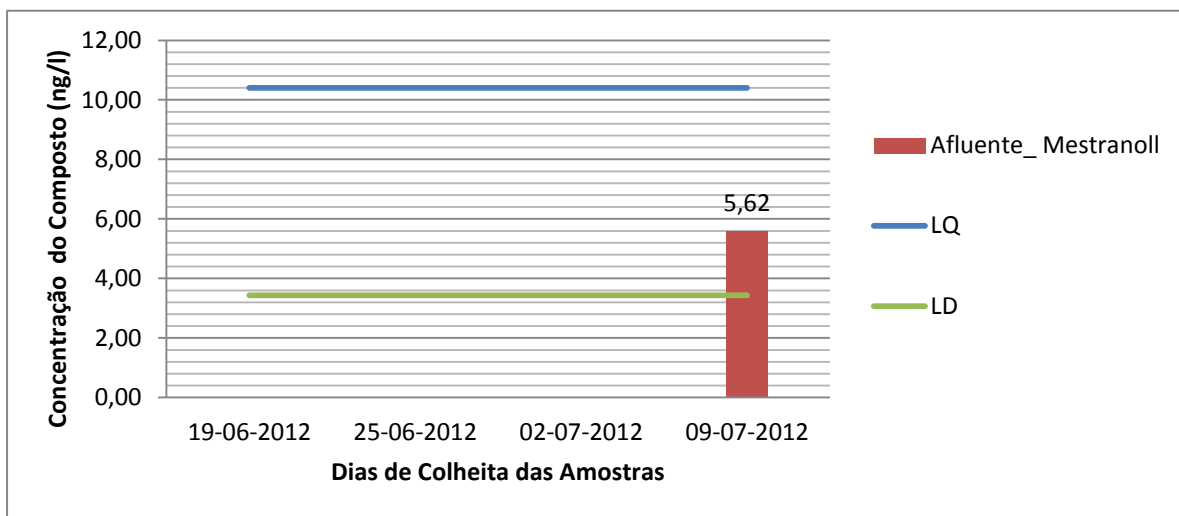


Figura 5.31. - Concentrações de mestranol em cada uma das 4 amostras provenientes do afluente da ETAR, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

Atendendo ao apresentado na Figura 5.31., podemos concluir que existe apenas registo de concentração no dia 9 de Julho de 2012, sendo que a concentração registada (5,61 ng/l) é superior ao LD. Assim sendo, existe uma concentração tal que permite a identificação do mestranol na amostra.

3. Efluente do desarenador

Para o efluente proveniente do desarenador, não foram registados quaisquer valores de concentração (ng/l) de mestranol, após análise laboratorial pelo método SPE-UPLC-ESI-MS/MS.

4. Efluente de decantação primária

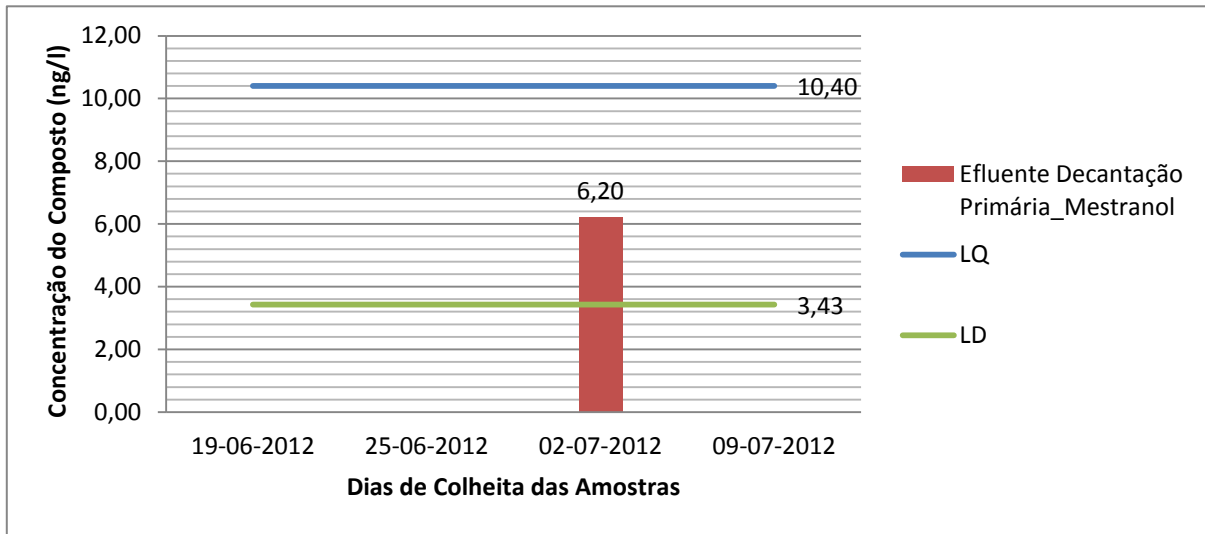


Figura 5.32. - Concentrações de mestranol em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente de decantação primária, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

Para o efluente proveniente da decantação primária (Figura 5.32.), houve apenas registo de concentração de composto no dia 2 de Julho de 2012. Este registo (6,20 ng/l) é superior ao LD calculado para o mestranol, permitindo a identificação deste composto na amostra analisada.

5. Efluente de decantação secundária

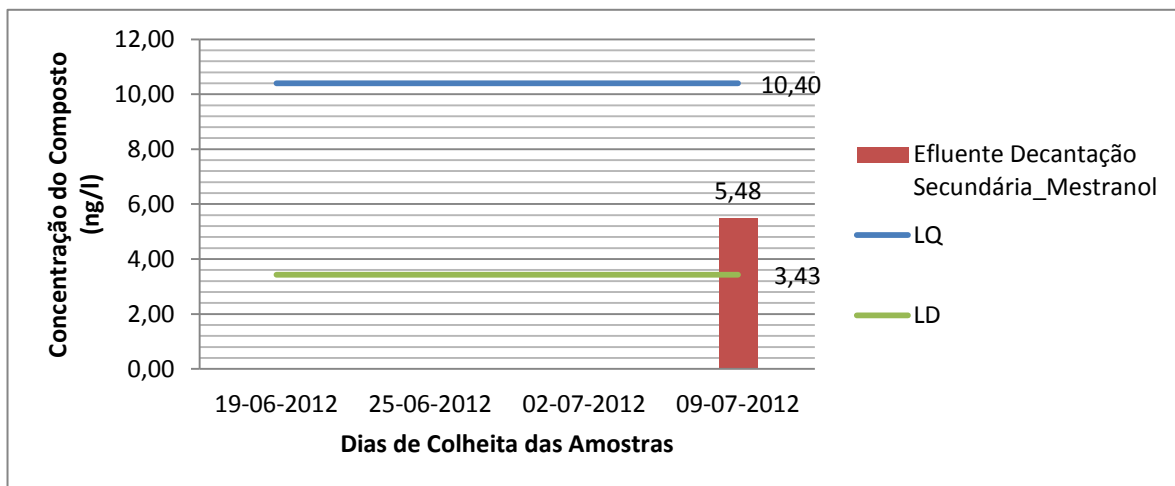


Figura 5.33. - Concentrações de mestranol em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente de decantação secundária, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

Nas amostras provenientes da decantação secundária (Figura 5.33.), há registo de concentração no dia 9 de Julho de 2012. Este registo de 5,48 ng/l ultrapassa o limiar analítico de 3,43 ng/l (LD) e, assim sendo, é possível identificar o mestranol na amostra correspondente ao último dia de colheitas.

