

ELISSANDRO SOARES EMÍDIO

Micotoxinas estrogênicas em águas superficiais da microbacia hidrográfica do Córrego Rico (SP): desenvolvimento de método analítico verde, ocorrência e persistência ambiental

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mary Rosa Rodrigues de Marchi

ARARAQUARA
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

E53m Emídio, Elissandro Soares
Micotoxinas estrogênicas em águas superficiais da
microbacia hidrográfica do Córrego Rico (SP): desenvolvimento
de método analítico verde, ocorrência e persistência ambiental /
Elissandro Soares Emídio – Araraquara-SP : [s.n], 2016
148 f. : il.

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

1. Micotoxinas. 2. Química verde. 3. Cromatografia líquida
de alta eficiência. 4. Água-poluição. 5. Degradação ambiental.
I. Título.

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: Elissandro Soares Emídio

Filiação: Sandoval Emídio Vieira e Maria Conceição Soares Emídio

E-mail: elissandro_se@yahoo.com.br

FORMAÇÃO ACADEMICA/TITULAÇÃO

2012 - Atual Doutorado em Química.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

Orientadora: Mary Rosa Rodrigues de Marchi

Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

2008 - 2010 Mestrado em Química.

Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil.

Título: Desenvolvimento, validação e aplicação de microextração em fase sólida e microextração em fase líquida para determinação de canabinóides em cabelo humano por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas no modo tandem.

Orientador: Haroldo Silveira Dórea

Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe.

2012 - Atual Graduação em Química Licenciatura.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

2003 - 2008 Graduação em Farmácia.

Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2015 - 2015 Técnicas de Planejamento Experimental.
Universidade Estadual de Santa Cruz, UESC, Brasil.

2009 - 2009 Cromatografia Bidimensional.
Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil.

2009 - 2009 Química forense.
Sociedade Brasileira de Química, SBQ, São Paulo, Brasil.

2008 - 2008 Cromatografia líquida de alta eficiência.
Embrapa Tabuleiros Costeiros, EMBRAPA, Brasil.

2008 - 2008 Metodologia cromatográfica para análise n-alcanos.
SINC DO BRASIL - Scientific Instruments Co., SINC, Brasil.

2008 - 2008 Operação e manutenção básica QP2010 Plus Shimatzu.
SINC DO BRASIL - Scientific Instruments Co., SINC, Brasil.

2008 - 2008 Curso Teórico: Princípios básicos de GC e GC-MS.
SINC DO BRASIL - Scientific Instruments Co., SINC, Brasil.

2008 - 2008 Análise multivariada de dados experimentais em química.
Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil.

2008 - 2008 Aplicação da quimiometria na análise de perfis cro.
Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil.

2008 - 2008 Identificação de drogas (Toxicologia Forense).
Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil.

2008 - 2008 Cromatografia de íons horário.
Embrapa Tabuleiros Costeiros, EMBRAPA, Brasil.

2008 - 2008 Seminário técnica de absorção atômica.
Instituto Tecnológico e de Pesquisas do Estado de Sergipe, ITPS, Aracaju, Brasil.

2008 - 2008 Plantas medicinais e fitoterápicos.
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil.

2008 - 2008 Operação e manutenção básica QP2010 Plus Shimatzu.
SINC DO BRASIL - Scientific Instruments Co., SINC, Brasil.

2008 - 2008 Metodologia cromatográfica para análise de HPAs.
SINC DO BRASIL - Scientific Instruments Co., SINC, Brasil.

2007 - 2007 Prevenção de acidentes e primeiros socorros.
Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil.

2006 - 2006 Gerenciamento e boas práticas na indústria farmacêutica.
Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil.

2005 - 2005 Amostragem, estocagem e preparo de amostras ambientais.
Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil.

2005 - 2005 Segurança em laboratório.
Universidade Federal de Sergipe, UFS, São Cristóvão, Brasil.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

1. Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão de Sergipe – FAPESE.

2010 - 2012 Vínculo: Celetista formal, Enquadramento funcional: Técnico Nível Superior, Carga horária: 40; Regime: Dedicação exclusiva.

2. Universidade Federal de Sergipe – UFS.

2008 - 2010 Vínculo: Bolsista - FAPITEC-SE, Enquadramento funcional: Mestrado, Carga horária: 40; Regime: Dedicação exclusiva.

2005 - 2008 Vínculo: Bolsista-Iniciação Científica, Enquadramento funcional: PIBIC/CNPq, Carga horária: 20; Regime: Parcial.

PRÊMIOS E TÍTULOS

2012 Aprovado em 1º lugar na seleção do Programa de Pós-graduação em Química, Curso de Doutorado - UNESP - Campus de Araraquara.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

1. EMÍDIO, E. S.; SILVA, C. P.; MARCHI, M. R. R. Determination of estrogenic mycotoxins in environmental water samples by low-toxicity dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography (Print)*, v.1391, p.1 - 8, 2015.

2. SILVA, C. P.; EMÍDIO, E. S.; MARCHI, M. R. R. Method validation using weighted linear regression models for quantification of UV filters in water samples. *Talanta (Oxford)*, v.131, p.221 - 227, 2015.

3. SILVA, C. P.; **EMÍDIO, E. S.**; MARCHI, M. R. R. The occurrence of UV filters in natural and drinking water in São Paulo State (Brazil). *Environmental Science and Pollution Research International* (Internet), v.22, p.19706 - 19715, 2015.
4. MACHADO, A. M. R.; CARDOSO, M. G.; DÓREA, H. S.; **EMÍDIO, E. S.**; SILVA, M. M. S.; ANJOS, J. P.; NELSON, D. L. Contamination of cachaça by PAHs from storage containers. *Food Chemistry*, v.146, p.65 - 70, 2014.
5. SILVA, C. P.; **EMÍDIO, E. S.**; MARCHI, M. R. R. Filters in Water Samples: Experimental Design on the SPE Optimization followed by GC-MS/MS Analysis. *Journal of the Brazilian Chemical Society* (Impresso), v.24, p.1433 - 1441, 2013.
6. LIMA, M. B.; FEITOSA, E. A.; **EMÍDIO, E. S.**; DÓREA, H. S.; ALEXANDRE, M. R. Distribution and sources of aliphatic hydrocarbons in surface sediments of Sergipe River estuarine system. *Marine Pollution Bulletin*. , v.64, p.1721 - 1725, 2012.
7. MACHADO, A. M. DE R.; CARDOSO, M. DAS G.; **EMÍDIO, E. S.**; PRATA, V. DE M.; DÓREA, H. S.; ANJOS, J. P. DOS; MAGRIOTIS, Z. M.; NELSON, D. L. Experimental Design Methodology to Optimize the Solid Phase Microextraction Procedure Prior to GC/MS Determination of Ethyl Carbamate in Samples of Homemade Cachaça. *Analytical Letters*. , v.45, p.1143 - 1155, 2012.
8. PRATA, V. DE M.; **EMÍDIO, E. S.**; DOREA, H. S. New catalytic ultrasound method for derivatization of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine, with analysis by GC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Print). , v.403, p.625 - 632, 2012.
9. PRATA, V. DE M.; **EMÍDIO, E. S.**; DOREA, H. S. Aplicação de métodos quimiométricos na caracterização de charutos utilizando extração por dispersão da matriz em fase sólida e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. *Química Nova* (Impresso). , v.34, p.53 - 58, 2011.
10. SILVA FILHO, C. F.; **EMÍDIO, E. S.**; DÓREA, H. S. Solid-phase microextraction for determination of anilino-pyrimidine, dimethylcarbamate and thiadiazine pesticides in irrigation project surface water. *Journal of the Brazilian Chemical Society* (Impresso). , v.22, p.1371 - 1378, 2011.
11. **EMÍDIO, E. S.**, DOREA, H. S. Comparação entre as extrações ultra-som e Soxhlet para determinação de alcanos em sedimentos ambientais. *Scientia Plena*. , v.6, 097202 - 1, 2010.
12. **EMÍDIO, E. S.**, PRATA, V. DE M.; SANTANA, F. J. DE, DÓREA, H. S. Hollow fiber-based liquid phase microextraction with factorial design optimization and gas chromatography-tandem mass spectrometry for determination of cannabinoids in human hair. *Journal of Chromatography. B* (Print), v.878, p.2175 - 2183, 2010.

- 13. EMÍDIO, E. S.**, PRATA, V. DE M.; DÓREA, H. S. Validation of an analytical method for analysis of cannabinoids in hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta (Print)*, v.670, p.63 - 71, 2010.
- 14. DOREA, H. S.**, CARDOSO, M. G., NAVICKIENE, S., **EMÍDIO, E. S.**, SILVA, T. C. S., SILVA, M. M. S. Análise de Poluentes Orgânicos Tóxicos na Cachaça. *Revista da FAPES de Pesquisa e Extensão.* , v.4, p.5 - 18, 2008.
- 15. GAUJAC, A.**; **EMÍDIO, E. S.**; NAVICKIENE, S.; FERREIRA, S. L. C.; DÓREA, H. S. Multivariate optimization of a solid phase microextraction-headspace procedure for the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in effluent samples from a waste treatment plant. *Journal of Chromatography (Print)*. , v.1203, p.99 - 104, 2008.
- 16. BARROS, F.**; HATJE, V.; FIGUEIREDO, M. B.; MAGALHÃES, W. F.; DÓREA, H. S.; **EMÍDIO, E. S.** The structure of the benthic macrofaunal assemblages and sediments characteristics of the Paraguaçu estuarine system, NE, Brazil. *Estuarine, Coastal and Shelf Science (Print)*. , v.78, p.753 - 762, 2008.
- 17. EMÍDIO, E. S.**, NAVICKIENE, S., DOREA, H. S. Análise de fenóis em águas ambientais por SPME. *Caderno de Cultura do Estudante (UFS)*. , v.5, p.109 - 115, 2006.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **EMÍDIO, E. S.**; SILVA, C. P.; MARCHI, M. R. R. Planejamento fatorial e superfície de resposta: otimização da reação de derivação de micotoxinas estrogênicas por GC-MS/MS.
In: VI Workshop de Quimiometria, Ilhéus-BA 2015.
2. **EMÍDIO, E. S.**; SILVA, C. P.; MARCHI, M. R. R. A new method for the determination of estrogenic mycotoxins in water based on dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.
In: 38th International Symposium on Capillary Chromatography, Riva del Garda-Italy, 2014.
3. **EMÍDIO, E. S.**; SILVA, C. P.; MARCHI, M. R. R. Micotoxinas estrogênicas em água de rio: primeiros resultados para a sub-bacia do córrego rico (Jaboticabal-SP).
In: XIII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, Guarapari-ES, 2014.
4. **EMÍDIO, E. S.**; MARCHI, M. R. R. Desenvolvimento de método para determinação de micoestrógenos utilizando DLLME com bromosolventes e análise por HPLC-FLD.
In: 17º Encontro Nacional de Química Analítica, Belo Horizonte-MG, 2013.

5. PRATA, V. DE M.; **EMÍDIO, E. S.**; OLIVEIRA, C. M.; SANTANA, F. J. M. DE; DÓREA, H. S. Otimização da extração do Carboxi-THC em urina por DLLME-SFO.

In: 5º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, Montevideo, 2012.

6. MOREIRA, D. G.; **EMÍDIO, E. S.**; DOREA, H. S.; NAVICKIENE, S.; ALEXANDRE, M. R. Avaliação espacial da atividade antrópica no estuário do Rio Sergipe.

In: IX Latin American Symposium on Environmental and Sanitary Analytical Chemistry, Salvador-BA, Brazil, 2011.

7. DOS SANTOS, A. S. O.; **EMÍDIO, E. S.**; NAVICKIENE, S.; GARCIA, R. J. L.; ALEXANDRE, M. R.; DOREA, H. S. Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em sedimento no estuário do rio Sergipe por ultra-som e análise por GC- MS.

In: IX Latin American Symposium on Environmental and Sanitary Analytical Chemistry, Salvador-BA, Brazil, 2011.

8. PRATA, V. M.; **EMÍDIO, E. S.**; Oliveira, C. M.; DOREA, H. S. Otimização dos parâmetros de extração por DLLME-SFO para determinação de pesticidas em amostras de água por GC-MS.

In: IX Latin American Symposium on Environmental and Sanitary Analytical Chemistry, Salvador-BA, Brazil, 2011.

9. PRATA, V. M.; **EMÍDIO, E. S.**; DOREA, H. S. Aplicação de métodos quimiométricos na caracterização de charutos utilizando extração por dispersão da matriz em fase sólida e análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

In: 62ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Natal-RN, 2010

10. PRATA, V. DE M.; **EMÍDIO, E. S.**; de SANTANA, F. J. M; DOREA, H. S. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de canabinóide em urina por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas no modo tandem.

In: IV Congreso Iberoamericano de Química Analítica e X Encuentro Nacional de Química Analítica y Ambiental, Concón-Chile, 2010.

11. PRATA, V. M.; **EMÍDIO, E. S.**; DOREA, H. S. Determinação de carboxi-delta9-tetrahydrocannabinol em urina por extração em fase sólida combinada a GC-MS no modo tandem.

In: III Encontro Sergipano de Química, São Cristóvão, 2010.

12. SANTOS, D. L.; SILVA, M. M. S.; **EMÍDIO, E. S.**; NAVICKIENE, S; DOREA, H. S. Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes na castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.).

In: III Encontro Sergipano de Química, São Cristóvão/SE, 2010.

13. SANTOS, D. L.; SILVA, M. M. S.; **EMÍDIO, E. S.**; NAVICKIENE, S.; DOREA, H. S.; ALEXANDRE, M. R. Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes na castanha de caju (*Anacardium occidentale* L.)

In: II Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Aracaju/SE, 2010.

14. PRATA, V. M.; **EMÍDIO, E. S.**; de SANTANA, F. J. M; DOREA, H. S. Microextração em fase líquida com fibra oca para determinação de tetrahidrocanabinol, canabidiol, canabinol em cabelo humano.

In: IV Congreso Iberoamericano de Química Analítica e X Encuentro Nacional de Química Analítica y Ambiental, Concón-Chile, 2010.

15. PRATA, V. M.; **EMÍDIO, E. S.**; de SANTANA, F. J. M; DOREA, H. S. Otimizar e validar um método analítico por SPE e GC-MS/MS para determinar o metabólito de canabinóides em urina.

In: 20º Encontro de Iniciação Científica, São-Cristóvão, 2010.

16. PRATA, V. M.; **EMÍDIO, E. S.**; CARVALHO, P. H. V.; NAVICKIENE, S.; DOREA, H. S.

Caracterização de charutos utilizando extração por MSPD, análise por GC-MS e métodos quimiométricos.

In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza-CE, 2009.

17. **EMÍDIO, E. S.**; PRATA, V. M.; NAVICKIENE, S.; DOREA, H. S. Estudo da fragmentação por MS/MS de canabinóides para análise em cabelo e otimização das condições de extração por static headspace.

In: 15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, Salvador-BA, 2009.

18. **EMÍDIO, E. S.**; PRATA, V. M.; NAVICKIENE, S.; DOREA, H. S. Otimização dos parâmetros de extração por SPME-HS para análise de canabinóides em cabelo por GC-MS/MS.

In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza-CE, 2009.

19. PRATA, V. M.; **EMÍDIO, E. S.**; NAVICKIENE, S.; DOREA, H. S. Otimização multivariada na análise de compostos voláteis em charuto por HS-SPME e GC-MS.