6. Efluente de saída da ETAR

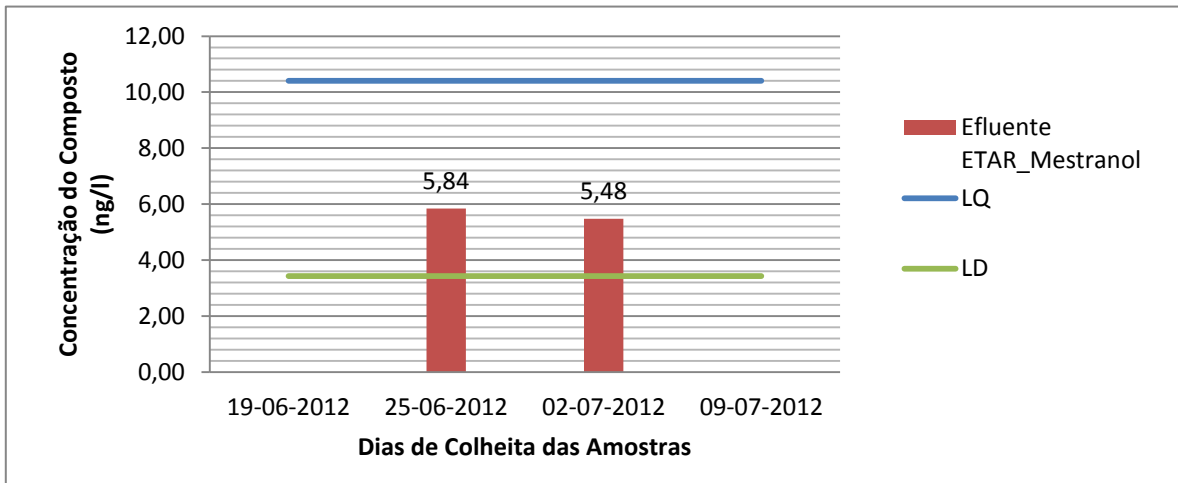


Figura 5.34. - Concentrações de mestranol em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente de saída da ETAR, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

Considerando a Figura 5.34., podemos verificar que foram detetadas concentrações de mestranol nas amostras correspondentes aos dias 25 de Junho e 2 de Julho de 2012. Esta deteção é possível pois foram estimadas concentrações de 5,84 e 5,48 ng/l, superiores ao LD.

- Nonilfenol

O LD e o LQ para o nonilfenol, baseados na gama de trabalho, correspondem a 3,27 ng/l e 9,8 ng/l, respetivamente.

1. Estação Elevatória

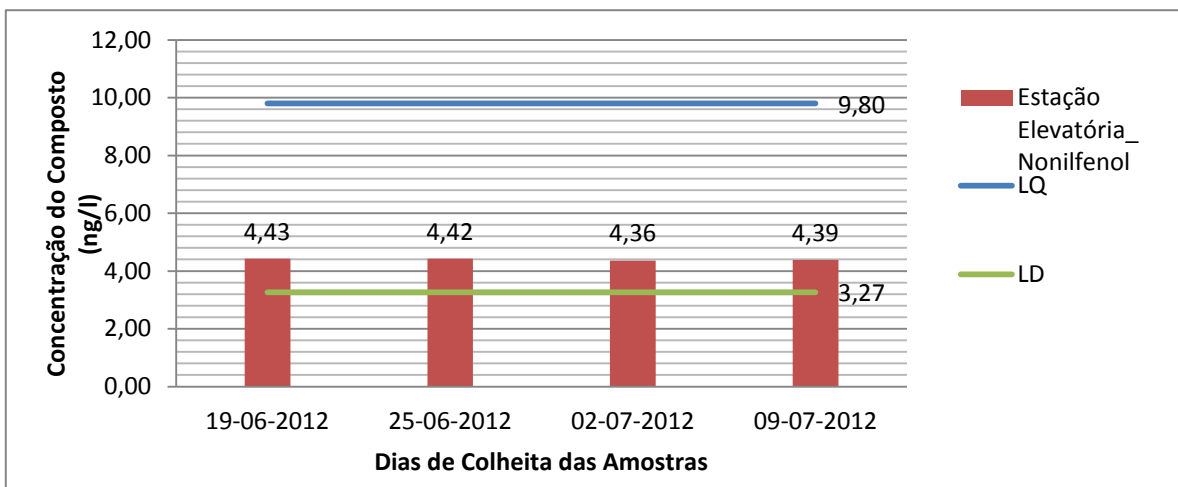


Figura 5.35. - Concentrações de nonilfenol em cada uma das 4 amostras provenientes da estação elevatória, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

Considerando a Figura 5.35., podemos verificar que qualquer uma das quatro amostras possui valores de concentração (ng/l) de nonilfenol superiores ao LD, pelo que é possível detetar o composto em estudo nas amostras analisadas.

2. Afluente da ETAR

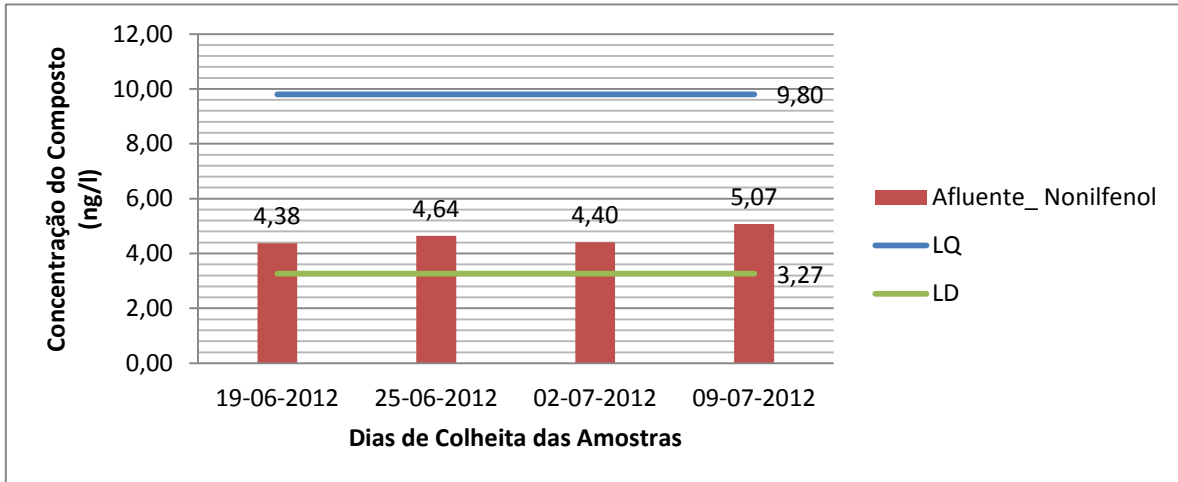


Figura 5.36. - Concentrações de nonilfenol em cada uma das 4 amostras provenientes da do afluente da ETAR, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

Para o afluente da ETAR (Figura 5.36.), em qualquer um dos dias de colheita de amostras foram registados valores de concentração (ng/l) tais que permitem a identificação do nonilfenol. Esta identificação é possível pois os ditos valores ultrapassam o LD calculado para este composto.

3. Efluente do desarenador

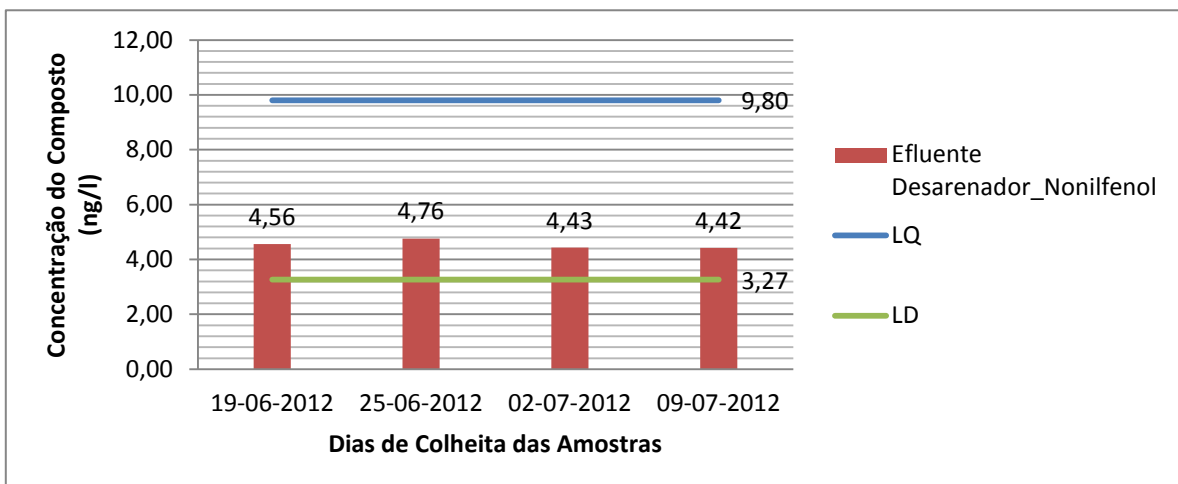


Figura 5.37. - Concentrações de nonilfenol em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente do desarenador, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

Considerando a Figura 5.37., podemos verificar que todas as amostras possuem valores de concentração (ng/l) superiores ao LD, pelo que é possível detetar-se a presença de nonilfenol através da análise.

Uma vez que os valores são inferiores ao LQ, não é possível quantificar o nonilfenol nas amostras de água provenientes do efluente do desarenador.

4. Efluente da decantação primária

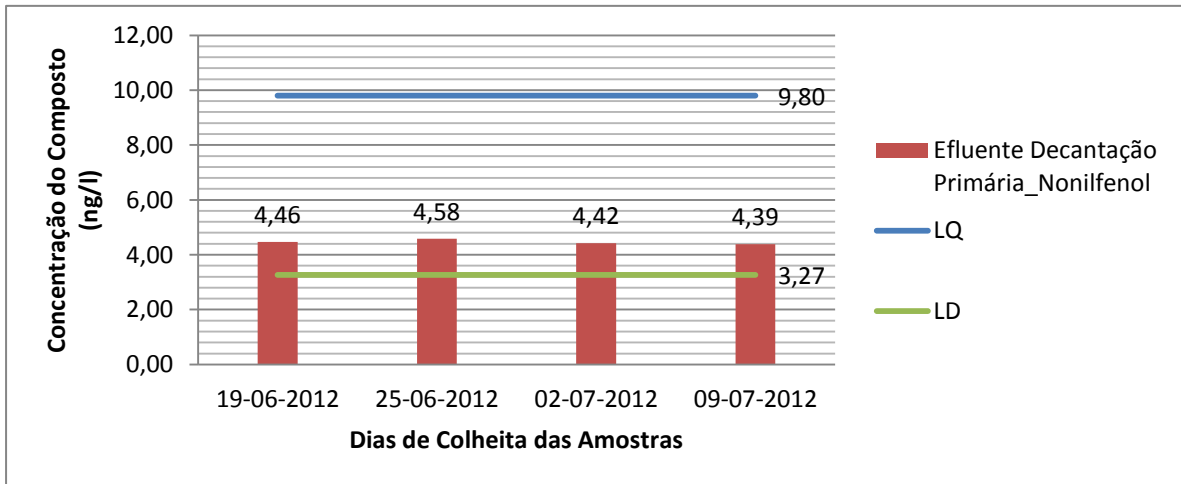


Figura 5.38. - Concentrações de nonilfenol em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente da decantação primária, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

Atendendo à Figura 5.38., houve registo de valores de concentração (ng/l) nos quatro dias de colheita de amostras. Estes valores são superiores ao LD e inferiores ao LQ, pelo que o nonilfenol pode ser identificado nas amostras mas não quantificado.

5. Efluente da decantação secundária

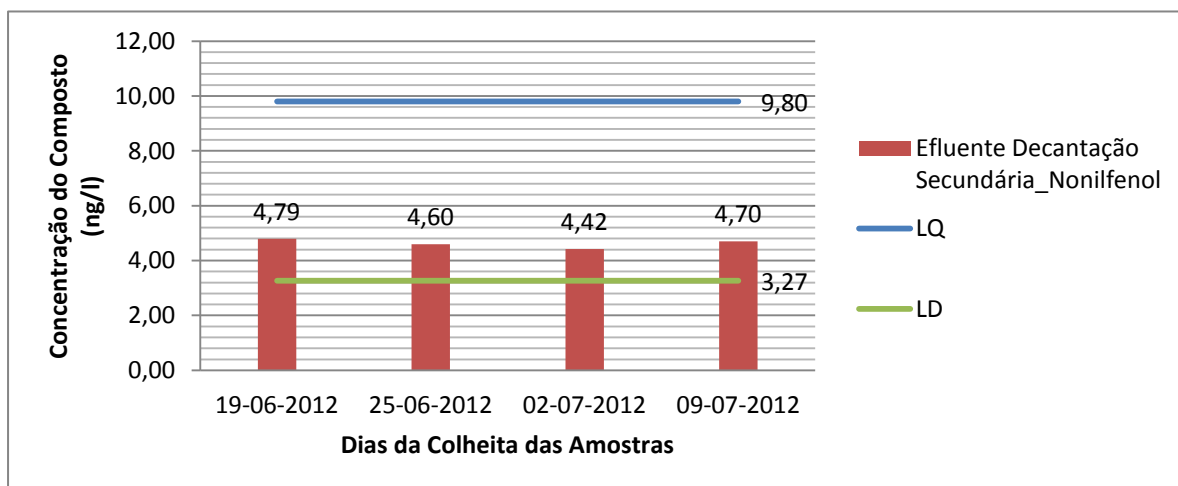


Figura 5.39. - Concentrações de nonilfenol em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente da decantação secundária, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

Nos quatro dias de colheita de amostras de efluente da decantação secundária da ETAR (Figura 5.39.), foram registados valores de concentração (ng/l) de nonilfenol, valores que se encontram acima do LD e, assim sendo, permitem a identificação do composto nas ditas amostras. Contudo, os valores registados são inferiores ao LQ, pelo que não é possível quantificar o nonilfenol presente nas amostras.

6. Efluente de saída da ETAR

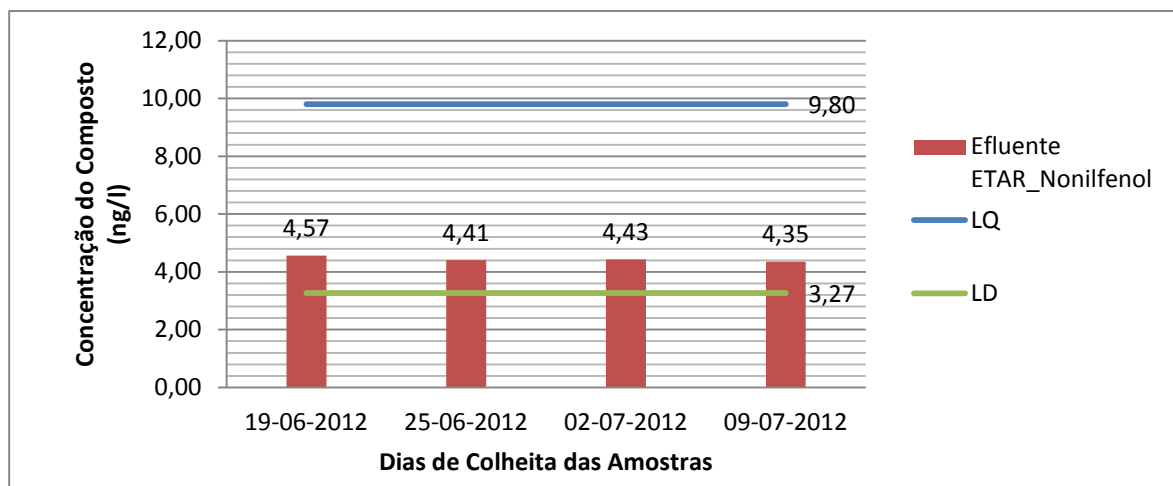


Figura 5.40. - Concentrações de nonilfenol em cada uma das 4 amostras provenientes do efluente de saída da ETAR, obtidas por análise por SPE-UPLC-ESI-MS/MS, baseadas na gama de trabalho

Considerando a Figura 5.40., podemos verificar que todas as amostras possuem valores de concentração (ng/l) superiores ao LD, pelo que é possível detetar-se a presença de nonilfenol através da análise.