In: 15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, Salvador-BA, 2009.

20. **EMÍDIO, E. S.**; PRATA, V. M.; NAVICKIENE, S.; DOREA, H. S. Validação de método cromatográfico por GC-MS/MS na determinação de delta-9-tetraidrocanabinol, canabidiol e canabinol em cabelo humano.

In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza-CE, 2009.

21. **EMÍDIO, E. S.**; NAVICKIENE, S.; DOREA, H. S. Análise de alcanos em sedimentos ambientais por ultra-som.

In: 60º Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Campinas-SP.

22. **EMÍDIO, E. S.**; AQUINO, A.; GAUJAC, A.; GARCIA, C. A. B.; NAVICKIENE, S., DOREA, H. S. Determinação de BTEX em águas subterrâneas e de efluentes por Purge and Trap e GC/FID.

In: IV Encontro Nacional de Química Ambiental, Aracaju/SE, 2008.

23. PRATA, V. M.; **EMÍDIO, E. S.**; CARVALHO, P. H. V.; DOREA, H. S. Identificação de compostos orgânicos em charuto por MSPD e GC-MS.

In: 18º Encontro de Iniciação Científica e 4º Encontro de Pós-Graduação, São Cristóvão, 2008.

24. CARVALHO, P. H. V.; FILHO, C. F. S.; **EMÍDIO, E. S.**; GAUJAC, A.; DOREA, H. S.; NAVICKIENE, S. SPME para determinação de pirimetanil, pirimicarbe e buprofezina em águas ambientais por GC-MS.

In: Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas - COLACRO XII, Florianópolis-SC, 2008.

25. SILVA, T. C. S.; DOREA, H. S.; CARDOSO, M. G.; NAVICKIENE, S.; **EMÍDIO, E. S.**, SILVA, M. M. S. Validação de método para análise de HPAs em cachaça.

In: XV Seminário Latino Americano e do Caribe de Ciência e Tecnologia de Alimentos e XXI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belo Horizonte/MG, 2008.

26. SILVA, T. C. S.; SILVA, M. M. S.; **EMÍDIO, E. S.**; NAVICKIENE, S.; DOREA, H. S. Validação de método por SPE e GC para análise de HPAs e pesticidas em cachaça.

In: 18º Encontro de Iniciação Científica e 4º Encontro de Pós-Graduação, 2008.

27. **EMÍDIO, E. S.**; NAVICKIENE, S.; DOREA, H. S. Análise de alcanos em sedimentos ambientais por ultra-som.

In: XVII Encontro de Iniciação Científica, São Cristóvão/SE, 2007.

28. **EMÍDIO, E. S.**; AQUINO, A.; NAVICKIENE, S.; DOREA, H. S. Comparação da extração ultra-som com Soxhlet para análise de alcanos em sedimentos ambientais.

In: 14º Encontro Nacional de Química Analítica, João Pessoa-PB, 2007.

29. ARAUJO, T. S.; LIMA, T. A. R. M.; FREITAS, F. P.; **EMÍDIO, E. S.**; NUNES, R. S.; MARRETO, R. N.; VALERIO, M. E. G. Desenvolvimento de filtros solares à base de hidroxiapatita.

In: XXV Encontro de Físicos do Norte e Nordeste, Natal-RN, 2007.

30. AQUINO, A.; **EMÍDIO, E. S.**; DOREA, H. S.; NAVICKIENE, S. Otimização de método para a análise de resíduos de pesticidas em matriz de mamão por MSPD e GC-MS.

In: 14º Encontro Nacional de Química Analítica, João Pessoa-PB, 2007.

31. **EMÍDIO, E. S.**; NAVICKIENE, S.; DOREA, H. S. Análise de fenóis em águas ambientais por SPME.

In: XVI I Encontro de Iniciação Científica, São Cristóvão/SE, 2006.

32. GAUJAC, A.; **EMÍDIO, E. S.**; NAVICKIENE, S.; DOREA, H. S. Determinação de BTEX em efluentes por P&T-GC-PID/FID.

In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-SP, 2006.

33. **EMÍDIO, E. S.**; NAVICKIENE, S.; DOREA, H. S. Otimização de método analítico para determinar poluentes orgânicos em sedimentos. Comparação dos detectores PID e FID *In: XV Encontro de Iniciação Científica, São Cristóvão/SE, 2005.*

34. **EMÍDIO, E. S.**; LOPES, W. G.; CUNHA, B. B.; GARCIA, H. L.; NAVICKIENE, S.; DOREA, H. S. Poluentes orgânicos em sedimento. Uso do planejamento fatorial para estabelecimento da metodologia analítica.

In: 13º Encontro Nacional de Química Qnalítica, Niterói-RJ, 2005.

Artigos em jornal de notícias

1. **EMÍDIO, E. S.**; PRATA, V. M.; DOREA, H. S. Cabelo ajuda a identificar uso de maconha. Jornal da Cidade. Aracaju/SE, p.B - 2, 2010.

2. **EMÍDIO, E. S.**; PRATA, V. M.; DOREA, H. S. Identificação de maconha pelo cabelo. Cinform. Aracaju/Se, p. Emprego - 9, 2010.

3. **EMÍDIO, E. S.**; PRATA, V. M.; DOREA, H. S. Maconha no cabelo. Jornal UFS. São-Cristóvão/SE, p. número I - 5, 2010.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **EMÍDIO, E. S.**; PRATA, V. M.; NAVICKIENE, S.; DOREA, H. S. Desenvolvimento de método para análise de compostos da maconha em cabelo humano por HS-SPME e GC-MS/MS, 2009.

2. **EMÍDIO, E. S.**; PRATA, V. M.; NAVICKIENE, S.; DOREA, H. S. Validação de método cromatográfico por GC-MS/MS na determinação de delta-9-tetraidrocanabinol, canabidiol e canabinol em cabelo humano, 2009.

3. **EMÍDIO, E. S.**; NAVICKIENE, S.; DOREA, H. S. Novas metodologias analíticas para análise de hidrocarbonetos em água, sedimento e cachaça, 2008.

Demais produções bibliográficas

1. **EMÍDIO, E. S.**; PRATA, V. M.; DOREA, H. S. **Estudo pioneiro em Sergipe identifica maconha pelo cabelo.** Portal UFS, 2010.

PRODUÇÃO TÉCNICA

Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia

1. EMÍDIO, E. S.; PRATA, V. M.; DOREA, H. S. **Maconha é analisada através de estudo em Sergipe**, 2010.

ORIENTAÇÕES E SUPERVISÕES CONCLUÍDAS

Iniciação científica

1. Vítor Renan Peres Venâncio e Silva. **Desenvolvimento de um método analítico “verde” para a determinação de micotoxinas estrogênicas em águas superficiais por microextração líquido-líquido dispersiva com líquido iônico e HPLC-FLD**. 2015. Iniciação científica (Química) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

SUPERVISÃO CIENTÍFICA SOB O PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DO CÂMPUS DE ARARAQUARA.

ELISSANDRO SOARES EMÍDIO

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

Araraquara, 11 de abril de 2016.

BANCA EXAMINADORA



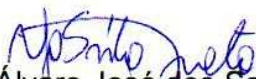
Prof^a. Dr^a. Mary Rosa Rodrigues de Marchi (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof^a. Dr^a. Raquel Fernandes Pupo Nogueira
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Paulo Clairmont Feitosa de Lima Gomes
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto
Instituto de Química – USP, São Carlos



Prof. Dr. Eduardo Bessa Azevedo
Instituto de Química – USP, São Carlos

Dedico este trabalho aos meus pais, meu irmão e minha noiva Cláudia.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo exemplo de luta, perseverança e amor dedicados a mim. A meu irmão pelo apoio e amparo em todos os momentos que precisei de sua ajuda. Obrigado por tudo que tens me dado e serem responsáveis pela pessoa que sou hoje.

À minha amada Cláudia por tornar esses quatro anos em Araraquara mais agradáveis ao meu lado. Obrigado pelo seu amor, incentivo, carinho, dedicação e companheirismo. Sem você seria difícil seguir essa caminhada.

À Universidade Estadual Paulista, ao Instituto de Química-Campus Araraquara, ao Departamento de Química Analítica, ao Programa de Pós-Graduação em Química e ao Grupo de Estudos em Saúde Ambiental e Contaminantes Orgânicos (GRESKO) pela infraestrutura oferecida em realizar este gratificante trabalho.

À Prof^a Dr^a Mary Rosa Rodrigues de Marchi por ter me aceito em seu grupo de pesquisa como um dos últimos alunos a orientar na Pós-Graduação do Instituto de Química. Agradeço profundamente pela orientação, liberdade acadêmica, confiança, atenção e respeito. Faço aqui meu sincero agradecimento pelo meu crescimento profissional e por me guiar de forma tão positiva nesse caminho acadêmico.

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado e reserva técnica concedida, que contribuíram para o desenvolvimento, elaboração, divulgação e confecção desta tese. Agradeço também pela aprovação do meu estágio em Portugal (Doutorado Sanduíche) na Universidade de Aveiro por meio do Programa Ciência sem Fronteiras.

À FAPESP pelo apoio financeiro na execução deste projeto.

Aos professores da Pós-graduação pelos ensinamentos e aos funcionários (em especial aos motoristas) do Instituto de Química pela segurança no trajeto para as coletas em Jaboticabal e Monte Alto.

Ao Sistema Autônomo de Água e Esgoto de Jaboticabal (SAAEJ) e seus funcionários, em especial à Dr^a Laudicéia Giacometti, pelo grande apoio, disponibilidade e conhecimento na amostragem de água no Córrego Rico.

Aos integrantes e ex-integrantes do Grupo de Estudos em Saúde Ambiental e Contaminantes Orgânicos (GRESKO) e Análise Térmica. Obrigado pelo convívio e experiência adquirida por todos.

À Prof^a Maria Valnice Boldrin Zanoni pelas análises no LC-MS/MS e ao Guilherme Zocolo e Bianca Ferreira da Silva por toda ajuda nas análises de espectrometria de massas indispensáveis nesse trabalho.

Ao Grupo de Química Analítica e Ambiental do Departamento de Química da Universidade de Aveiro/Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM). Ao Prof. Valdemar Inocêncio Esteves por ter me recebido de braços abertos em seu grupo de pesquisa e a todos integrantes do grupo por terem me acolhido bem durante os seis meses e tornar minha estadia em Aveiro muito tranquila e agradável e em especial a Dr^a Vânia Calisto pela discussão dos resultados do trabalho desenvolvido.

Enfim, a todos de uma forma direta ou indireta me auxiliaram a desenvolver essa Tese, o meu muito obrigado.

*“Escolhe um trabalho de que gostes, e não terás que
trabalhar nem um dia na tua vida”.*

Confúcio

RESUMO

Micotoxinas estrogênicas (EM) são estrógenos produzidos como metabólitos secundários de fungos. Entre as EM estão a zearalenona (ZEN) e seus metabólitos produzidos principalmente pelo fungo do gênero *Fusarium* que cresce em várias culturas agrícolas. A influência da exposição às EM na saúde de mamíferos /humanos, por meio dos alimentos, tem sido extensivamente estudada. Em contraste, estudos que focam nas EM em águas superficiais e seus possíveis impactos no ambiente aquático são negligenciados. O presente trabalho apresenta os desenvolvimentos mais recentes no que concerne às micotoxinas estrogênicas, em relação às metodologias analíticas utilizadas na sua determinação e avaliação do comportamento em águas superficiais. As atividades desenvolvidas foram divididas em duas etapas: (1) Estudo analítico - desenvolvimento de um método analítico verde para a determinação das micotoxinas estrogênicas empregando a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) utilizando bromosolventes e líquido iônico (IL) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por fluorescência (FLD) ou espectrometria de massas (MS); (2) Estudo ambiental - avaliação da presença dos analitos na microbacia hidrográfica do Córrego Rico com avaliação espaço-temporal e a persistência da micotoxina zearalenona em ambientes aquáticos sob irradiação solar simulada. Vários parâmetros importantes que influenciam a eficiência de extração para DLLME foram otimizados. Em condições ótimas, a recuperação de extração para ZEN e seus metabólitos para DLLME e IL-DLLME variaram de 81 a 118 % e 76 a 81 %, respectivamente; Os desvios padrão relativos (RSD) para a precisão intra-dia e inter-dia foram menores do que 13%, em DLLME, e inferior a 5,7 % (intra-dia) para IL-DLLME. Os limites de detecção do método (LOD) e quantificação (LOQ) foram de 4-20 ng L⁻¹ e de 8-40 ng L⁻¹ para DLLME e 0,2 ng L⁻¹ e 0,5 ng L⁻¹ para IL-DLLME, respectivamente. A determinação das micotoxinas estrogênicas nas amostras de água da microbacia hidrográfica do Córrego Rico alcançaram níveis de até 59,3 ng L⁻¹ com concentração equivalente em estradiol calculada (cEEQ) entre <0,06 e 1,42 ng L⁻¹. Essas concentrações estão relacionadas a efeitos adversos no crescimento e reprodução de algumas espécies de peixes. No estudo de fototransformação a ZEN foi degradada rapidamente em águas naturais, com meia-vida ($t_{1/2}$) de 28,3 min (água estuarina) e 135,9 min (água de rio). Os resultados indicaram que, após 1 h do tempo de irradiação, o percentual de degradação da ZEN foi de 69,4% (água do rio) e 90,8% (água estuarina). Do ponto de vista ambiental, a rápida degradação observada não deve ser interpretada “a priori”, como indicativo de baixo risco ambiental do aporte de ZEN, devendo ser investigados o comportamento ambiental e toxicológico dos seus produtos de degradação, além do que há que se considerar a constante introdução, nas águas superficiais, de microcontaminantes associados ao esgoto sanitário, como a ZEN.

Palavras-chave: Micotoxinas estrogênicas. DLLME. HPLC. Águas naturais. Fotodegradação

ABSTRACT

Estrogenic mycotoxins (EM) are estrogens produced as secondary metabolites of fungi. The well known EM are zearalenone (ZEN) and its metabolites primarily produced by the mold *Fusarium* growing on a variety of crops. The influence of exposure to EM on human/mammalian health via food has been extensively studied. In contrast, studies focus on EM in surface waters and their possible impacts in aquatic environment are negligible. The current work presents the most recent developments concerning estrogenic mycotoxins, in regard to the analytic methodologies utilized in their determination and the behavior assessment in surface waters. The study was developed in two steps: (1) analytical study - Green analytical method development for determination of estrogenic mycotoxin employing microextraction liquid-liquid dispersive (DLLME) using bromosolvent and ionic liquid (IL) followed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection (FLD) or mass spectrometry (MS); (2) Environmental study - evaluation of the presence of analytes in Rico stream watershed with spatial-temporal distribution and the persistence of zearalenone mycotoxin in aquatic environments by simulated sunlight. Several important parameters influencing the extraction efficiency of DLLME were optimized. Under optimal conditions, extraction recovery for ZEN and its metabolites by DLLME and IL-DLLME were within the range of 81-118 % e 76-81 % respectively; the relative standard deviations (RSDs) for intra-day and inter-day precision were lower than 13% by DLLME, and lower than 5.7 % (intra-day) by IL-DLLME. The method limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were from 4–20 ng L⁻¹ and 8–40 ng L⁻¹, for DLLME and from 0.2 ng L⁻¹ and 0.5 ng L⁻¹ for IL-DLLME, respectively. Determination of estrogenic mycotoxins in water samples from Rico Stream watershed reached levels of up to 59.3 ng L⁻¹ and their corresponding calculated estrogenic equivalents (cEEQ) values were <0.06 and 1.42 ng L⁻¹. These concentrations are related to adverse effects on growth and reproduction of some fish species. In phototransformation study ZEN degraded quickly in natural waters, with half-lives ($t_{1/2}$) of 28.3 min (estuarine water) and 135.9 min (river water). The results indicated that after 1 h irradiation time, the degradation percentage of ZEN were 69.4% (river water) and 90.8% (estuarine water). From an environmental point of view, the rapid degradation observed, under laboratory conditions, should not be interpreted "a priori" as indicative of low environmental risk for ZEN, should be investigated environmental behavior and toxicology of degradation products, beyond it is necessary to considering the constant introduction into surface water of microcontaminants associated with sewage, such as this mycotoxin.

Keywords: Estrogenic mycotoxins. DLLME. HPLC. Natural waters. Photodegradation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da zearalenona	33
Figura 2 - Estruturas químicas das principais lactonas do ácido resorcílico (RALs)	34
Figura 3 - Proposta da distribuição ambiental das micotoxinas estrogênicas	42
Figura 4 - Etapas envolvidas na técnica DLLME	46
Figura 5 - Cromatograma (HPLC/FLD) do gradiente exploratório (corrida 1)	51
Figura 6 - Cromatograma da corrida 2	52
Figura 7 - Cromatograma da corrida 3	52
Figura 8 - Cromatograma final da separação dos analitos por HPLC/FLD	53
Figura 9 - Efeito do solvente de extração	57
Figura 10 - Efeito do solvente dispersor	58
Figura 11 - Efeito do volume de solvente extrator	59
Figura 12 - Efeito do volume de solvente dispersor	60
Figura 13 - Efeito do pH.	61
Figura 14 - Efeito da força iônica.	62
Figura 15 - Efeito do volume da amostra	63
Figura 16 - Efeito da comparação entre VALLME e DLLME	64
Figura 17 - Cromatograma da amostra de água do rio (P3) contendo 168 ng L ⁻¹ de β-ZAL e 17 ng L ⁻¹ de ZAN. Cromatograma de íons totais (a). Cromatograma de íons selecionados para β-ZAL (b) e ZAN (c). 1- β-ZAL, (2) ZAN, e (3) ZEN-d ₆	69
Figura 18 - Formação de [C ₆ MIM][PF ₆] por reação in situ	74
Figura 19 - Procedimento in situ IL-DLLME	77
Figura 20 - Cromatograma final da separação dos analitos por HPLC/FLD	79
Figura 21 - Cromatograma para extração das micotoxinas em água pelo método in situ IL-DLLME e HPLC/FLD	81
Figura 22 - Efeito do par líquido iônico e reagente de troca iônica na extração dos analitos	81
Figura 23 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais para resposta múltipla obtida pelo planejamento Plackett–Burman	84
Figura 24 - Distribuição dos pontos experimentais de uma matriz Doehlert para otimização de duas variáveis, representada por um hexágono regular com as coordenadas normalizadas	85
Figura 25 - Superfície de resposta obtida por planejamento Doehlert	87

Figura 26 - Cromatograma (HPLC/FLD) fortificado com as micotoxinas em amostra de água de rio utilizando o método IL-DLLME proposto	89
Figura 27 - Cromatograma (HPLC/FLD) em amostra de água de rio utilizando o método IL-DLLME proposto	90
Figura 28 - Localização da microbacia hidrográfica do córrego Rico, Estado de São Paulo	95
Figura 29 - Microbacia hidrográfica do Córrego Rico com os pontos de coleta	96
Figura 30 - Diagrama unifilar da microbacia hidrográfica do Córrego Rico com os pontos de coleta	97
Figura 31 - Fotos dos locais de amostragem na Microbacia hidrográfica do Córrego Rico	97
Figura 32 - Precipitação acumulada mensal durante o período de realização das coletas na região da bacia hidrográfica do Córrego Rico	100
Figura 33 - Estruturas químicas da <i>trans</i> -ZEN e da <i>cis</i> -ZEN	112
Figura 34 - Fotos dos locais de amostragem em Aveiro, Portugal. (A) Rio Novo do Príncipe; (B) Cais da Fonte Nova (Ria de Aveiro)	113
Figura 35 - Representação esquemática do simulador de irradiação solar (visão lateral) utilizado nas experiências de fotodegradação (Solarbox 1500, Co.fo.me.gra, Itália)	114
Figura 36 - Cinética de pseudo primeira ordem para fotoisomerização/degradação obtidas sob irradiação solar simulada em água ultrapura. (A) fotoisomerização de <i>trans</i> -ZEN a <i>cis</i> -ZEN. (B) Fotodegradação de <i>trans</i> -ZEN. Barras de erros referem-se ao desvio padrão absoluto (n = 3)	118
Figura 37 - Curvas da cinética de pseudo primeira ordem de fotoisomerização/degradação obtidas sob irradiação solar simulada em águas naturais. (A1) fotoisomerização de <i>trans</i> - a <i>cis</i> -ZEN em água de rio. (A2) Fotodegradação de <i>trans</i> -ZEN na água do rio. (B1) fotoisomerização de <i>trans</i> - a <i>cis</i> -ZEN em água estuarina. (B2) Fotodegradação de <i>trans</i> -ZEN em água estuarina. Barras de erros referem-se ao desvio padrão absoluto (n = 3)	120
Figura 38 - Cromatograma obtido na fotólise de <i>trans</i> -ZEN em água de rio após 20 min de irradiação. Picos: 1: <i>trans</i> -ZEN; 2: <i>cis</i> -ZEN. Concentração inicial de <i>trans</i> -ZEN: 100 µg L ⁻¹	122
Figura 39 - Efeito do pH na fototransformação de ZEN	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura química e algumas propriedades das micotoxinas estudadas	36
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas para ZEN, α -ZAL e 17- β -estradiol	37
Tabela 3 - Afinidade de ligação relativa (RBA) ao receptor estrogênico e potencial relativo (RP) de compostos estrogênicos sintéticos e naturais	38
Tabela 4 - ZEN e metabólitos detectados em matrizes de interesse ambiental	40
Tabela 5 - Parâmetros cromatográficos obtidos no desenvolvimento do método HPLC para os analitos	54
Tabela 6 - Condições cromatográficas otimizadas	55
Tabela 7 - Parâmetros otimizados para determinação dos microestrógenos por LC-ESI-MS/MS-QTRAP no modo de ionização negativo por ESI, usando o modo de aquisição SRM	66
Tabela 8 - Linearidade, coeficiente de correlação (r), valores de significância (p) para homoscedasticidade, teste para falta de ajuste e teste de Mandel obtidos para cada micotoxina	67
Tabela 9 - Validação analítica do método proposto	68
Tabela 10 - Comparação do método proposto com outros métodos para a determinação de micotoxinas estrogênicas em amostras de água	71
Tabela 11 - Parâmetros cromatográficos obtidos no desenvolvimento do método	78
Tabela 12 - Parâmetros cromatográficos obtidos para a separação dos analitos nas condições cromatográficas otimizadas para o HPLC/FLD [50:50 (em volume) EtOH:H ₂ O, 1% ácido acético, vazão de 1,0 mL min ⁻¹ e temperatura da coluna de 45 °C]	79
Tabela 13 - Variáveis experimentais e níveis do planejamento Plackett-Burman	83
Tabela 14 - Matriz Doehlert para as variáveis pH e tempo de vórtice com os valores utilizados e as respostas obtidas	86
Tabela 15 - Figuras de mérito obtidas para o método IL-DLLME e HPLC/FLD, aplicado a água ultrapura fortificada com os analitos	88
Tabela 16 - Resultados obtidos pela análise das amostras de água fortificada pelas micotoxinas utilizando o método proposto	90
Tabela 17 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta da microbacia hidrográfica do Córrego Rico (Figura 30)	97
Tabela 18 - Concentrações das micotoxinas estrogênicas (ng L ⁻¹) na microbacia do Córrego Rico. Para ZEN-d ₆ recuperações médias (n=3)	102
Tabela 19 - Concentrações das micotoxinas estrogênicas a partir da microbacia hidrográfica do Córrego Rico, suas correspondentes cEEQ e potência estrogênica relativa. Os cEEQs foram calculadas multiplicando-se as concentrações dos analitos e suas potências relativas	106

Tabela 20 - Concentrações de micotoxinas estrogênicas detectadas em águas superficiais e cEEQ	108
Tabela 21 - Características físico-químicas das águas naturais estudadas	119
Tabela 22 - Parâmetros da cinética de fototransformação da ZEN em três tipos de águas.	120
Tabela 23 - Parâmetros cinéticos de pseudo primeira ordem para a fototransformação de ZEN em diferentes soluções aquosas	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – acetonitrila

ANOVA - análise de variância

APCI – ionização química a pressão atmosférica

As – assimetria

CE – energia de colisão

cEEQ – concentração equivalente em estradiol calculada

CESAM - Centro de Estudos do Ambiente e do Mar

Cwa – classificação climática de Köppen

CXP – potencial de saída da célula

DAD – detector de arranjo de diodos

DDE –diclorodifenildicloroetileno

DDT – diclorodifeniltricloroetano

DE – interferentes endócrinos

DES – estrogênio sintético dietilestilbestrol

DLLME – microextração líquido-líquido dispersiva

DOC – carbono orgânico dissolvido

DOM – matéria orgânica dissolvida

DP – potencial de desagregação

EF – fator de enriquecimento

EM – micotoxinas estrogênicas

EP – potencial de entrada

ESI – ionização por eletrospray

ETA – estação de tratamento de água

ETE – estação de tratamento de esgoto

EtOH – etanol

EUA – Estados Unidos da America

FA – ácidos fúlvicos

F_{calc} – valores calculados de F

FLD – detecção por fluorescência

FM – fase móvel

F_{tab} – valores tabelados de F

GC-MS – cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas

HA – ácidos húmicos

HPAs – hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

IC – carbono inorgânico

IL – líquido iônico

IPCS – Programa Internacional de Segurança Química

IS – padrão interno

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada

k – fator de retenção

LC-MS – cromatografia em fase líquida acoplada à espectrometria de massas

LLE – extração líquido-líquido

LOD – limite de detecção

LOEC - menor concentração efetiva observável

LOQ – limite de quantificação

LT – baixa toxicidade

MEKC – cromatografia eletrocinética capilar micelar

MeOH – metanol

MRM – monitoramento de reações múltiplas

MS – espectrometria de massas

MS/MS – espectrometria de massas modo sequencial

N – número de pratos

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCBs – bifenilos policlorados

PNSB – pesquisa nacional de saneamento básico

PTFE – politetrafluoroetileno

PVDF – fluoreto de polivinilideno

QqQ – triplo quadrupolo

QTRAP – quadrupolo com ion trap linear

RALs – lactonas do ácido resorcíclico

RBA – afinidade de ligação relativa

RSD – desvio padrão relativo

ROS - espécies reativas de oxigênio

RP – potencial relativo

RR – recuperações relativas

R_s – resolução

SP – São Paulo

SPE – extração em fase sólida

SRM – monitoramento de reações seletivas

SSD – dias ensolarados de verão

TC – carbono total

t_R – tempo de retenção

UGRHI – Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos

USEPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

UV-VIS – ultravioleta-visível

VALLME – microextração líquido-líquido assistido por vórtice

ZAN – zearalanona

ZEN – zearalenona

ZEN- d_6 – zearalenona- d_6

α -ZAL – α -zearalanol

α -ZEL – α -zearalenol

β -ZAL – β -zearalanol

β -ZEL – β -zearalenol

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL	28
1.1 Interferentes endócrinos.....	29
1.2 Micotoxinas	31
1.2.1 Zearalenona e metabólitos: definição e ocorrência	32
1.2.2 Propriedades físico-químicas.....	34
1.2.3 Aspectos toxicológicos.....	37
1.3 Métodos analíticos utilizados na determinação de zearalenona e metabólitos	39
1.4 Distribuição e impacto ambiental de micotoxinas estrogênicas	39
1.5 Proposição e Escopo da Tese	43
CAPÍTULO 2 - DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS ESTROGÊNICAS EM ÁGUAS POR MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA COM SOLVENTE DE BAIXA TOXICIDADE E QUANTIFICAÇÃO POR HPLC/FLD OU LC-MS/MS.....	44
2.1 Introdução	45
2.2 Materiais e métodos	47
2.2.1 Reagentes e padrões.....	47
2.2.2 Preparação das soluções padrão	48
2.2.3 Preparação da amostra por DLLME	48
2.2.4 Instrumentação	49
2.3 Resultados e Discussão	50
2.3.1 Otimização do sistema cromatográfico HPLC/FLD.....	50
2.3.2 Otimização dos parâmetros da DLLME para extração de micoestrógenos em amostras de água.....	55
2.3.2.1 Seleção do solvente extrator	56
2.3.2.2 Seleção do solvente dispersor.....	57
2.3.2.3 Efeito do volume de solvente extrator.....	58
2.3.2.4 Efeito do volume de solvente dispersor.....	59
2.3.2.5 Efeito do pH.....	60
2.3.2.6 Efeito da força iônica	61
2.3.2.7 Efeito do volume da amostra	62
2.3.2.8 Efeito da agitação por vórtice	63

2.3.3	Otimização das condições cromatográficas por LC-MS/MS	64
2.3.4	Efeito matriz	66
2.3.5	Validação do método	67
2.3.6	Aplicação do método DLLME e LC-MS/MS em águas naturais.....	69
2.3.7	Comparação com outros métodos de extração	70
2.4	Conclusão	71
CAPÍTULO 3 - DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO ANALÍTICO “VERDE”		
PARA A DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS ESTROGÊNICAS EM ÁGUAS		
SUPERFICIAIS POR MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA COM		
LÍQUIDO IÔNICO E HPLC/FLD.....		
		72
3.1	Introdução	73
3.2	Materiais e métodos	75
3.2.1	Reagentes e padrões.....	75
3.2.2	Instrumentação	76
3.2.3	Procedimento in situ IL-DLLME	76
3.3	Resultados e discussão.....	77
3.3.1	Otimização das condições cromatográficas.....	77
3.3.2	Otimização do procedimento in situ IL-DLLME.....	79
3.3.2.1	<i>Seleção do líquido iônico e reagente de troca aniônica.....</i>	<i>80</i>
3.3.2.2	<i>Planejamento fatorial.....</i>	<i>82</i>
3.3.2.3	<i>Planejamento Doehlert</i>	<i>84</i>
3.3.3	Validação do método	88
3.3.4	Aplicação do método	89
3.4	Conclusão	91
CAPÍTULO 4 - OCORRÊNCIA E CONCENTRAÇÕES DE MICOTOXINAS		
ESTROGÊNICAS NA SUB-BACIA HIDROGRÁFICA DO Córrego Rico		
		92
4.1	Introdução	93
4.2	Materiais e métodos	94
4.2.1	Área de estudo	94
4.2.2	Amostragem e preparo de amostras	96
4.2.3	Reagentes e padrões.....	98
4.2.4	Tratamento das amostras	98
4.2.5	Análise cromatográfica e quantificação dos analitos	99
4.2.6	Análises físico-químicas e microbiológicas.....	99

4.3	Resultados e discussão.....	100
4.3.1	Ocorrência das micotoxinas estrogênicas e variáveis hidrológicas na microbacia do Córrego Rico	100
4.3.2	Relevância ambiental dos resultados obtidos.....	106
4.4	Conclusão	109
CAPÍTULO 5 – FOTODEGRADAÇÃO DE ZEARALENONA EM AMOSTRAS AQUOSAS SOB RADIAÇÃO SOLAR SIMULADA.....		110
5.1	Introdução	111
5.2	Materiais e métodos	112
5.2.1	Reagentes	112
5.2.2	Amostras de água.....	113
5.2.3	Experimentos de irradiação	114
5.2.3.1	<i>Simulador de radiação solar</i>	<i>114</i>
5.2.3.2	<i>Cinética da fototransformação.....</i>	<i>115</i>
5.2.4	Métodos analíticos	116
5.2.4.1	<i>Determinação de ZEN por HPLC.....</i>	<i>116</i>
5.2.4.2	<i>Outras análises.....</i>	<i>116</i>
5.3	Resultados e discussão.....	117
5.3.1	Fototransformação em água ultrapura.....	117
5.3.2	Fototransformação em águas naturais	118
5.3.3	Efeitos de alguns constituintes em águas na fototransfomação de ZEN	122
5.3.4	Influência do pH na fototransformação de ZEN	125
5.3.5	Determinação do rendimento quântico da ZEN para a fotólise direta.....	126
5.3.6	Significância ambiental dos resultados.....	127
5.4	Conclusão	128
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS		129
DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS QUÍMICOS GERADOS		130
REFERÊNCIAS.....		131
APÊNDICES		145

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Interferentes endócrinos

Nos últimos anos, provavelmente nenhuma outra questão de toxicologia ambiental tenha chamado mais atenção da comunidade científica e das autoridades regulatórias, do que um grupo de substâncias presentes no ambiente que pode interferir no sistema endócrino de humanos e outros animais e, com isso, afetar a saúde, o crescimento e a reprodução. Essas substâncias são conhecidas como interferentes endócrinos (DE), do inglês, *endocrine disrupters* (KOIFMAN; PAUMGARTTEN, 2002).