Uma vez que os valores são inferiores ao LQ, é possível identificar o nonilfenol mas não é possível quantificá-lo nas amostras de água provenientes do efluente final da ETAR

5.4. Resumo dos resultados da análise das 84 amostras de água

Os resultados obtidos na análise das 84 amostras de água encontram-se compilados nas Tabelas 5.1. e 5.2., sendo que os símbolos a vermelho correspondem às amostras nas quais o respetivo composto foi quantificado e os símbolos a verde correspondem às amostras nas quais o composto em questão foi apenas identificado.

Junto a cada um dos símbolos encontra-se o número de amostras que ultrapassaram ou o LD ou o LQ, consoante a cor que o símbolo apresentar.

Legenda das Tabelas 5.1. e 5.2.:

n - Número total de amostras em cada origem

√ - Composto identificado em n amostras

√- Composto quantificado em n amostras

Tabela 5.1. – Resumo dos resultados da análise por SPE-UPL-ESI-MS/MS para as amostras de água da rede da EPAL

Amostras Compostos	Águas da rede da EPAL						
	Captações subterrâneas (n=13)	Captações Superficiais (n=1)	Reservatórios (n=42)	Estações Elevatórias (n=3)	Água tratada (n=1)	Amostras detetadas (%)	Amostras quantificadas (%)
Estriol	√ (n=1) (7,7%)	-	√ (n=4) (9,52%)	√ (n=2) (66,67%)	-	10%	1,7%
Bisfenol A	-	-	-	-	-	-	-
Dietilestilbestrol	-	-	-	-	-	-	-
Estrona	-	-	-	-	-	-	-
Estradiol	-	-	-	-	-	-	-
Etinilestradiol	-	-	-	-	-	-	-
Progesterona	-	-	-	-	-	-	-
Octilfenol	-	-	√ (n=3) (7,14%)	√ (n=1) (33,33%)	-	6,7%	-
Mestranol	√ (n=1) (7,7%)	-	√ (n=2) (4,76)	-	-	5%	-
Nonilfenol	√ (n=3) (23,08%)	-	√ (n=19) (45,24) √ (n=3) (7,14%)	√ (n=1) (33,33%) √ (n=1) (33,33%)	-	38,3 %	6,7%

Tabela 5.2. – Resumo dos resultados da análise por SPE-UPL-ESI-MS/MS para as amostras de água da ETAR de Beirolas

Amostras Compostos	Águas da ETAR de Beirolas						Amostras detetadas (%)	Amostras quantificadas (%)
	Estação Elevatória (n=4)	Afluente da ETAR (n=4)	Efluente do desarenador (n=4)	Efluente da decantação primária (n=4)	Efluente da decantação secundária (n=4)	Efluente de saída da ETAR (n=4)		
Estriol	√ (n=3)	√ (n=4)	√ (n=1)	√ (n=3)	-	-	45,83%	-
Bisfenol A	√ (n=1) √ (n=2)	√ (n=3) √ (n=1)	√ (n=2) √ (n=2)	√ (n=2) √ (n=1)	√ (n=3) √ (n=1)	√ (n=2)	54,17%	29,17%
Dietilestilbestrol	-	-	-	-	-	-	-	-
Estrona	-	-	-	-	-	-	-	-
Estradiol	-	-	-	-	-	-	-	-
Etinilestradiol	-	-	-	-	-	-	-	-
Progesterona	-	-	-	-	-	-	-	-
Octilfenol	-	-	-	-	-	-	-	-
Mestranol	-	√ (n=1)	-	√ (n=1)	√ (n=1)	√ (n=2)	20,83%	-
Nonilfenol	√ (n=4)	√ (n=4)	√ (n=4)	√ (n=4)	√ (n=4)	√ (n=4)	100%	-

6. Capítulo VI: Conclusões e Perspetivas futuras

O objetivo desta dissertação consistiu na monitorização de dez compostos desreguladores endócrinos nas águas da rede da EPAL, através do método implementado no laboratório para os referidos compostos. Posteriormente considerou-se enriquecedor estudar a presença dos EDC também em águas residuais, utilizando a mesma estratégia de monitorização.

Numa primeira fase, procedeu-se à análise de 60 amostras de água da rede da EPAL, provenientes de vários pontos da rede, nomeadamente, reservatórios, água tratada, captações superficiais e subterrâneas e de estações elevatórias.

Posteriormente procedeu-se à análise de 24 amostras de água provenientes da ETAR de Beirolas, sendo quatro amostras proveniente de 1 estação elevatória e as restantes de 6 pontos de colheita escolhidos ao longo da linha de tratamento.

Sabendo que as ETAR são, de uma maneira geral, concebidas para a remoção da carência química e bioquímica de oxigénio, de azoto e fósforo, por vezes consegue-se uma remoção parcial de estrogénios, embora uma grande parte não seja degradada ao longo da linha de tratamento. Assim sendo, pretendeu-se com este trabalho pesquisar a quantidade de EDC presentes na água à entrada da ETAR, a sua evolução durante as etapas de tratamento e a quantidade dos compostos no efluente de saída da ETAR.

A análise das 60 amostras por SPE-UPL-ESI-MS/MS revelou a presença de EDC mas em quantidades muito reduzidas, sem que haja necessidade de preocupações de maior.

Concluiu-se que das 60 amostras de água de rede da EPAL, em 7 delas foi possível identificar o estriol, sendo que apenas uma delas (captação subterrânea) possui concentração (ng/l) do composto em estudo que permite a sua quantificação; 4 amostras apresentam concentrações de octilfenol que permitem a sua identificação mas não atingem valores suficientes para que o composto seja quantificável; 3 amostras apresentam concentrações vestigiais de mestranol, que permitem a identificação do mesmo; e 24 amostras possuem concentrações de nonilfenol, sendo que destas apenas 4 amostras (três reservatórios e uma estação elevatória) possuem concentrações consideráveis do composto que permitem a sua quantificação. No entanto, apesar de se confirmar a presença de alguns dos compostos desreguladores endócrinos em estudo nas águas da rede da EPAL, esta ocorre em quantidades muito baixas, pelo que se assume que as contaminações esporádicas que ocorrem no sistema de abastecimento não se devem às origens de água.

Relativamente às 24 amostras de água provenientes da ETAR de Beirolas, foram identificados estriol, bisfenol A (BPA), mestranol e nonilfenol nas análises efetuadas. No entanto, apenas o bisfenol A possui concentrações (ng/l) que possibilitam a sua quantificação em quase todos os pontos de colheita, à exceção do efluente de saída da ETAR. Neste ponto de colheita, a quantidade de bisfenol A é reduzida (sendo vestigial na amostra correspondente ao dia 2 de Julho de 2012), pelo que não será necessária uma preocupação mais acentuada quanto a este composto.

A variação das concentrações de nonilfenol ao longo da linha de tratamento é pouco significativa. No entanto, apesar das concentrações deste composto serem vestigiais, deve ser tido em conta que este composto é extremamente tóxico mesmo em baixas concentrações.

Quanto aos restantes compostos com potencial de desregulação endócrina, observam-se flutuações de concentração ao longo da linha de tratamento, o que poderá sugerir a necessidade de melhorias nas etapas de tratamento, promovendo a redução das quantidades destes compostos nas águas residuais tratadas.

O ponto de colheita que deverá ser foco de maior atenção será o do efluente de saída da ETAR, cujo destino final será o rio Tejo. Assim sendo, de acordo com os resultados obtidos, o BPA, o mestranol e o nonilfenol são os compostos identificados neste ponto de colheita e, apesar das descargas usufruírem do grande poder de diluição do rio, deverá ser prestada uma maior atenção nos tratamentos efetuados pela ETAR.

Em suma, não foram detetadas concentrações de compostos com potencial de desregulação endócrina que possam ser consideradas preocupantes ou que coloquem em causa a viabilidade dos serviços a que cada uma das entidades se propõe. No entanto, devido ao carácter imprevisível característico dos compostos em estudo e ao número de amostras objeto deste estudo não ser muito amplo, devem-se assumir estratégias que viabilizem a diminuição/eliminação de EDC na água.

Considerando o DL 103/2010, não existem concentrações de nonilfenol e octilfenol que sejam superiores ao valor máximo admitido (0,3 µg/l e 0,1 µg/l, respetivamente).

Futuramente, ainda há um longo caminho a percorrer no sentido da proteção do Homem e do ambiente, sendo urgente e necessária a obtenção de informação técnica e científica que permita otimizar o tratamento da água para consumo humano e das águas residuais. Esta informação torna-se o alicerce de toda uma estratégia de mitigação destes compostos numa perspetiva a longo prazo, sendo preponderante perceber-se a importância das frações solúvel e particulada dos EDC, a que níveis de concentração se verificam efeitos adversos no Homem, adotar-se o princípio da precaução, evitando ao máximo a contaminação do meio aquático com contaminantes, convergindo numa diminuição progressiva da estrogénicidade global no ambiente.

Relativamente à ETAR, sugere-se a continuação dos estudos da presença dos EDC nas águas residuais, utilizando um maior número de amostras de forma a obter-se uma maior representatividade da realidade da ETAR de Beirolas.

Do ponto de vista ambiental, sugere-se o desenvolvimento de estudos relativamente à reutilização das águas residuais, sendo a reutilização para rega a aplicação preferencial. Desta forma, proporciona-se a economia das águas naturais, a proteção do ambiente e a recuperação de nutrientes, assegurando a redução da poluição das águas superficiais e subterrâneas (reduzindo o caudal descarregado diretamente no rio) e promovendo uma origem alternativa de recursos hídricos.

Tendo em conta que a metodologia utilizada na análise de águas residuais foi uma adaptação do método validado na EPAL para a análise de EDC em águas para consumo humano, sugere-se a realização de um estudo relativamente aos ensaios de recuperação na matriz “águas residuais”, para que haja uma adequação do método utilizado às características da matriz em estudo.

Capítulo VII: Referências Bibliográficas

- **Bibliografia**

Abraham, M.H. "100 Years of chromatography - or is it 107?". *Journal of Chromatography A* **1061**: 113-114 (2004)

Acosta, K.; Cuvilier, L.; Pedersen, B. "European Union Regulation of Endocrine Disrupting Chemicals that affect reproduction: from Rachel to REACH". International Master of Science in Environmental Policy and the Global Challenge. Teksam (2005)

Acúrcio, C.S.C. "Validação do Método de Ensaio para a Análise de Microcistinas por Extração em Fase Sólida (SPE) associada à Cromatografia de Alta Eficiência com Detector de Díodos." Relatório de Estágio Profissionalizante da Licenciatura de Química Tecnológica. *Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa* (2007)

Almeida, C.; Rosário, P.; Seródio, P.; Nogueira, J.M.F. "Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica". *Química* **95**: 69-77 (2004)

Almeida, C.M.M. "Água e Pesticidas: Análise dos Herbicidas Diquato e Paraquato". Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica. *Faculdade de Farmácia de Lisboa* (1993)

Bakhtiar, R.; Guan, Z. "Electron capture dissociation mass spectrometry in characterization of peptides and proteins. Review". *Biotechnol Lett* **28**: 1047-1059 (2006)

Barceló, D. "Sample handling and trace analysis of pollutants - techniques, applications and quality assurance". *Elsevier Science* **21**.(2000)

Bars, R.; Broeckaert, F.; Fegert, I.; Cross, M.; Hallmark, N.; Kedwards, T.; Lewis, D.; O'Hagan, S.; Panter, G.H.; Weltje, L.; Weyers, A.; Wheeler, J.R.; Galay-Burgos, M. "Science based guidance for the assessment of endocrine disrupting properties of chemicals". *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **59**: 37- 46 (2011)

Batista, R.C.; Cordeiro, D.D.; Manzani,S.; Silva, I.A.; Angnes,L.; Gil, E.S. "Remediação Electroquímica do 17- α -etinilestradiol sob diferentes regimes de agitação e força electromotriz". 3rd *International Workshop Advances in cleaner production*. Brasil (2011)

Belgiorno, V.; Rizzo, L.; Fatta, D.; Rocca, C.D.; Lofrano, G.; Nikolaou, A.; Naddeo, V.; Meric, S. "Review on endocrine disrupting - emerging compounds in urban wastewater: Occurrence and removal by Photocatalysis and Ultrasonic irradiation for wastewater reuse". *Desalination* **215**: 166-176 (2007)

Bila, D.M., Dezotti, M. "Endocrine disrupters in the environment: effects and consequences." Coordenação dos programas de Pós-graduação em Engenharia. *Universidade Federal do Rio de Janeiro*. Brasil (2007)

Boenke, A.; Searle, C.; Karjalainen, T. "Contribution of European Research to Endocrine Disruptors". *Analytica Chimica Acta* **473**: 161-165 (2002)

Chambel, J.H.M. "Contribuição para o estudo da remoção em ETAR de 17 β - estradiol e 17 α - etinilestradiol no tratamento biológico". Dissertação para a obtenção do grau em Mestre em Engenharia do Ambiente. *Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa* (2011)

Coleman, D.; Auses, J.; Grams, N. "Regulation: From an industry perspective or relationships between detection limits, quantification limits and significant digits". *Chemometrics and intelligent systems* **37**: 71-80 (1997)

Comissão das Comunidades Europeias (CCE). "Estratégia comunitária em matéria de desreguladores endócrinos." *Substâncias suspeitas de interferir com os sistemas hormonais dos seres humanos e dos animais*. Bruxelas (1999)

Currie, L.A. "Detection and quantification limits: origins and historical overview". *Analytica Chimica Acta* **391**: 127-134 (1999)

Currie, L.A. "Limits for qualitative detection and quantitative determination. Application to Radiochemistry". *Analytical Chemistry Division*: 20-234 (1968)

Daughton, C.G. "Emerging Chemicals as Pollutants in the Environment: a 21st Century Perspective". *Renewable Resources Journal* **23**: 6-23 (2005)

Davies, E.G.R.; Simonovic, S.P. "Global Water Resources Modeling with an integrated model social-economic-environment system". *Advances in Water Resources* **34**: 684-700 (2011)

Decisão nº 2455/2001/CE, de 20 de Novembro

Decreto Regulamentar 23/95, de 23 de Agosto

Decreto-Lei 103/2010, de 24 de Setembro

Decreto-Lei 149/2004, de 22 de Junho

Decreto-Lei 198/2008, de 8 de Outubro

Decreto-Lei 214/2008, de 10 de Novembro

Decreto-Lei 236/98, de 1 de Agosto

Decreto-Lei 236/98, de 1 de Agosto

Decreto-Lei 243/2001, de 5 de Setembro

Decreto-Lei 306/2007, de 27 de Agosto

Decreto-Lei 348/98, de 9 de Novembro

Decreto-Lei nº 152/97, de 19 de Junho

Despacho Conjunto 118/2000, de 3 de Fevereiro

Despacho Conjunto 626/2000, de 6 de Junho

DGRN (Direcção Geral dos Recursos Naturais). "A Água, a Terra e o Homem. Campanha Educativa da Água". *Secretaria de Estado do Ambiente e dos Recursos Naturais*. Lisboa (1988)

Diniz, M.E.R. "Uso da técnica de Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiominas aromáticas". *Universidade Federal de Minas Gerais*. Brasil (2011)