De acordo com o Programa Internacional de Segurança Química (*International Programme on Chemical Safety – IPCS*), um composto com atividade endócrina é definido como “*uma substância ou mistura exógena que altera uma ou várias funções do sistema endócrino e consequentemente causa efeitos adversos sobre a saúde de organismos intactos, ou na sua prole*”. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*U.S. Environmental Protection Agency – USEPA*) propôs uma definição mais detalhada que reflete a diversidade de mecanismos envolvidos nas disfunções do sistema endócrino. Segundo a USEPA, esses compostos são caracterizados como “*agentes exógenos que interferem na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais do corpo que são responsáveis pela manutenção da homeostase e regulação no desenvolvimento*” (DAMSTRA et al., 2012; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1997).

Os primeiros indícios da ação de poluentes ambientais como interferentes endócrinos foram dados por diversas observações sobre o comportamento, a reprodução e o desenvolvimento de animais selvagens, expostos a DDT e seus produtos de degradação. Anomalias no sistema reprodutivo foram observadas em jacarés que habitavam em vários lagos da Flórida (EUA), tais como, concentrações anormais de hormônios sexuais no plasma (baixa concentração de testosterona) e anomalias morfológicas nas gônadas (redução no tamanho do pênis). O principal poluente encontrado nesses jacarés foi o DDE, o mais persistente metabólito do DDT (LINTELMANN et al., 2003). Nos anos 1960, a bióloga Rachel Carson publicou o livro *Silent Spring (Primavera Silenciosa)*, sendo um dos primeiros relatos sobre a ligação da presença do DDT no meio ambiente e o declínio na população de

algumas espécies de animais. Este livro contribuiu para dar início ao movimento ambientalista (SAFE, 2000).

Entre humanos também existem relatos similares. Por exemplo, foi observado que filhas de mulheres que ingeriram o estrogênio sintético dietilestilbestrol (DES), prescrito para a prevenção de aborto espontâneo, nas décadas de 1940-1950, tornaram-se estéreis quando adultas e, uma minoria, desenvolveu uma forma incomum de câncer vaginal durante a adolescência ou no início da idade adulta. Como consequência, o DES foi banido de diversos países na década de 1970 (BIRKETT; LESTER, 2003).

Seguindo a mesma linha de Rachel Carson, surge em 1996 o livro *Our Stolen Future* (Nosso Futuro Roubado) (COLBORN; DUMANOSKI; MYERS, 1997), compilando um importante conjunto de informações que correlacionam a exposição de animais silvestres e mesmo humanos a diversas substâncias químicas com alterações no sistema reprodutivo, no desenvolvimento e na resposta imunológica.

No Brasil, os dados sobre a ocorrência ambiental e os efeitos à biota ou ao homem, dos interferentes endócrinos são bastante esparsos. Embora existam inúmeros estudos sobre a ocorrência ambiental e em alimentos de pesticidas organoclorados, considerados interferentes endócrinos, poucos são os trabalhos que correlacionam a exposição com os efeitos. Um trabalho que merece destaque foi o publicado por Koifman, Koifman e Meyer (2002), que apresenta os resultados de um estudo epidemiológico, que correlaciona a exposição humana a pesticidas durante os anos 1980, em 11 estados brasileiros, com distúrbios reprodutivos (infertilidade e câncer dos testículos, mama, próstata e ovários) observados nos anos 1990. Em relação à fauna silvestre, merecem destaque os estudos de masculinização de fêmeas de moluscos induzida por tributilestanho, utilizado em tintas anti-incrustantes de uso náutico (FERNANDEZ et al., 2002; SANTOS et al., 2009).

As substâncias classificadas como interferentes endócrinos, incluindo substâncias naturais e sintéticas, que são usadas ou produzidas para inúmeras finalidades podem ser divididas basicamente em dois grupos: (i) substâncias sintéticas que são empregadas na agricultura e seus subprodutos, como inseticidas, herbicidas, fungicidas e moluscicidas; utilizadas nas indústrias e seus subprodutos, como dioxinas, furanos, PCBs, alquilfenóis e seus subprodutos, HPAs, compostos organoestânicos, ftalatos, bisfenol A, metais (cádmio, mercúrio, chumbo), entre outros; compostos farmacêuticos, como os estrogênios sintéticos DES e 17 α -

etinilestradiol e, (ii) substâncias naturais – fitoestrogênios, tais como, genisteína e daidzeína; estrogênios naturais 17 β -estradiol, estrona e estriol (SILVA; COLLINS, 2011). Neste cenário, menor atenção tem sido dada à ocorrência natural das micotoxinas estrogênicas (GROMADZKA et al., 2009).

1.2 Micotoxinas

Etimologicamente o termo MICOTOXINA combina a palavra grega “Mykes” que significa fungo com o termo do latim, “toxicum” que quer dizer, veneno (toxina). (TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009). Micotoxinas são metabólitos secundários, biossintetizados e excretados através de um conjunto de vias metabólicas, não essenciais para o crescimento e sobrevivência do organismo, com variado grau de toxicidade e produzidos por diversos fungos, tendo destaque os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. O crescimento fúngico e produção de micotoxinas dependem de uma complexa interação de diversos fatores, como umidade, temperatura, oxigênio e substrato. Os principais substratos para a produção dessas toxinas são os cereais, como o milho, trigo, aveia, cevada etc. Sendo que umidade e temperatura elevadas e condições aeróbicas favorecem a proliferação fúngica e a produção de micotoxinas (DOLL; DANICKE, 2011).

Ainda não há consenso quanto aos fatores que levam à produção das micotoxinas pelos fungos, já que nem todos eles as produzem, mas é fato que algumas medidas podem e devem ser adotadas na sua prevenção. Dentre estas, podemos citar a utilização de linhagens de plantas resistentes à colonização fúngica, colheita apropriada, estocagem adequada, controle de insetos e roedores, controle de temperatura e umidade, tempo de estocagem dentro dos limites de vitalidade dos grãos e irradiação dos grãos (SANTOS et al., 2014).

As condições climáticas de um local determinam, em grande parte, as classes de fungos que irão crescer e os tipos de micotoxinas que podem produzir. No Brasil, onde há predominância do clima tropical (quente e úmido), existem condições propícias para o crescimento de todos tipos de fungos produtores de micotoxinas (MAZIERO; BERSOT, 2010).

Estas substâncias, tóxicas para seres humanos e animais, têm causado impacto na economia e na saúde pública. Segundo Bennett e Klich (2003), entre 25-

50% de todos os produtos agrícolas no mundo, especialmente os básicos, estão de alguma forma contaminados com micotoxinas.

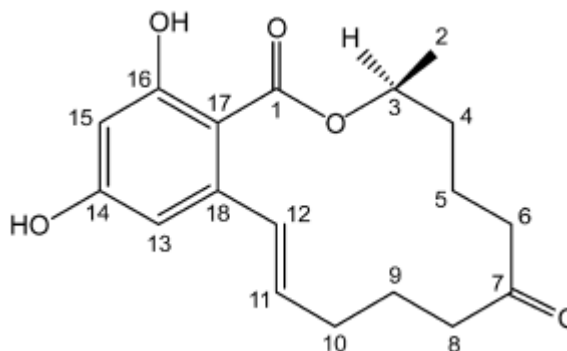
As micotoxinas são moléculas com estruturas que variam de simples anéis heterocíclicos apresentando massa molar de até 50 Da, a grupos de 6 a 8 anéis heterocíclicos irregularmente dispostos e com massa molar maior que 500 Da. Mais de 400 substâncias já foram identificadas como micotoxinas, sendo que seis delas são consideradas importantes do ponto de vista de saúde pública: aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂), ocratoxina A, patulina, fumosinina, deoxinivalenol e zearalenona (AMARAL et al., 2006).

1.2.1 Zearalenona e metabólitos: definição e ocorrência

Entre os fungos produtores de micotoxinas, os fungos do gênero *Fusarium* se destacam como um dos mais importantes em termos de perdas globais devido às micotoxicoses (ESCRIVÁ; FONT; MANYES, 2015). Em meio a várias classes de micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium*, as lactonas do ácido resorcíclico (*resorcylic acid lactones* – RALs) são as que apresentam comportamento que induz a desregulação endócrina. A micotoxina representativa da classe das RALs é a zearalenona (ZEN), citada entre as micotoxinas mais comuns em todo o mundo (SCHWARTZ et al., 2010). Várias espécies e subespécies de fungos do gênero *Fusarium* são responsáveis pela produção de zearalenona (*F. roseum*, *F. tricinctum*, *F. roseum "culmorum"*, *F. roseum "equiseti"*, *F. roseum "gibbosum"*, *F. roseum "graminearum"*, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum* e *F. moniliforme*).

A ZEN pode ser identificada pelo nome IUPAC "(3S,11E)-14,16-dihydroxy-3-methyl-3,4,5,6,9,10-hexahydro-1H-2-benzoxacyclotetradecine-1,7(8H)-dione" (trans-ZEN, CAS: 17924-92-4) ou 6-(10-hydroxy-6-oxotrans-1-undecenyl)-β-resorcylic-acid-lactone. Aparentemente, o nome "zearalenone" combina os termos de sua ocorrência predominante "zea" para o milho (*Zea mays*) com características químicas ("ral" para resorcylic acid lactone, "en" para a ligação dupla entre C₁₁ e C₁₂ e "one" para a cetona no C₇ (Figura 1). Essa terminologia foi utilizada pela primeira vez por Urry et al. (1966), que elucidaram estruturalmente esse composto (KÖPPEN et al., 2012).

Figura 1 - Estrutura química da zearalenona



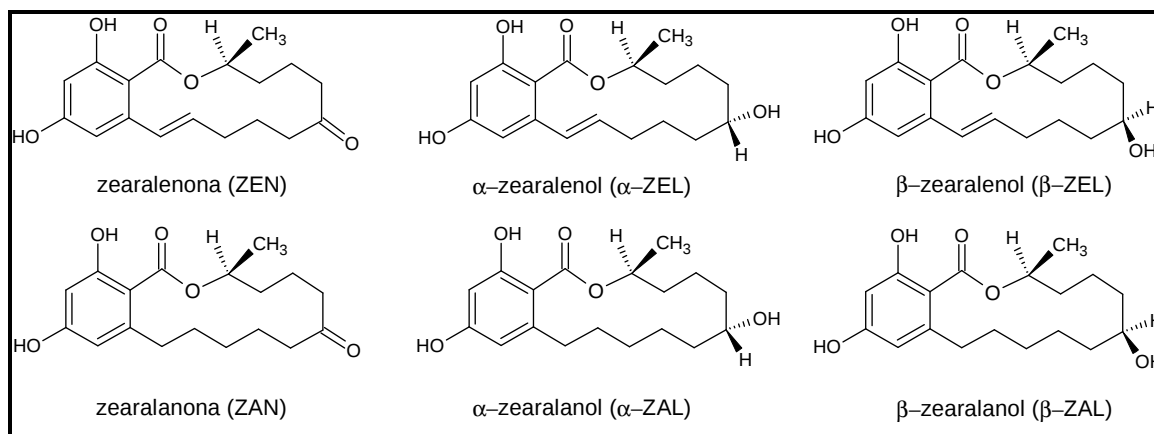
Fonte: o autor.

A ZEN é considerada como um contaminante natural em alimentos, estável, tanto durante o armazenamento como no processamento do alimento, não se degradando a altas temperaturas. A biossíntese dessa substância foi observada em várias espécies de *Fusarium*, incluindo *F. culmorum*, *F. crookwellens*, *F. equiseti*, e principalmente, por *F. graminearum* (BENNETT; KLICH, 2003). Estas espécies são contaminantes frequentes de cereais (grãos) em todas as regiões do mundo.

A biossíntese da zearalenona é observada majoritariamente em milho, e em menor incidência em arroz, aveia, trigo, soja e cevada (GROMADZKA et al., 2008; GROMADZKA et al., 2009; MASSART; SAGGESE, 2010). Alguns fatores estão relacionados com o grau de contaminação por zearalenona: (i) condições climáticas, (ii) rotação de culturas, (iii) cultivo do solo: aração ou mobilização do solo e (iv) susceptibilidade de culturas (HARTMANN et al., 2008a).

Em suínos e provavelmente em humanos, a ZEN é absorvida rapidamente após administração por via oral e metabolizado nas células intestinais. Nessas células, o grupo cetona no C-7 é reduzido por hidroxilação ao diastereoisômero α -zearalenol (α -ZEL) e β -zearalenol (β -ZEL), zearalanona (ZAN), α -zearalanol (α -ZAL) (também chamado de “zeranol”) e β -zearalanol (β -ZAL) (também chamado de “taleranol”), nas quais são posteriormente conjugadas com ácido glicurônico ou sulfônico e eliminado na urina (Figura 2) (KINANI et al., 2008).

Figura 2 - Estruturas químicas das principais lactonas do ácido resorcílico (RALs)



Fonte: Adaptado de Hartmann et al. (2007).