Diniz, M.S.; Maurício, R.; Petrovic, M.; Alda, M.J.L.; Amaral, L.; Peres, I.; Barceló, D.; Santana, F. "Assessing the estrogenic potency in a Portuguese wastewater treatment plant using an integrated approach". *Journal of Environmental Sciences* **22**: 1613-1622 (2010)

Diretiva 2006/118/CE - Directiva Nitratos

Diretiva 98/8/CE, de 16 de Fevereiro

Diretiva 98/83/CE, de 3 de Novembro

Diretiva 91/271/CE, de 21 de Maio

- Diretiva 91/414/CE, de 15 de Julho
- Engelhardt, H. "One century of liquid chromatography from Tswett's columns to modern high speed and high performance separations". *Journal of Chromatography B* **800**: 3-6 (2004)
- Environmental Protection Agency (EPA). "Removal of Endocrine Disruptors Chemicals using drinking water treatment processes". Washington, DC (2001)
- EPAL. "Determinação quantitativa de desreguladores endócrinos - Método de Cromatografia de Ultra Resolução associada à espectrometria de massas". *ME* **72**, Edição Nº 1, Revisão Nº 0 (2009)
- Fauci, A.S.; Braunwald, E.; Kasper, D.L. "*Harrison's Principles of Internal Medicine*". Hill Professional Publishing. 17th Edition. Hardcover (2008)
- Figueiredo, I.B. "A remodelação da ETAR de Beirolas". *Empresa Municipal de Águas e Resíduos de Lisboa* (2001)
- Filho, R.W.R.; Luvizotto-Santos, R.; Vieira, E.M. "Poluentes emergentes como desreguladores endócrinos". *Journal of The Brazilian Society of Ecotoxicology* **2** **3** (2007)
- Fritz, J.S. "Analytical Solid-Phase Extraction". *Wiley-VCH*: 1-14 (1999)
- Gaffney, V. J. "Monitorização de fármacos na água bruta e na água para consumo humano por cromatografia líquida associada à espectrometria de massa tandem." Provas de Formação Avançada. *Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa* (2011)
- Gelbke, H.P.; Kayser, M.; Poole, A. "OECD test strategies and methods for endocrine disruptors". *Toxicology* **205**: 17-25 (2004)
- Gonçalves, V.M.F. "Caracterização de Heteropolissacarídeos por Espectrometria de Massa". *Universidade de Aveiro* (2007)
- Hennion, M. "Solid-phase extraction: method development, sorbents and coupling with liquid chromatography. Review". *Journal of Chromatography A* **856**: 3-54 (1999)
- Henriques, M.; Cardoso, V.V.; Rodrigues, A.M.; Ferreira, E.; Benoliel, M.J.; Almeida, C.M.M. "Simultaneous Determination of ten Endocrine Hormone Disruptors in water using SPE/IC-(ESI) MS-MS". *Journal of Water Resource and Protection* **2**: 818-829 (2010)
- Kavlock, R.J. "Overview of Endocrine Disruptor Research Activity in the United States". *Chemosphere* **39**,**8**: 1227-1236 (1999)
- Klatt, K.; Dünnebier, G.; Engell, S. "Modeling na computationally efficient simulation of chromatographic separation processes. Mathematics and computers in simulation". *University of Dortmund*. Germany (2000)
- Kopllin-Schimitt, P., Frommberger, M. "Capillary Electrophoresis - mass spectrometry: 15 years of developments and applications". *Electrophoresis* **24**, **22-23**: 3837 - 3867, (2003)
- Leite, G.S.; Afonso, R.J.C.F.; Aquino, S.F. "Caracterização de contaminantes presentes em sistema de tratamentos de esgotos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem em alta resolução". *Química Nova* **33**: 734-738 (2010)
- Lorencini, B.P.; França, E.G.; Cavassani, G.S.; Marques, L.B.P.; Leite, S.T.; Passinato, T.M. "Recristalização". Engenharia Química. *Centro Universitário Vila Velha*. Brasil (2009)
- Lough, W.J.; Wainer, I.W. "High performance liquid chromatography: fundamental principles and practice". *Blackie Academic and Professional* (1995)

- Madeira, P.J.A. "A Mass Spectrometry Study of compounds with environmental and biological interest". Doutorado em Química. *Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa* (2010)
- Marcos, M. "Determinação de medicamentos antiepilépticos e anticonvulsivantes por UPLC-MS/MS". Dissertação para Provas de Mestrado em Química Forense. *Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra* (2011)
- Mota, M.; Teixeira, J.; Yelshin, A.; Cortez, S. "Processos de separação: Novas técnicas cromatográficas". *Universidade do Minho* (2004)
- Neng, N.R. "Desenvolvimento de Novas Metodologias Analíticas conducentes à Monitorização de Poluentes Orgânicos Prioritários em Matrizes Aquosas". Doutorado em Química Analítica. *Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa* (2011)
- Newsom, S.W.B. "Pioneers in infection control: John Snow, Henry Whitehead, The Broad Street Pump and The beginnings of geographical epidemiology". *Journal of Hospital Infection* **64**: 210-216 (2006)
- Ngamniyom, A.; Silprasit, K. ; Panyarachun, B. "Effects of pharmaceutical mestranol on estrogen receptor β mRNA expression levels and morphometry in the anal fins of adult Thai fish (*oryzias minutillus*)". *Kasetsart Journal (Natural Sciences)* **46**: 80-90 (2012)
- Nogueira, J.M.F. "Desreguladores Endócrinos: Efeitos adversos e estratégias para a monitorização dos sistemas aquáticos". *Projecto PDCTM/P/Mar/15283* (1999)
- Norma 80/778/CE, de 25 de Dezembro
- Nováková, L.; Matysová, L.; Solich, P. "Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis". *Talanta* **60**: 908-918 (2006)
- Penetra, A.; Cardoso, V.V.; Ferreira, E.; Benoliel, M.J. - *Solid-Phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of several pesticides in water* - *Water Science & Technology*, 62.3 (2010)
- Portaria 1030/93, de 14 de Outubro
- Portaria 512/92, de 22 de Junho
- Portaria 809/90, de 10 de Setembro
- Portugal, F. "Validação de um método de ensaio para análise de pesticidas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa utilizando como método de preparação da amostra a extracção em fase sólida". Relatório de Estágio da Licenciatura em Química Tecnológica. *Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa* (2004)
- Queiroz, S.C.N.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F. "Métodos de extracção e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. Revisão". *Química Nova* **24**, **1**: 68-76 (2001)
- Queiroz, S.C.N.; Ferracini, V.L.; Rosa, M.A. "Validação do método multirresíduo para determinação de pesticidas em alimentos empregando Quechers e UPLC-MS/MS". *Química Nova* **XV**: 1-8 (2011)
- Quinete, N.S. "Extracção de poluentes organoclorados persistentes em fragmentos remanescentes da mata atlântica, RJ: Comparação de métodos". Dissertação da Pós-Graduação em Química. *Universidade Federal Fluminense*. Brasil (2005)