Os metabólitos α-ZEL, β-ZEL, ZAN, α-ZAL e β-ZAL podem ser detectados em caules de milho infectados com *Fusarium* e na cultura de arroz (ZINEDINE et al., 2007). Schollenberger et al. (2006) relataram a ocorrência de α-ZEL e β-ZEL em produtos à base de milho, silagem de milho e farinha de soja em níveis de 3-116 µg g⁻¹. Devido às suas propriedades anabolizantes, α-ZAL ainda é utilizado como agente anabólico (Ralgro[®]) para gado na produção de carne nos Estados Unidos e Canadá, mas foi banida por todos os países membros da União Européia desde 1985 (MASSART; SAGGESE, 2010). Vários países estabelecem limites máximos permitidos de ZEN nos alimentos, variando de 50 a 1000 µg kg⁻¹ (MARAGOS, 2010).

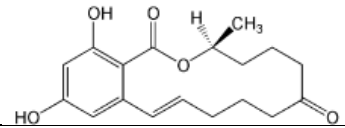
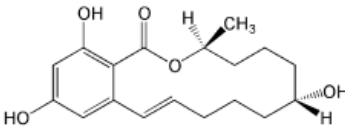
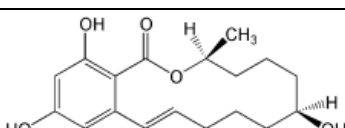
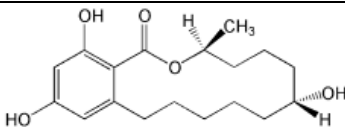
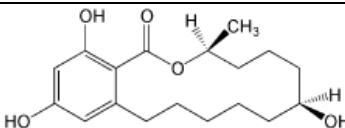
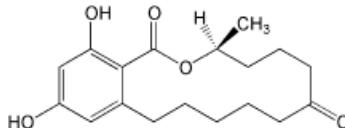
No Brasil, existem poucos trabalhos sobre a incidência de fusariotoxinas. A ocorrência de ZEN, por exemplo, foi relatada em milho (MACHINSKI JÚNIOR et al., 2001), arroz (DORS, BIERHALS; BADIALE-FURLONG, 2011) e trigo (FURLONG et al., 1995) na região sul e sudeste. Considerando os fungos do gênero *Fusarium*, as fusariotoxinas são produzidas, na sua maioria, sob alta umidade e em temperaturas de aproximadamente 20 a 26°C, o clima brasileiro oferece boas condições para que essas toxinas estejam presentes nos grãos utilizados nas dietas dos animais e seres humanos (SANTIN et al., 2001).

1.2.2 Propriedades físico-químicas

As propriedades físicas e químicas são importantes para as previsões das rotas a serem percorridas pelas micotoxinas no ambiente. As micotoxinas estrogênicas são classificadas como moderadamente solúveis em água variando de

0,55 a 1000 mg L⁻¹ de acordo com o pH do meio aquoso (Tabela 1) e hidrofobicidade moderada (log K_{ow}: 2,765 a 4,648) (D'ORAZIO et al., 2014; GAJEĆKA et al., 2011). Isto indica alguma mobilidade em fase aquosa ambiental e potencial de sorção e retenção em sistemas de solo (log K_{oc}: 3,9; MORTENSEN et al., 2006). A sua estabilidade durante a moagem, processamento de alimentos e aquecimento (sem perda significativa da ZEN durante o processamento durante 80 min a 100 °C) é considerável (RYU et al., 2003).

Tabela 1 - Estrutura química e algumas propriedades das micotoxinas estudadas

Substância (abreviação)	CAS	Estrutura química	Massa molar (g mol ⁻¹)	log K _{ow}	pKa	Solubilidade em água (mg L ⁻¹ , 25°C)
Zearalenona (ZEN)	17924-92-4		318,4	2,765	7,58 ^a	0,96 ^b 76 ^c 1000 ^d
α-Zearalenol (α-ZEL)	36455-72-8		320,4	3,184	7,61 ^a	1,9 ^b 130 ^c 1000 ^d
β-Zearalenol (β-ZEL)	71030-11-0		320,4	3,184	7,61 ^a	1,9 ^b 130 ^c 1000 ^d
α-Zearalanol (α-ZAL)	26538-44-3		322,4	4,648	8,08 ^a	0,55 ^b 12 ^c 387 ^d
β-Zearalanol (β-ZAL)	42422-68-4		322,4	4,648	8,08 ^a	0,55 ^b 12 ^c 387 ^d
Zearalanona (ZAN)	5975-78-0		320,4	n.e	n.e	n.e

^a Valor para o pKa₁; ^b Solubilidade a pH 3; ^c Solubilidade a pH 7; ^d Solubilidade a pH 10; n.e: não encontrado

Fonte: Adaptado de D'Orazio et al. (2014)

Considerando-se as propriedades físico-químicas de ZEN e α -ZAL, as duas RALs de maior interesse ambiental, observa-se que são similares ao estrógeno natural 17- β -estradiol (Tabela 2). Assim sendo, pode-se inferir que o comportamento de mobilidade ambiental é similar entre esses compostos.

Mortensen et al. (2003) descreveu o destino da ZEN em solos e relataram uma meia-vida global entre 6 e 11 dias, incluindo degradação e sorção irreversível, mas sem dados de quantificação e análise dos produtos de degradação. Esses dados corroboram que a ZEN pode persistir no ambiente, assim como seus metabólitos.

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas para ZEN, α -ZAL e 17- β -estradiol

Compostos	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	log K _{ow} *	log K _{oc} **	pK _a	Meia-vida (solo) (dias)
ZEN	5	2,765	3,9	7,58	6-11
α -ZAL	4-28 ^c	4,648	n.d. ^a	8,4 ; 11,4 ^b	7-30
17- β -estradiol	13	4,0	3,1-3,7	10,4	3

* log K_{ow} – coeficiente de partição octanol/água

** log K_{oc} - coeficiente de adsorção solo/água

^a n.d – não disponível

^b pK_{a1} e pK_{a2}

^c A pH 5, 7 e 9

Fonte: Adaptado de Hartmann et al. (2008b).

1.2.3 Aspectos toxicológicos

A denominação de toxina para a zearalenona é considerada inadequada uma vez que, embora biologicamente potente, ela é raramente tóxica (TIEMANN; DÄNICKE, 2007). A zearalenona e seus metabólitos são conhecidos como potentes interferentes endócrinos. O potencial estrogênico relativo e afinidade de ligação ao receptor de estrogênio (Tabela 3) estão próximos aos estrógenos naturais (estrone e estriol), sendo de maior ordem de grandeza do que os interferentes endócrinos sintéticos, tais como bisfenol A, DDT ou atrazina, assim como, os fitoestrógenos (HARTMANN et al., 2008b). A atividade estrogênica de α -ZEL é 3 a 100 vezes maior que a ZEN (MINERVINI et al., 2005). Os resultados de três diferentes bioensaios utilizando ativação do gene receptor de estrogênio revelou que α -ZEL é 17 vezes mais potente que o estrógeno sintético α -etinilestradiol (LE GUEVEL e PAKDEL, 2001).

Tabela 3 - Afinidade de ligação relativa (RBA) ao receptor estrogênico e potencial relativo (RP) de compostos estrogênicos sintéticos e naturais

Substância	RBA (humano)	RBA camundongo	RBA Peixe (truta)	RP (humano)
Estrógenos naturais				
17- β -estradiol	100	100	100	100
Estrona	45	28	14	9,6
Estriol	28	13	3,7	0,63
RALs				
ZEN	9,3	12	82	0,26
α -ZEL	48	53	267	8,7
β -ZEL	13	11	91	0,066
α -ZAL	n.a	n.a	n.a	1,3
β -ZAL	n.a	n.a	n.a	0,46
Fitoestrógenos				
Coumestrol	0,81	0,33	0,24	0,67
Genisteína	0,46	0,33	0,44	0,049
Interferentes endócrinos sintéticos				
Bisfenol A	0,0080	0,0086	0,21	0,005
4-Nonilfenol	n.a	n.a	n.a	0,0022
4-Octilfenol	n.a	n.a	n.a	0,003
o',p' -DDT	-	0,0076	0,43	0,00011
Metoxiclor	-	-	0,95	0,0033
Butilbenzilftalato	-	-	-	0,0004
Atrazina	-	-	-	n.a

n.a: não analisado

Fonte: Coldham et al. (1997), Matthews et al. (2000).

Diversos estudos apontam a correlação entre a exposição a ZEN e seus metabólitos e disfunções reprodutivas e hepáticas em mamíferos (GUEVEL; PAKDEL, 2001; MAZIERO; BERSOT, 2010; MINERVINI et al., 2005, PISTOL et al., 2014). Em estudo conduzido por Doll e Danicke (2011) concluiu-se que suínos são mais sensíveis do que aves à exposição a ZEN, mesmo em baixas doses, ocorrendo alterações no sistema reprodutivo dos animais expostos.

Schwartz et al. (2010) concluíram que a ZEN pode contribuir para atividade estrogênica global no ambiente e, portanto, poderia representar um risco para peixes selvagens em seu habitat natural, uma vez que em estudo conduzido com “zebrafish” houve alteração na capacidade reprodutiva (frequência de desova e fecundidade) para animais expostos a baixas concentrações (100 a 3200 ng L⁻¹), por 21 dias.

Para humanos, a exposição a ZEN foi correlacionada com alterações no início da puberdade (telarca) e efeitos sobre o sistema imunológico em crianças (TINYIRO et al., 2011). A presença de α -ZEN no soro sanguíneo de mulheres portadoras de lesões neoplásicas do sistema reprodutivo foi relatada por Gajecka et al. (2004).

1.3 Métodos analíticos utilizados na determinação de zearalenona e metabólitos

Métodos de análise foram desenvolvidos para a detecção da ZEN e os seus metabólitos em várias matrizes como a urina, plasma, rações, fezes, alimentos, sedimentos, leite, cerveja e grãos (PALLARONI; VON HOLST, 2003).

Para matrizes ambientais a determinação dos micoestrógenos requer um método analítico seletivo e sensível, uma vez que estas substâncias estão presentes em concentrações da ordem de ng L^{-1} ou ng kg^{-1} (SCHENZEL; SCHWARZENBACH; BUCHELI, 2010).

Atualmente, a técnica instrumental de análise mais utilizada para a determinação da ZEN e seus metabólitos é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em combinação com uma variedade de detectores, destacando-se o detector de arranjo de diodos (DAD), o detector de fluorescência e, em especial, com os espectrômetros de massas. O detector fluorimétrico (FLD) pode ser utilizado para a detecção de ZEN devido à capacidade dessa substância de fluorescer, apresentando melhor detectabilidade do que o DAD, para estes compostos HPLC/FLD é a técnica de análise de uso mais frequente para determinação de ZEN (KWAŚNIEWSKA; GADZAŁA-KOPCIUCH; CENDROWSKI, 2015).

Comparado com os detectores DAD e FLD, a espectrometria de massas acoplada com a cromatografia líquida (LC-MS) oferece a vantagem de apresentar alta seletividade e ser aplicável à detecção de múltiplos analitos. Por outro lado, a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), embora exija a derivação química para os micoestrógenos, continua como alternativa em relação à LC-MS (KINANI et al., 2008).

1.4 Distribuição e impacto ambiental de micotoxinas estrogênicas

Embora a ocorrência da ZEN e seus metabólitos tenha sido estudada extensivamente em alimentos para humanos e animais, pouco é conhecido sobre seu impacto e distribuição ambiental, sendo que poucos trabalhos foram realizados com este enfoque (SCHENZEL; SCHWARZENBACH; BUCHELI, 2010). Algumas publicações relataram a ocorrência de ZEN em águas superficiais, subterrâneas, afluentes e efluentes de estações de tratamento de esgoto e indústrias, sendo que as

concentrações de ZEN e seus metabólitos variaram de não detectado até 4120 ng L⁻¹ (Tabela 4). Em alguns casos, também outros RALs, tais como, α -ZAL, β -ZAL e α -ZEL foram detectados em níveis próximos a ZEN. Os RALs, ZAN e β -ZEL nunca foram detectados ou não foram analisados em amostras aquosas ambientais.

Tabela 4 - ZEN e metabólitos detectados em matrizes de interesse ambiental

Micotoxinas(s) analisada(s)	Matriz	Local	Extração	Técnica de análise	Concentração (ng L ⁻¹)	Referência
ZEN, α -ZEL, β -ZEL, α -ZAL, β -ZAL, ZAN	Efluente de ETE	Itália	SPE	LC-APCI-MS/MS	1-7 (ZEN) 1-11 (α -ZEL)	Lagana et al. (2001)
α -ZEL	Efluente de ETE, água fluvial	Alemanha	SPE	LC-ESI-MS/MS	Efluente ETE 20 e 30 Água fluvial < LOQ	Pawlowski et al. (2004)
ZEN, α -ZAL, β -ZAL	Afluente e efluente de ETE, água fluvial	Itália	SPE	LC-APCI-MS/MS	Afluente ETE 3-18 (ZEN); n.d-10 (α -ZAL); n.d-10 (β -ZAL) Efluente ETE 3-10 (ZEN); n.d-7 (α -ZAL); n.d-5 (β -ZAL) Água fluvial 2-5 (ZEN); n.d-3 (α -ZAL); n.d-3 (β -ZAL)	Lagana et al. (2004)
ZEN	Água fluvial	Suíça	SPE	LC-APCI-MS/MS	n.d-35	Bucheli et al. (2008)
ZEN	Afluente e efluente de ETE, água fluvial, água de drenagem e água subterrânea	Polônia	Coluna de imunoafinidade	HPLC/FLD	Afluente ETE 1,0-5,0 Efluente ETE n.d -2,7 Água fluvial 1,4-43,7 Água subterrânea n.d -0,5 Água de drenagem 7,6-12,3	Gromadzka et al. (2009)
ZEN	Solo, lodo de esgoto e esterco (bovinos e suínos)	Suíça	LLE (esterco) Soxhlet (solo e lodo de esgoto)	LC-ESI-MS/MS	Solo n.d-8 ng g ⁻¹ Lodo de esgoto n.d-8 ng g ⁻¹ Esterco 8-333 ng g ⁻¹	Hartmann et al. (2008c)

Tabela 4 - ZEN e metabólitos detectados em matrizes de interesse ambiental (Continuação)

Micotoxinas(s) analisada(s)	Tipo de amostra	Local	Extração	Técnica de análise	Concentração (ng L ⁻¹)	Referência
ZEN	Água de drenagem e solo	Suíça	SPE (água) Soxhlet (solo)	LC-ESI-MS/MS	Solo n.d-3,8 ng g ⁻¹ Água de drenagem n.d-35,0	Hartmann et al. (2008a)
ZEN	Afluente e efluente industrial, Afluente e efluente de ETE	Estados Unidos	SPE	LC/ESI-MS/MS	Efluente bruto (industrial) 4120 Efluente tratado (industrial) 95,5-220 Afluente ETE 127	Lundgren e Novak (2009)
ZEN, α -ZEL, β -ZEL	Efluente de ETE, água fluvial e água de drenagem	Suíça	SPE	LC-ESI-MS/MS	< LOQ (ZEN) para água fluvial e drenagem LOQ = 6 ng L ⁻¹	Schenzel, Schwarzenbach e Bucheli (2010)
ZEN	Água de drenagem	Estados Unidos	SPE	LC-MS/MS (QqQ)	n.d-8	Kolpin et al. (2010)
ZEN	Água de lago	Estados Unidos	SPE	HPLC/FLD	n.d-5,7	Maragos (2012)
ZEN, α -ZEL, β -ZEL	Córregos fluviais (área de agricultura e ETE)	Estados Unidos	SPE	LC-ESI-MS/MS	n.d-1828	Kolpin et al. (2014)
ZEN, α -ZEL, β -ZEL	Afluente e efluente de ETE	Polônia	Coluna de imunoafinidade	HPLC/FLD	n.d-19,8	Gromadzka et al. (2015)

APCI: ionização química a pressão atmosférica; ESI: ionização por eletrospray; FLD: detector de fluorescência; LLE: extração líquido-líquido; MS/MS: espectrometria de massas modo sequencial; n.d: não detectado; QqQ: triplo quadrupolo; SPE: extração em fase sólida; ETE: Estação de tratamento de esgoto; < LOQ: menor que o limite de quantificação.