- Ramos, C.I.V. “Estudo de aductos não covalentes de porfirinas com oligonucleotídeos por Espectrometria de Massa”. Dissertação. *Universidade de Aveiro* (2005)
- Ramos, F.; Castilho, M.C.; Silveira, M.I.N. “Extracção em fase sólida (SPE): II. Mecanismos de extracção”. *Química* **62**: 26-30 (1996)
- Regulamento nº 1907/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 18 de Dezembro
- Rial-Otero, R.; Gaspar, E. M.; Moura, I.; Capelo, J. L. “Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: an overview”. *Talanta* **71**: 503-514 (2007)
- Rice, S.L. “Environmental Analysis of selected estrogens and androgens: Applying UltraPerformance Liquid Chromatography and combating matrix interference”. Thesis for the degree of master of science - *The Faculty of The School of Marine Science and The College of William and Mary in Virginia* (2009)
- Rijsberman, F.R. “Water scarcity: fact or fiction?”. *Agricultural Water Management* **80**: 5-22 (2006)
- Rios, A.; Juanes, J.A.; Ortiz-Zarragoitia, M.; Alda, M.L.; Barceló, D. ;Cajaraville, M. “Assessment of the effects of a marine urban outfall discharge on caged mussels using chemical and biomarker analysis”. *Marine Pollution Bulletin* **64**: 563-573 (2012)
- Rodrigues, A.A.M. “Determinação de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos em águas de abastecimento e superficiais por HPLC. Estudo comparativo entre métodos de preparação de amostra - Extracção Líquido-Líquido e Microextracção em fase sólida”. *Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa* (1999)
- Rodriguez-Mozaz, S.; Alda, M.J.L.; Barceló, D. “Monitoring of estrogens, pesticides and Bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry”. *Journal of Chromatography A* **1045**: 85-92 (2004)
- Rutz, J.K. “Avanços na cromatografia líquida. Seminários em alimentos”. *Universidade Federal de Pelotas*. Brasil (2009)
- Salvaterra, A.F. “Nanofiltração de águas superficiais contendo Disruptores endócrinos”. Trabalho final de Mestrado em Engenharia Química. *Instituto Superior de Engenharia de Lisboa* (2009)
- Santos, A.F.C. “Determinação de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos em águas de consumo humano por HPLC”. Dissertação para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Agroalimentar. *Escola Superior Agrária de Santarém* (2000)
- Soares, C.N.; Prouty, J.; Poitras, J. “Occurrence and Treatment od Depression by Sex Hormones”. *Revista Brasileira de Psiquiatria* **24** (2002)
- Scott, R.P.W. “Principles and practice of chromatography”. *Chrom-Ed Book Series* (2003)
- Srivastava, B.; Sharma, B.K.; Baghel, U.S.; Yashwant; Sethi, N. “Review article: Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC). A Chromatography Technique”. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance* **2(1)**: 19-25 (2010)
- Staples, C.A.; Klecka, G.M.; Naylor, C.G.; Losey, B.S. “Alkylphenols and Ethoxylates: I. Identify, Physical Characterization and Biodegradation Pathways Analysis”. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* **14**: 5 (2008)

Swartz, M.E. "UPLCTM: An Introduction and Review". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **28**: 1253-1263 (2005)

Tendinha, C. "Monitorização de pesticidas em águas para consumo humano. Um desafio tecnológico para os laboratórios". *Segurança e Qualidade Alimentar* **7** (2009)

Tyler, C.R.; Routledge, E.J. "Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation". *Pure and Applied Chemistry* (1998)

Valente, A.L.P.; Augusto, F.; Riedo, C.R.F. "Análise quantitativa por cromatografia". *Chemkeys* (2003)

Willard, H.; Merritt, L. J.; Dean, J. "Análise instrumental 5ª Edição". *Fundação Calouste Gulbenkian*:301-343 (1974)

Zwir-Ferenc, A.; Biziuk, M. "Solid Phase Extraction Technique - trends, opportunities and applications. Review". *Polish Journal of Environmental Studies* **5 15**: 677-690 (2006)

- **Webgrafia**

[EPAL. Sistema de Abastecimento. Disponível em: <<http://www.epal.pt/epal/Modelo11.aspx?src=SistemaAbastecimento&area=276&sub=302&menu=302>>. Acesso em: 25 de Agosto de 2012

Faculdade de Farmácia do Porto. Fitoestrogénios. Disponível em: <http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g39_fitoestrogenios/gloss.html>. Acesso em: 17 de Agosto de 2012

INAG. Directiva-Quadro da Água. Disponível em: <<http://dqa.inag.pt>>. Acesso em: 15 de Fevereiro de 2012

INFARMED. Hormonas e Medicamentos usados no tratamento das doenças endócrinas. Disponível em: <<http://www.infarmed.pt/prontuario/framenavegaarvore.php?id=186>>. Acesso em: 13 de Março de 2012

Jimeno, A. - Aula2005. El Sistema Endocrino Sus Trastornos. Disponível em: <<http://www.aula2005.com/html/cn3eso/15endocri/15endocries.htm>>. Acesso em: 6 de Fevereiro de 2012

SEPA. Octylphenols/Progesteron. Disponível em: <<http://apps.sepa.org.uk/spria/Pages/SubstanceInformation.aspx?pid=157>>. Acesso em: 16 de Março de 2012

Thermo Scientific. 10ª Edição da Feira Analítica Latin America. Disponível em: <<http://www.dionex.com.br/?p=texto.asp&c=analitica>>. Acesso em: 23 de Maio de 2012

Uniscience. Concentradores de amostras. Disponível em: <<http://www.uniscience.com/cromatografia/concentradores-de-amostras>>. Acesso em: 23 de Maio de 2012

US EPA. Endocrine Disruptors Research. Disponível em: <<http://www.epa.gov/endocrine>>. Acesso em: 24 de Março de 2012

Anexo I: Identificação das amostras de água da rede da EPAL

Amostra	Data da Colheita	Origem da Amostra
1.	8-02-2012	Captação subterrânea
2.	8-02-2012	Captação subterrânea
3.	13-02-2012	Reservatório
4.	13-02-2012	Água Tratada
5.	13-02-2012	Captação Superficial
6.	13-02-2012	Reservatório
7.	13-02-2012	Reservatório
8.	14-02-2012	Captação subterrânea
9.	14-02-2012	Captação subterrânea
10.	14-02-2012	Captação subterrânea
11.	14-02-2012	Captação subterrânea
12.	14-02-2012	Reservatório
13.	15-02-2012	Reservatório
14.	15-02-2012	Reservatório
15.	15-02-2012	Captação subterrânea
16.	15-02-2012	Reservatório
17.	15-02-2012	Reservatório
18.	15-02-2012	Reservatório
19.	15-02-2012	Captação subterrânea
20.	20-02-2012	Reservatório
21.	17-02-2012	Reservatório
22.	17-02-2012	Estação Elevatória
23.	17-02-2012	Reservatório
24.	17-02-2012	Reservatório
25.	17-02-2012	Reservatório
26.	23-02-2012	Reservatório
27.	24-02-2012	Reservatório
28.	29-02-2012	Reservatório
29.	22-02-2012	Reservatório
30.	27-02-2012	Reservatório
31.	24-02-2012	Reservatório
32.	5-03-2012	Reservatório
33.	2-03-2012	Reservatório
34.	24-02-2012	Reservatório
35.	2-03-2012	Reservatório
36.	2-03-2012	Reservatório
37.	2-02-2012	Estação Elevatória
38.	7-03-2012	Reservatório

39.	7-03-2012	Reservatório
40.	7-03-2012	Reservatório
41.	7-03-2012	Captação subterrânea
42.	23-02-2012	Reservatório
43.	22-02-2012	Captação subterrânea
44.	22-02-2012	Captação subterrânea
45.	20-02-2012	Reservatório
46.	20-02-2012	Reservatório
47.	21-03-2012	Reservatório
48.	23-03-2012	Reservatório
49.	22-03-2012	Reservatório
50.	20-03-2012	Captação subterrânea
51.	20-03-2012	Captação subterrânea
52.	19-03-2012	Reservatório
53.	16-03-2012	Reservatório
54.	04-04-2012	Reservatório
56.	04-04-2012	Reservatório
57.	04-04-2012	Reservatório
58.	30-03-2012	Reservatório
59.	27-03-2012	Reservatório
60.	09-04-2012	Reservatório
61.	10-04-2012	Reservatório

Anexo II: Concentrações de cada composto nos padrões de trabalho utilizados na análise cromatográfica

Desreguladores Endócrinos	P Cal P9 (µg/L)	P Cal P8 (ug/L)	P Cal P7 (µg/L)	P Cal P6 (ug/L)	P Cal P5 (µg/L)	P Cal P4 (ug/L)	P Cal P3 (µg/L)	P Cal P2 (ug/L)	P Cal P1 (µg/L)
Estríol	2,5 / 5	2,2 / 5	1,8 / 5	1,5 / 5	1,2 / 5	1,0 / 5	1,5 / 10	1,0 / 10	0,5 / 10
Estríol	101,5	89,3	73,1	60,9	48,7	40,6	30,5	20,3	10,4
Bisfenol A	93,6	82,4	67,4	56,2	44,9	37,4	28,1	18,7	9,5
Dietilestilbestrol	95,9	84,4	69,0	57,5	46,0	38,4	28,8	19,2	9,8
Estrona	111,5	98,1	80,3	66,9	53,5	44,6	33,5	22,3	11,4
b Estradiol	105,5	92,8	76,0	63,3	50,6	42,2	31,7	21,1	10,8
Etinilestradiol	103,0	90,6	74,2	61,8	49,4	41,2	30,9	20,6	10,5
Progesterona	105,5	92,8	76,0	63,3	50,6	42,2	31,7	21,1	10,8
Octilfenol	107,5	94,6	77,4	64,5	51,6	43,0	32,3	21,5	11,0
Mestranol	100,5	88,4	72,4	60,3	48,2	40,2	30,2	20,1	10,3
Nonilfenol	113,0	99,4	81,4	67,8	54,2	45,2	33,9	22,6	11,5

Anexo III: Concentrações (ng/l) de cada composto nas 60 amostras de água de rede da EPAL

Amostras	Estriol	Bisfenol A	Dietilestilbestrol	Estrona	Estradiol	Etinilestradiol	Progesterona	Octilfenol	Mestranol	Nonilfenol
1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,50
2	0,33	3,41	0,00	1,70	0,00	0,00	0,00	0,00	1,14	5,20
3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,90
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,59	5,00
5	0,00	4,12	0,00	1,70	0,00	0,00	0,00	0,00	1,09	4,90
6	0,33	0,00	0,00	1,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,30
7	0,00	0,00	0,00	1,69	0,00	0,00	0,00	0,00	2,70	5,20
8	0,00	0,00	0,00	1,69	0,00	0,00	0,00	0,00	2,35	4,90
9	0,32	0,00	0,00	1,69	0,00	0,00	0,00	0,00	1,99	4,90
10	0,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,13	4,90
11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,48	5,10
12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,09	5,00
13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,29	4,90
14	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,00
15	0,32	0,00	0,00	1,69	0,00	0,00	0,00	0,00	1,39	4,90
16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,40
17	0,00	0,00	0,00	1,69	0,00	0,00	0,00	0,00	2,18	5,00
18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,00
19	0,00	0,00	0,00	1,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,90
20	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,40	5,30
21	0,34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,85	6,10
22	0,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,23	5,30
23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,37	5,20
24	0,00	0,00	0,00	1,69	0,00	0,00	0,00	0,00	3,32	5,10
25	0,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,12	4,90
26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,47	0,00	17,70
27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,52	0,00	17,80
28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,44	0,00	17,60
29	0,00	0,00	3,31	0,00	0,00	0,00	0,00	3,72	5,68	18,50
30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,54	5,06	15,70
31	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,63	0,00	16,80
32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,01	0,00	12,20
33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,88	5,19	12,00
34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,82	5,58	12,10
35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,93	0,00	12,10
36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,83	0,00	12,40
37	19,33	1,33	4,63	0,00	0,00	0,00	0,00	7,83	9,25	33,10
38	16,10	1,27	3,77	0,20	0,00	0,00	0,00	7,67	0,00	25,00
39	15,48	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	6,20	0,00	16,30
40	19,65	2,20	5,48	1,51	0,00	0,00	0,00	7,24	8,81	23,40
41	30,15	0,00	0,00	1,81	0,00	0,00	0,00	5,92	6,81	15,70
42	18,09	1,55	0,00	1,14	0,00	0,00	0,00	6,98	5,98	21,80
43	0,00	0,00	3,17	0,00	0,00	0,00	0,00	2,97	0,00	19,50
44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,05	0,00	15,90
45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,98	0,00	12,60
47	0,00	0,17	5,92	1,13	0,00	0,00	0,00	3,40	0,00	8,20
48	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,47	0,00	7,50
49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0000	0,00	0,00	3,39	0,00	7,70
50	0,00	0,00	0,00	1,14	0,00	0,00	0,00	3,39	0,00	7,10

51	0,95	0,00	5,92	0,00	0,00	0,00	0,00	3,46	0,00	7,10
52	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,44	0,00	7,10
53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	7,40
54	11,22	0,97	0,00	1,32	0,0000	0,00	0,00	3,68	0,00	9,70
56	0,00	0,28	6,15	1,25	0,0000	0,00	0,00	3,71	0,00	10,80
57	0,00	0,26	6,17	1,32	0,0000	0,00	0,00	3,70	0,00	10,80
58	0,00	0,00	6,16	1,29	0,0000	0,00	0,00	3,77	0,00	9,70
59	0,00	0,09	0,00	1,32	0,0000	0,00	0,00	3,62	0,00	9,10
60	0,00	0,00	0,00	1,13	0,00	0,00	0,00	3,51	0,00	7,10
61	0,00	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,54	0,00	7,20

Anexo IV: Concentrações (ng/l) de cada composto em cada uma das 24 amostras de águas provenientes da ETAR de Beirolas

	Amostras	Data da colheita	Estroí (ug)	Ésiferol A	Dietilstilbestrol	Estrona	Estradiol	Étinilestradiol	Progesterona	Octilfenol	Mestranol	Nonilfenol
1	Afluente da ETAR	10-07-2012	18,88	18,79	0,00	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00	5,61	5,07
2	Efluente da Dec. Secundária	25-06-2012	7,34	9,21	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	1,51	0,00	4,58
3	Efluente da Dec. Primária	19-06-2012	1,01	13,82	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00	1,07	0,00	4,79
4	Estação Elevatória	09-07-2012	2,98	8,11	0,00	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,39
5	Afluente da ETAR	02-07-2012	1,84	7,78	0,00	0,36	0,00	0,00	0,00	0,54	0,00	4,40
6	Efluente do Desarenador	25-06-2012	0,00	6,56	0,00	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,76
7	Estação Elevatória	19-06-2012	6,25	1,98	0,00	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,43
8	Efluente da Dec. Primária	19-06-2012	3,69	2,26	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	1,54	0,00	4,46
9	Efluente do Desarenador	02-07-2012	0,90	6,28	0,00	0,26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,43
10	Efluente da Dec. Secundária	09-07-2012	0,00	3,17	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	1,46	5,48	4,70
11	Efluente do Desarenador	19-06-2012	5,71	10,74	0,00	0,18	0,00	0,00	0,00	0,98	0,00	4,56
12	Efluente da Dec. Primária	09-07-2012	2,47	10,56	0,00	0,34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,39
13	Efluente do Desarenador	09-07-2012	2,61	12,72	0,00	0,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,42
14	Estação Elevatória	25-06-2012	7,83	13,56	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,42
15	Efluente da ETAR	09-07-2012	0,00	3,04	0,00	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,35
16	Afluente da ETAR	25-06-2012	5,11	6,24	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	4,64
17	Efluente da ETAR	02-07-2012	0,00	0,00	0,00	0,26	0,00	0,00	0,00	0,00	5,48	4,43
18	Efluente da Dec. Secundária	02-07-2012	0,00	4,20	0,00	0,57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,42
19	Estação Elevatória	02-07-2012	6,35	10,14	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,36
20	Efluente da Dec. Secundária	25-06-2012	0,00	3,88	0,00	0,28	0,00	0,00	0,00	0,19	0,00	4,60
21	Efluente da ETAR	19-06-2012	0,00	4,32	0,00	0,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,57
22	Efluente da ETAR	25-06-2012	0,00	3,61	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00	5,84	4,41
23	Afluente da ETAR	19-06-2012	2,51	7,21	0,00	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,38
24	Efluente da Dec. Primária	02-07-2012	4,91	9,31	0,00	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00	6,20	4,42