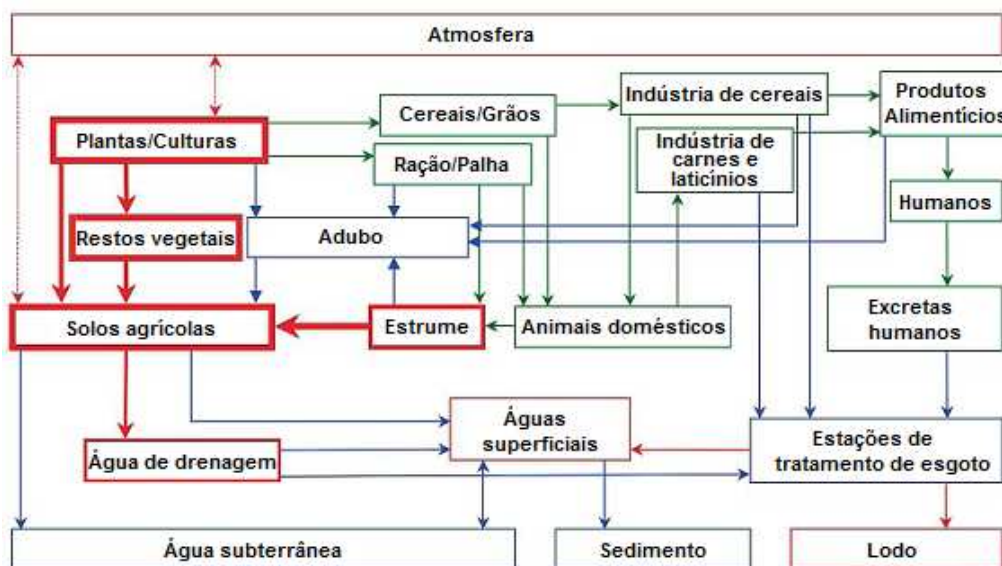
Fonte: o autor.

Com base nas propriedades físico-químicas e em conjunto com os resultados de estudos ambientais pretéritos, Bucheli et al. (2005) apontaram algumas hipóteses para a presença das micotoxinas estrogênicas no ambiente aquático: (1) toxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium* em plantas podem: (i) contaminar e penetrar no solo e se infiltrar em águas subterrâneas; (ii) eluir por escoamento

superficial ou drenagem subsuperficial para águas superficiais ou estação de tratamento de esgoto; (2) resíduos da toxina em fezes de animais expostos podem penetrar nos solos agrícolas e águas locais diretamente ou por meio da aplicação de esterco (excremento de animais ou vegetais apodrecidos); (3) efluente de indústria de alimentos e/ou excreções humanas podem introduzir resíduos de toxina através de sistemas de esgoto nas águas superficiais.

Hartmann et al. (2008a) demonstraram que campos agrícolas contaminados por *Fusarium graminearum* são fontes potenciais de RALs e que estas micotoxinas estrogênicas adentram em águas superficiais via drenagem e escoamento superficial (Figura 3).

Figura 3 - Proposta da distribuição ambiental das micotoxinas estrogênicas



Fonte: Adaptado de Hartmann et al. (2008a).

Nota: Caixas na cor vermelha e setas grossas: refletem uma rota de aporte com relativa importância; vermelhas pontilhadas: rota em que a transferência de ZEN não ocorre; Verde: rota já bem estudada e compreendida; Azul: rota ainda pouco estudada

Para o Brasil, há uma peculiaridade no aporte das micotoxinas estrogênicas no ambiente. Como o tratamento de esgoto é inexistente ou precário, na maioria dos municípios, teríamos uma seta entre a excreta humana e as águas superficiais. A criação extensiva de animais de corte, principalmente bovinos, também indica que teríamos no cenário brasileiro uma seta entre a excreta animal (esterco) e as águas superficiais, pois os animais defecam e urinam diretamente nos corpos d'água.

Devido à ocorrência de zearalenona em afluentes e efluentes de estações de tratamento de esgoto e sua afinidade com o carbono orgânico do solo, espera-se

que essa substância esteja presente também no lodo de esgoto. Por isso, além de culturas agrícolas contaminadas com *Fusarium*, lodo de esgoto e esterco poderiam ser outras fontes potenciais de entrada da zearalenona para o ambiente agrícola, especialmente o solo. Hartmann et al. (2008c) investigaram a presença de ZEN em esterco de bovinos e suínos, solo e lodo de esgoto. Os níveis de ZEN nessas matrizes foram da ordem de ng g^{-1} .

No Brasil, atualmente não há dados sobre a contaminação de amostras ambientais por micoestrógenos. Em outros países, poucos são os estudos dessas substâncias no ambiente, destacando-se quatro países: Itália, Suíça, Polônia e Estados Unidos.

Considerando-se que a fonte dos micoestrógenos é basicamente a mesma dos estrógenos e que este grupo de pesquisa tem estudado a ocorrência e dispersão de estrógenos naturais em mananciais hídricos próximos a Araraquara, neste trabalho a área de estudo foi o Córrego Rico, no trecho entre os municípios de Monte Alto e Jaboticabal, onde existem contribuições de esgoto in natura, tratado e excreta animal, sendo também o manancial que abastece a população de Jaboticabal.

1.5 Proposição e Escopo da Tese

Neste trabalho objetivou-se avaliar a ocorrência, concentrações e persistência das micotoxinas estrogênicas no ambiente aquático da sub-bacia hidrográfica do Córrego Rico na região centro-norte do estado de São Paulo. Destaca-se nessa tese, o uso de técnicas analíticas de microextração na preparação das amostras de acordo com os princípios da Química Verde. Por dados da literatura, esta é a primeira vez que a ocorrência de ZEN e seus metabólitos foram investigados em tais detalhes em águas naturais (rio) no Brasil.

A parte experimental dessa tese está dividida em quatro capítulos com enfoques analíticos (Capítulos 2 e 3) e ambientais (Capítulos 4 e 5). Na seção analítica, destaca-se o desenvolvimento de duas metodologias analíticas por DLLME e cromatografia líquida de alta eficiência na determinação das micotoxinas estrogênicas em águas naturais. Na seção ambiental foi avaliada a presença dos analitos em águas de rio (Córrego Rico) com avaliação espaço-temporal e a persistência da micotoxina zearalenona em ambientes aquáticos.

CAPÍTULO 2 - DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS ESTROGÊNICAS EM ÁGUAS POR MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA COM SOLVENTE DE BAIXA TOXICIDADE E QUANTIFICAÇÃO POR HPLC/FLD OU LC-MS/MS

(parte dos resultados deste capítulo foi publicada: Journal of Chromatography A, v. 1391, p.1-8, 2015)

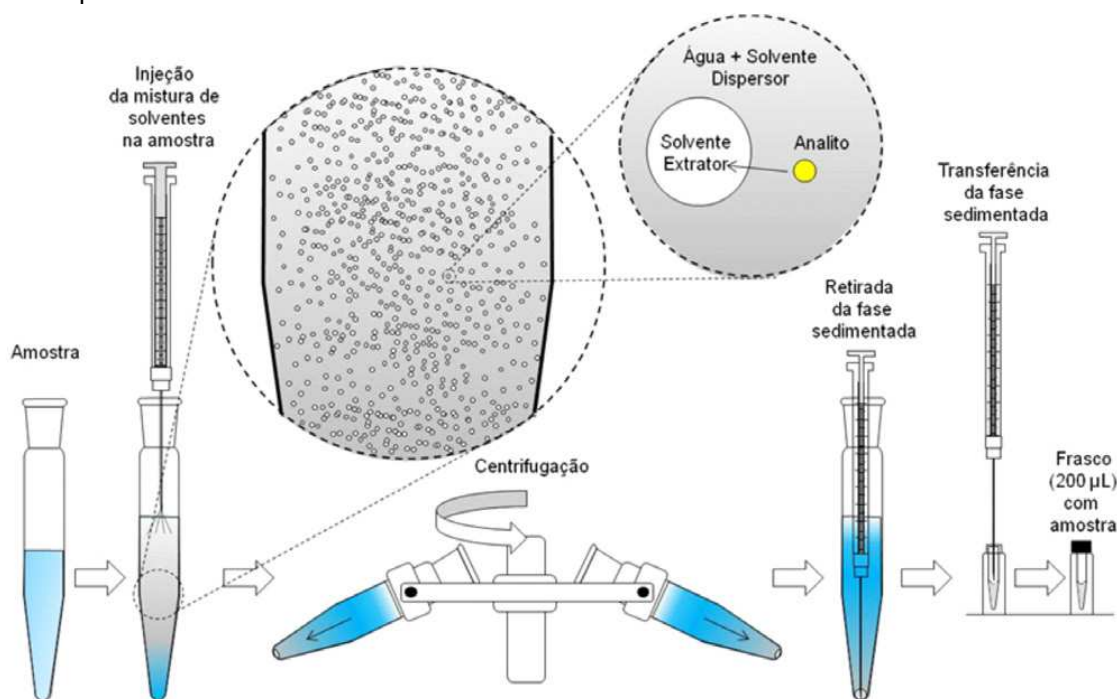
2.1 Introdução

A quantificação exata e precisa de micotoxinas estrogênicas na ordem de ng L^{-1} em águas naturais requer o uso de um método analítico altamente seletivo e sensível. Para atingir estes baixos limites de detecção, a pré-concentração por extração em fase sólida (SPE) antes da detecção foi preferida ao longo da última década (GROMADZKA et al., 2004; HARTMANN et al., 2007; LAGANA et al., 2004; LUNDGREN; NOVAK, 2009; KOLPIN et al., 2014; SCHENZEL; SCHWARZENBACH; BUCHELI, 2010). No entanto, a técnica de SPE também possui desvantagens (por exemplo, o tempo elevado de extração, os altos custos dos cartuchos, dos dispositivos comerciais multivias, manifolds e, eventualmente, a dificuldade em selecionar o sorvente adequado para a aplicação desejada) e requer grande quantidade de solventes orgânicos, por vezes tóxicos (XIAO-HUAN et al., 2009). Além disso, a SPE gera uma quantidade considerável de resíduos, incluindo cartuchos de SPE descartáveis contaminados (YAN; WANG, 2013).

Recentemente, métodos de microextração têm atraído atenção como uma alternativa aos procedimentos de extração clássicos. Deste modo, pesquisadores têm focado recentemente em técnicas ambientalmente corretas e em reduzir os custos de análise através da redução ou eliminação da utilização de solventes orgânicos de alta toxicidade (OJEDAS; ROJAS, 2011).

Em 2006, Rezaee et al. desenvolveram a uma nova técnica de microextração em fase líquida denominada de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME). Essa técnica engloba a pré-concentração de amostras que atende os requisitos de miniaturização, baixo custo, fácil manipulação, rapidez e alta eficiência de extração. O princípio básico da técnica DLLME, é a dispersão de um solvente extrator (imiscível em água) e um solvente dispersor (miscível em água e no solvente extrator) em uma solução aquosa, o que proporciona uma grande área de contato entre a fase aquosa e o solvente extrator. As etapas dessa técnica estão ilustradas na Figura 4.

Figura 4 - Etapas envolvidas na técnica DLLME



Fonte: Adaptado de Caldas, Costa e Primel (2011).

A DLLME se baseia na extração de analitos em amostras aquosas utilizando uma mistura adequada de um solvente de extração e um agente dispersante, produzindo-se uma solução turva. As vantagens desta técnica incluem a sua simplicidade, rapidez e alto fator de enriquecimento (EF). A principal dificuldade dessa técnica é a seleção correta da mistura dos solventes (extração e dispersante), porque as perdas dos analitos por partição podem ocorrer. Para evitar esta situação, vários autores sugeriram que os agentes dispersantes podem ser eliminados utilizando um solvente de extração adequado com uma etapa de agitação para formar a solução turva (SALGUEIRO-GONZÁLEZ et al., 2012). Os solventes convencionais de extração para a DLLME tais como clorobenzeno, clorofórmio, dissulfeto de carbono e tetracloreto de carbono são frequentemente utilizados. No entanto, esses solventes são altamente tóxicos e não são ambientalmente amigáveis. Recentemente, muitos pesquisadores tentaram usar solventes de baixa toxicidade, com uma densidade menor que a água em DLLME (por exemplo, álcoois ou hidrocarbonetos de cadeia longa) (YAN; WANG, 2013). No entanto, a logística necessária para recuperar o solvente de extração é mais complexa dentro da aplicação de solventes de baixa densidade baseada em microextração líquido-líquido, exigindo a utilização de dispositivos ou vidrarias especiais (LEONG; FUH;

HUANG, 2014). Em 2010, Leong et al. propuseram o uso de solvente orgânico com bromo de baixa toxicidade (1-bromo-3-metilbutano) para extração em DLLME. Este solvente foi utilizado na técnica chamada (LT-DLLME) e combinado com GC-MS para extrair e detectar 16 HPAs em amostras de água. Particularmente, certos solventes bromados (isto é, 1-bromooctano e bromociclohexano) são menos tóxicos do que os solventes convencionais de baixa densidade (por exemplo, 1-octanol e tolueno) em DLLME (LEONG; FUH; HUANG, 2014; LEONG; HUANG, 2012).

Por revisão da literatura, este estudo é o primeiro uso da DLLME e LC-ESI/MS/MS para extrair e identificar ZEN e seus metabólitos, incluindo zearalanona (ZAN), α -zearalanol (α -ZAL), β -zearalanol (β -ZAL), α -zearalenol (α -ZEL) e β -zearalenol (β -ZEL) em amostras ambientais aquosas. Além disso, este estudo é um dos poucos a utilizar bromosolventes como solventes de extração para a DLLME (LEONG et al., 2010; LEONG; HUANG, 2012).

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Reagentes e padrões

Os padrões ZEN, ZAN, α -ZAL, β -ZAL, α -ZEL e β -ZEL foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA), com pureza superior a 98%. O padrão interno (IS) zearalenona- d_6 (ZEN- d_6) foi obtido da Toronto Research Chemicals (North York, ON, Canadá). Os solventes orgânicos metanol (MeOH), acetona, acetonitrila (ACN), e 2-propanol, todos grau HPLC, foram adquiridos da JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). 1-bromo-3-metilbutano bromociclohexano e bromobenzeno foram obtidos a partir da Alfa Aesar (MA, EUA), e 1-bromooctano (Sigma Aldrich), clorofórmio e tetracloreto de carbono (JT Baker, Phillipsburg, NJ, EUA) foram utilizados como solventes de extração. O hidróxido de sódio e ácido clorídrico (HCl, 37% m/v) foram comprados da JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA) e foram usadas para ajustar o pH das amostras de água. Água deionizada foi obtida por um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, EUA).

2.2.2 Preparação das soluções padrão

Os padrões de ZEN, ZAN, α -ZEL, β -ZEL, α -ZAL, β -ZAL e ZEN- d_6 (IS) foram pesados em balança analítica e dissolvidos em acetonitrila em concentrações de 100 a 400 mg L⁻¹ (soluções de estoque). As soluções foram armazenadas a -20 °C em frascos âmbar, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente antes da sua utilização. As soluções da curva analítica e soluções para fortificação (“spike”) foram preparadas a partir de diluições apropriadas da solução estoque em acetonitrila. As soluções de trabalho foram preparadas imediatamente antes da utilização. Todas as soluções padrão e de extratos das amostras foram filtrados através de filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) (0,45 μ m x 4 mm), antes da injeção no sistema cromatográfico.

2.2.3 Preparação da amostra por DLLME

Uma alíquota de 10 mL da amostra de água (acidificada previamente usando 0,1 mol L⁻¹ de HCl a pH 4) foi colocada num tubo de centrífuga em vidro (12 mL) com fundo cônico. Cada amostra foi fortificada com 80 μ L do padrão interno (ZEN- d_6) a 25 μ g L⁻¹ para avaliar a rendimento da extração de ZEN e seus metabólitos. Em seguida, 100 μ L de bromociclohexano (solvente de extração) foi adicionado à solução da amostra. A mistura foi agitada vigorosamente utilizando um agitador de vórtice (Phoenix Luferco, São Paulo, Brasil) a 2500 rpm por 2 min. Microgotas foram formadas durante o processo de agitação, facilitando a transferência de massa dos analitos da amostra de água para o solvente extrator. A separação das duas fases ocorreu após centrifugação a 3500 rpm durante 10 min. A fase orgânica sedimentada foi retirada ao máximo e transferida para um insert de vidro de 300 μ L utilizando uma microseringa de HPLC (100 μ L) e seca por evaporação com nitrogênio gasoso. O resíduo foi então redissolvido em 80 μ L de MeOH:H₂O com 0,1% de ácido fórmico (50:50, v/v). Finalmente, 20 μ L do extrato filtrado foram injetados no sistema HPLC/FLD ou LC-ESI-MS/MS.

2.2.4 Instrumentação

Nas análises cromatográficas foram utilizados dois sistemas: cromatógrafo a líquido Varian 920-LC e Agilent 1200 LC. As colunas cromatográficas para os sistemas foram Gemini C₁₈ (150 mm x 4,6 mm d.i, 5 µm de diâmetro de partícula, Phenomenex, Torrance, CA, EUA) precedida da coluna de guarda (Phenomenex) C₁₈ (4,0 mm x 3,0 mm d.i).

Para a otimização da separação dos analitos e dos parâmetros da DLLME foi utilizado o cromatógrafo Varian 920-LC, equipado com bomba quaternária, injetor automático (capacidade de 200 posições para frascos de 2 mL para HPLC) e detector de fluorescência. A eluição foi realizada no modo isocrático usando água (solvente A), acetonitrila (solvente B) e metanol (solvente C) sob as seguintes condições: 48% de A, 25% B e 27% C durante 16 min. A temperatura da coluna foi de 40 °C, a vazão da fase móvel de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram de 271 nm e 452 nm, respectivamente. A aquisição de dados foi realizada usando o software Galaxie.

Um Agilent 1200 LC acoplado com um espectrômetro de massas híbrido QTRAP 3200 (LC-MS/MS) da Applied Biosystems/MDS Sciex Instruments com fonte de ionização por *eletrospray* (ESI) foi utilizado para os experimentos de validação do método analítico desenvolvido e determinação dos analitos nas amostras de água. Experimentos utilizando varredura linear completa (Full scan) e varredura de íons produtos foram realizados utilizando os seguintes parâmetros: tensão do capilar a -4 kV, gás nebulizador (nitrogênio) a 50 psi, temperatura da fonte de 600 °C. Os parâmetros MS-MS, incluindo o potencial de desagregação (DP), o potencial de entrada (EP), a energia de colisão (CE) e o potencial de saída da célula (CXP), foram otimizadas usando infusão direta dos padrões de cada composto, com concentração de 1 µg mL⁻¹ no modo de varredura completa e pela injeção diretamente no MS. O potencial de entrada foi fixada em -10 V. Separação cromatográfica das micotoxinas estrogênicas foi realizada a uma temperatura de 40 °C. A eluição foi realizada no modo isocrático usando ácido fórmico a 0,1% em água (solvente A), acetonitrila (solvente B) e metanol (solvente C) sob as seguintes condições: 48% de A, 25% B e 27% C durante 17 min. A vazão foi de 1,0 mL min⁻¹ e um volume de injeção de 20 µL. A aquisição de dados foi realizada usando o software Analyst 1.5 (Applied Biosystems).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Otimização do sistema cromatográfico HPLC/FLD

A otimização da separação cromatográfica dos analitos no sistema HPLC/FLD foi realizada inicialmente injetando separadamente cada um dos compostos, fazendo a identificação individual a partir do tempo de retenção para posterior injeção da mistura dos compostos.

Identificados os analitos, iniciaram-se os estudos para obter a melhor separação possível. Foram avaliadas diferentes possibilidades do modo de eluição gradiente e isocrático, sendo utilizados como solvente orgânico de eluição acetonitrila, metanol, ou ambos e solvente aquoso (água deionizada).

Inicialmente, um gradiente exploratório proposto por Snyder, Kirkland e Glajch (1997) foi realizado. Com o objetivo de investigar se a separação dos analitos pode ser preconizada utilizando uma eluição no modo gradiente ou isocrático, um teste inicial (corrida 1) foi realizado a partir de um gradiente linear de acetonitrila, variando de 5 a 100% em 40 minutos (Figura 5). O critério para a escolha de qual modo de eluição seria utilizado em uma etapa posterior foi:

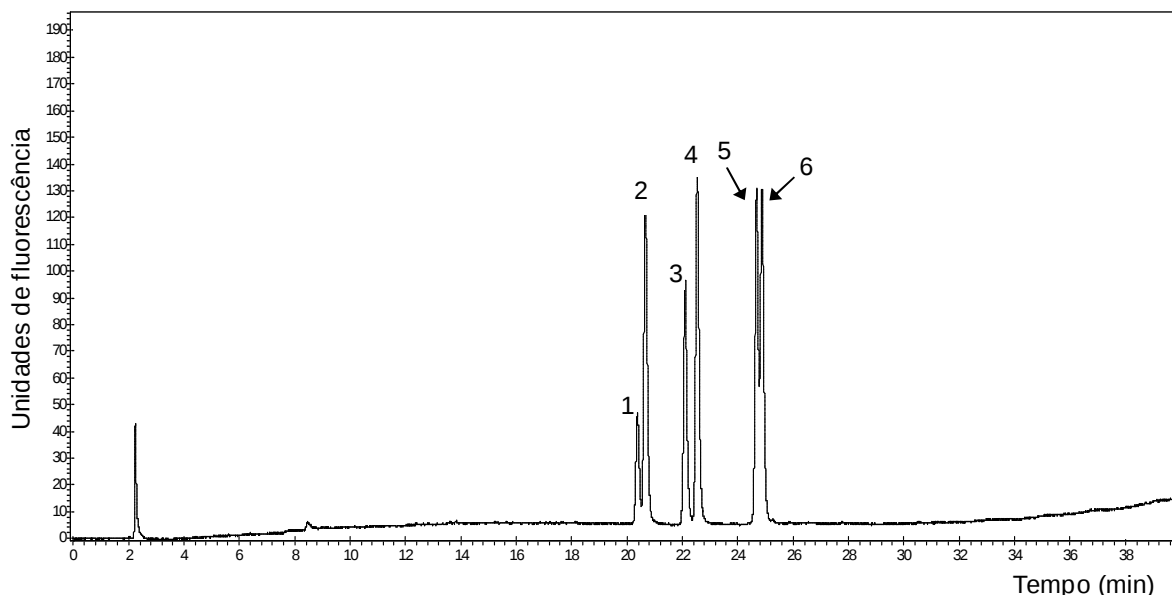
$$\frac{\Delta t}{t_G} > 0,25 \text{ (modo gradiente)} \qquad \frac{\Delta t}{t_G} < 0,25 \text{ (modo isocrático)} \qquad \text{Eq.: 1}$$

onde, Δt : diferença entre os tempos de retenção do último e primeiro pico para os analitos; t_G : tempo em que a composição do solvente varia (40 minutos).

Essa relação demonstra que se os picos dos analitos são eluídos em uma pequena faixa de variação nas concentrações do solvente de eluição, então o modo isocrático é recomendável. Se ocorrer eluição em uma ampla faixa de concentrações do solvente, o modo gradiente é mais prático. Na Figura 5, $\Delta t/t_G = 4,5/40 = 0,11 < 0,25$, no qual o tempo de retenção do primeiro pico (β -zearalanol) foi de 20,38 min e o último pico (zearalenona) foi de 24,88 min. Portanto, o modo isocrático é recomendado.

Na Figura 5, observa-se uma separação inadequada dos analitos com co-eluição parcial entre β -zearalanol (pico 1) e β -zearalenol (pico 2), assim como entre zearalanona (pico 5) e zearalenona (pico 6).

Figura 5 - Cromatograma (HPLC/FLD) do gradiente exploratório (corrida 1)



Fonte: o autor.

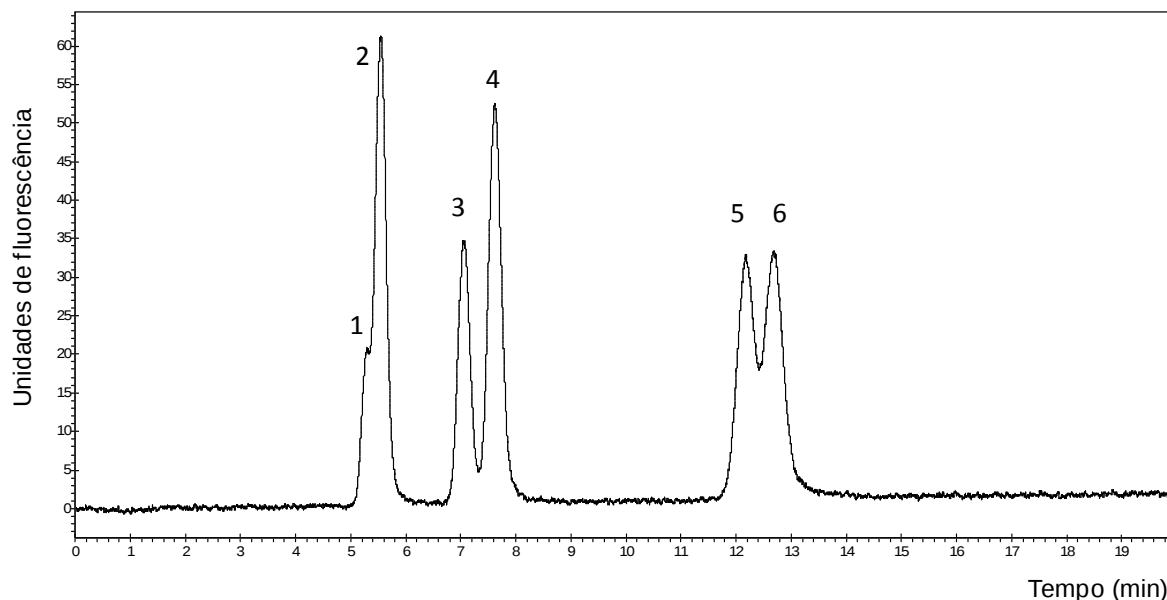
Nota: Condições cromatográficas: gradiente linear de 5% a 100% de ACN em 40 min, vazão 1 mL min⁻¹, temperatura da coluna 30 °C; volume de injeção: 20 µL. Comprimentos de onda de excitação e emissão de 271 nm e 452 nm, respectivamente. Picos: 1. β -zearalanol (30 µg mL⁻¹); 2. β -zearalenol (4 µg mL⁻¹); 3. α -zearalanol (12 µg mL⁻¹); 4. α -zearalenol (0,4 µg mL⁻¹); 5. Zearalanona (10 µg mL⁻¹); 6. Zearalenona (0,5 µg mL⁻¹).

Posteriormente, foram avaliadas outras condições em que Snyder, Kirkland e Glajch (1997) recomendam para análises subsequentes, utilizando a eluição isocrática com acetonitrila ou metanol com diferentes valores percentuais de concentração dos solventes de eluição. As corridas 2 e 3 basearam-se na porcentagem de 45% de acetonitrila e de 55 % de metanol no modo isocrático (Figuras 6 e 7).

Porém, essas análises não foram suficientes para obtenção de uma separação adequada das micotoxinas estrogênicas. Outras porcentagens de acetonitrila e de metanol foram também avaliadas, mas não foi obtida uma separação adequada dos analitos. Essas análises sugerem que essa separação não pode ser alcançada com fase móvel no modo isocrático a partir de ACN:H₂O e MeOH:H₂O. Entretanto, de acordo com os cromatogramas das Figuras 6 e 7, há uma melhor separação entre os pares dos picos 1 e 2, 3 e 4, 5 e 6, quando acetonitrila é substituída por metanol.

Isto sugere que alguma mistura de metanol e acetonitrila proverá uma melhor separação dos analitos.

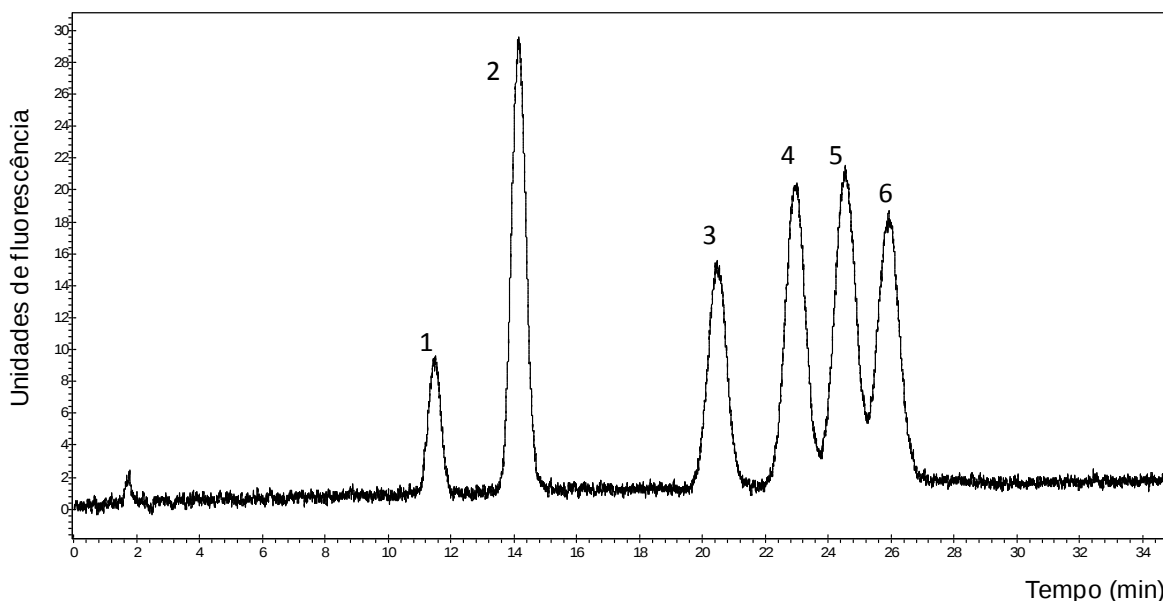
Figura 6 - Cromatograma da corrida 2



Fonte: o autor.

Nota: Condições cromatográficas: Fase Móvel - Acetonitrila (ACN): H₂O; Modo Isocrático 45% de ACN; vazão 1 mL min⁻¹; temperatura da coluna 30 °C; volume de injeção: 20 µL. Comprimentos de onda de excitação e emissão de 271 nm e 452 nm, respectivamente. Picos: 1. β-zearalanol (30 µg mL⁻¹); 2. β-zearalenol (4 µg mL⁻¹); 3. α-zearalanol (12 µg mL⁻¹); 4. α-zearalenol (0,4 µg mL⁻¹); 5. Zearalanona (10 µg mL⁻¹); 6. Zearalenona (0,5 µg mL⁻¹).

Figura 7 - Cromatograma da corrida 3



Fonte: o autor.

Nota: Condições cromatográficas: Fase Móvel - Metanol (MeOH): H₂O; Modo Isocrático 55% de MeOH; vazão 1 mL min⁻¹; temperatura da coluna 30 °C; volume de injeção: 20 µL. Comprimentos de onda de excitação e emissão de 271 nm e 452 nm, respectivamente. Picos: 1. β-zearalanol (30 µg

mL^{-1}); 2. β -zearalenol ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$); 3. α -zearalanol ($12 \mu\text{g mL}^{-1}$); 4. α -zearalenol ($0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$); 5. Zearalanona ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$); 6. Zearalenona ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$).

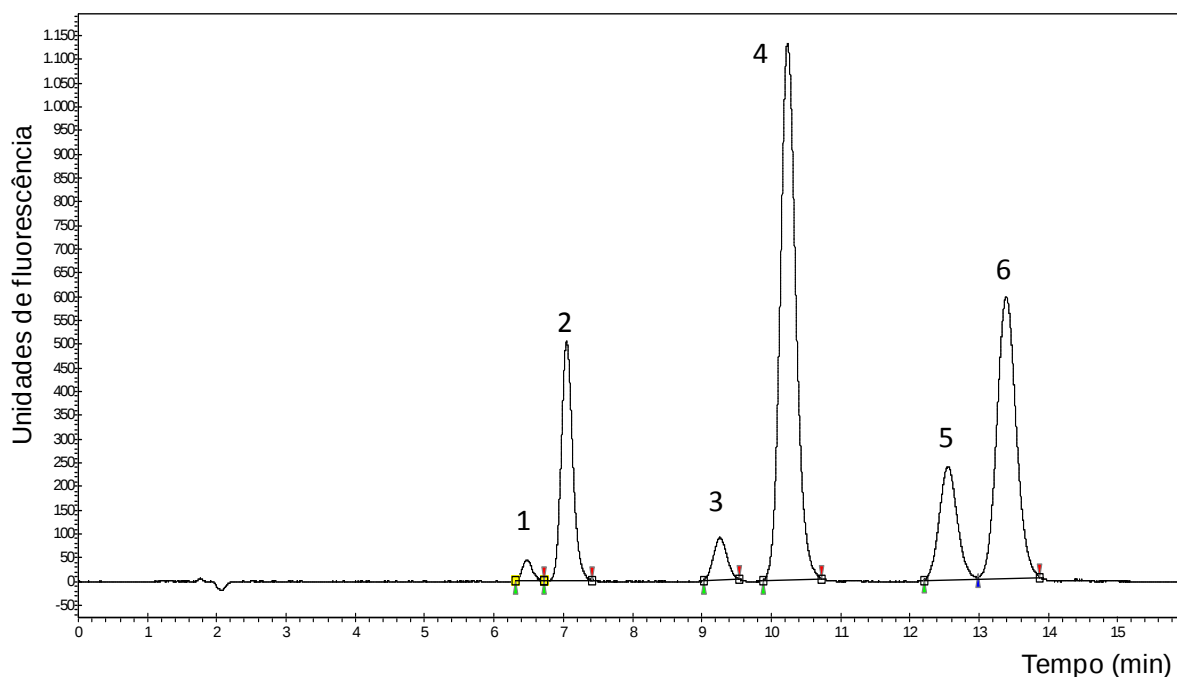
Ainda na busca de separações satisfatórias, foram testados sistemas ternários contendo ACN, metanol e água em diferentes proporções. A condição de eluição utilizando como fase móvel: (A) água – 48%, (B) acetonitrila – 25 %, (C) metanol – 27 % (Figura 8) apresentou uma melhor separação dos analitos.

A variação da temperatura da coluna foi avaliada nesse trabalho com o objetivo de melhorar a separação das bandas cromatográficas e aumentar a resolução (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). Três temperaturas foram avaliadas: 30, 35 e 40 °C, destas a temperatura de 40 °C apresentou picos mais simétricos e uma menor largura das bandas cromatográficas.

A seleção dos comprimentos de onda de excitação (271 nm) e emissão (452 nm) para a detecção por fluorescência foi baseada no trabalho desenvolvido por Urraca, Marazuela e Moreno-Bondi (2004).

A Figura 8 apresenta o cromatograma com a condição otimizada para separação dos micoestrógenos e a Tabela 5 contém os parâmetros cromatográficos calculados para essa condição final.

Figura 8 - Cromatograma final da separação dos analitos por HPLC/FLD



Fonte: o autor.

Nota: Condições cromatográficas: Fase Móvel - H₂O (48%), acetonitrila (25%), metanol (27%), vazão 1 mL min^{-1} , temperatura 40 °C, volume de injeção 20 μL . Comprimentos de onda de excitação e emissão de 271 nm e 452 nm, respectivamente. Picos: 1. β -zearalanol ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$); 2. β -zearalenol (4

$\mu\text{g mL}^{-1}$); 3. α -zearalanol ($12 \mu\text{g mL}^{-1}$); 4. α -zearalenol ($0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$); 5. Zearalanona ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$); 6. Zearalenona ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Tabela 5 - Parâmetros cromatográficos obtidos no desenvolvimento do método HPLC para os analitos

Analitos	Tempo de retenção (min)	Assimetria (As)	Fator de separação (α)	Número de pratos (N)	Resolução (R_s)
β -ZAL	6,48	1,11	-	10963	-
β -ZEL	7,05	1,18	1,09	8811	2,06
α -ZAL	9,26	1,10	1,31	11885	6,92
α -ZEL	10,24	1,16	1,11	10281	2,62
ZAN	12,56	1,08	1,23	11545	5,34
ZEN	13,40	1,09	1,07	11301	1,73

Fonte: o autor.

De acordo com os parâmetros cromatográficos da Tabela 5, pode-se observar que os valores de resolução foram superiores a 1,5, indicando aproximadamente 100% de separação entre os picos (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006; LANÇAS, 1993). Os valores de assimetria ficaram menores que 1,2. Esses valores indicam uma simetria adequada dos picos aumentando a precisão na análise quantitativa. Para o fator de separação (α), quanto maior o seu valor, mais seletiva será a fase líquida e, portanto, uma melhor separação será alcançada. O ideal é um valor de α maior que 1, sendo que os valores de α foram todos maiores que 1,07 (LANÇAS, 1993). Os valores do número de pratos (medida da eficiência da coluna cromatográfica) foram também adequados.

Como os parâmetros cromatográficos calculados para os picos foram todos satisfatórios, demonstrou-se que as condições cromatográficas são adequadas para a quantificação dos analitos. Vale ressaltar que esses parâmetros devem ser monitorados constantemente durante as análises a fim de obter resultados com maior confiança analítica. Na Tabela 6 estão as condições cromatográficas otimizadas para o método HPLC/FLD.

Tabela 6 - Condições cromatográficas otimizadas

Equipamento	Varian 920-LC
Condições cromatográficas	
Coluna	Gemini C18 (Phenomenex), 150 x 4,6 mm, 5 μ m
Fase Móvel (FM)	Água:acetonitrila:metanol (48:25:27, em volume)
Modo de eluição	Isocrático
Vazão	1,0 mL min ⁻¹
Temperatura do forno	40°C
Volume de injeção	20 μ L
Detector	Fluorescência
Comprimento de onda	(λ_{ex}) = 271nm; (λ_{em}) = 452 nm

Fonte: o autor.

2.3.2 Otimização dos parâmetros da DLLME para extração de micoestrógenos em amostras de água.

Após a otimização das condições cromatográficas para separação e detecção por HPLC/FLD, realizou-se um estudo inédito de desenvolvimento de método para extração das micotoxinas estrogênicas em amostras de água utilizando a técnica de DLLME. Dentre os parâmetros que geralmente influenciam o desempenho e eficiência da DLLME, destacam-se: tipo e o volume do solvente extrator e dispersor, a força iônica, o volume da amostra e pH. Estes parâmetros foram investigados e, em seguida, foram selecionadas as melhores condições de extração. As amostras foram fortificadas com os analitos com concentrações de 12 ng mL⁻¹ (α -ZEL e ZEN), 40 ng mL⁻¹ (β -ZEL e α -ZAL) e 80 ng mL⁻¹ (β -ZAL e ZAN). A recuperação absoluta (calculada como a razão entre a área do pico do analito nas amostras de água de rio por DLLME e a área do pico do analito na solução padrão nas mesmas concentrações) foi avaliada na escolha dos parâmetros investigados.

A investigação estatística dos parâmetros foi realizada utilizando o *Minitab software* (Release 16, Minitab Inc., State College, PA). Diferenças significativas entre as médias foram avaliadas pela análise de variância de fator único (*one-way ANOVA*) seguido pelo teste de *Tukey*, que realiza a avaliação de qual(is) variável(is) é(são) significativa(s) em relação às demais. Os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão (n=3) e considerados significativamente diferentes para $p < 0,05$.

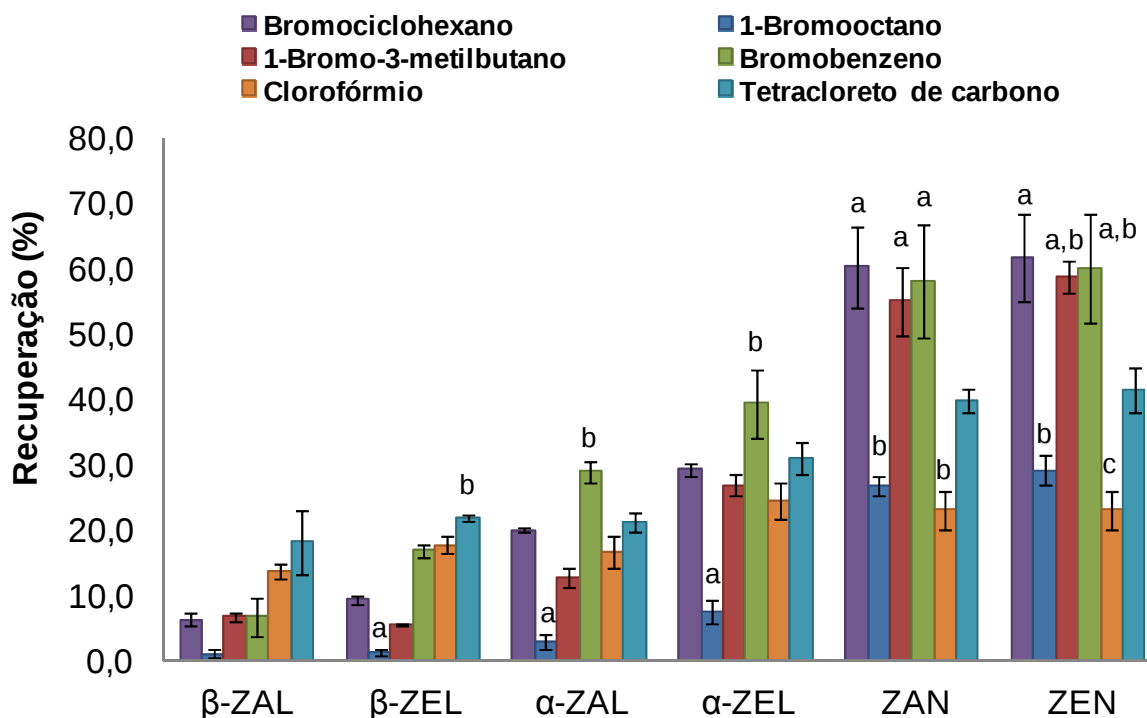
2.3.2.1 Seleção do solvente extrator

A escolha de um solvente de extração adequado é o parâmetro majoritário para a técnica de DLLME, a fim de alcançar uma boa recuperação, fator de enriquecimento e a seletividade dos analitos. O solvente de extração deve demonstrar (a) capacidade de extração dos compostos de interesse, (b) baixa solubilidade em água, no qual seja possível separá-lo da fase aquosa por centrifugação (c) baixa volatilidade durante o processo de extração (d) solubilização adequada no solvente dispersor. O solvente extrator preferencialmente deve ter massa específica maior que a água, de forma a permitir a formação da fase sedimentada e a coleta seja facilitada, embora aplicações descrevam a utilização de solventes extratores com massa específica menor que a água (REZAEI, YAMINI, FARAJI, 2010).

Os hidrocarbonetos halogenados como clorobenzeno, clorofórmio, tetracloreto de carbono e tetracloroetano são usualmente utilizados como solventes de extração na DLLME, por causa de sua alta densidade. Entretanto, esses solventes apresentam alta toxicidade, sendo que alguns estão inclusos na lista dos 126 poluentes prioritários da USEPA. Neste cenário, este estudo propõe o uso de bromosolventes, que apresentam características físico-químicas similares aos clorados, com menor toxicidade aguda e crônica (LEONG et al., 2010), dentre eles, o bromociclohexano (massa específica: $1,324 \text{ g mL}^{-1}$), 1-bromooctano (massa específica: $1,118 \text{ g mL}^{-1}$), bromobenzeno (massa específica: $1,491 \text{ g mL}^{-1}$) e 1-bromo-3-metilbutano (massa específica: $1,261 \text{ g mL}^{-1}$). Como pode ser visto na Figura 9, entre os bromosolventes, o bromociclohexano e o bromobenzeno apresentaram uma maior eficiência de extração dos analitos, seguido por 1-bromo-3-metilbutano e 1-bromooctano. Este comportamento pode ser parcialmente explicado devido à estrutura cíclica e/ou grupo aromático dos solventes, os quais beneficiam a extração (semelhante dissolve semelhante) dos analitos (CHEN; CHEN; LI, 2010; GUO; LEE, 2012). As micotoxinas estrogênicas contêm uma estrutura cíclica e um grupo aromático em suas estruturas moleculares. Os bromosolventes (Figura 9) apresentaram eficiência de extração comparável e por vezes melhor em relação aos solventes clorados avaliados (clorofórmio e tetracloreto de carbono), destacando-se a diferença estatística significativa para bromociclohexano, bromobenzeno e 1-bromo-3-metilbutano em relação ao clorofórmio para os analitos ZAN e ZEN. O

bromociclohexano foi selecionado como o solvente de extração, por ter menor toxicidade em relação ao bromobenzeno (LEONG et al., 2010).

Figura 9 - Efeito do solvente de extração



Fonte: o autor.

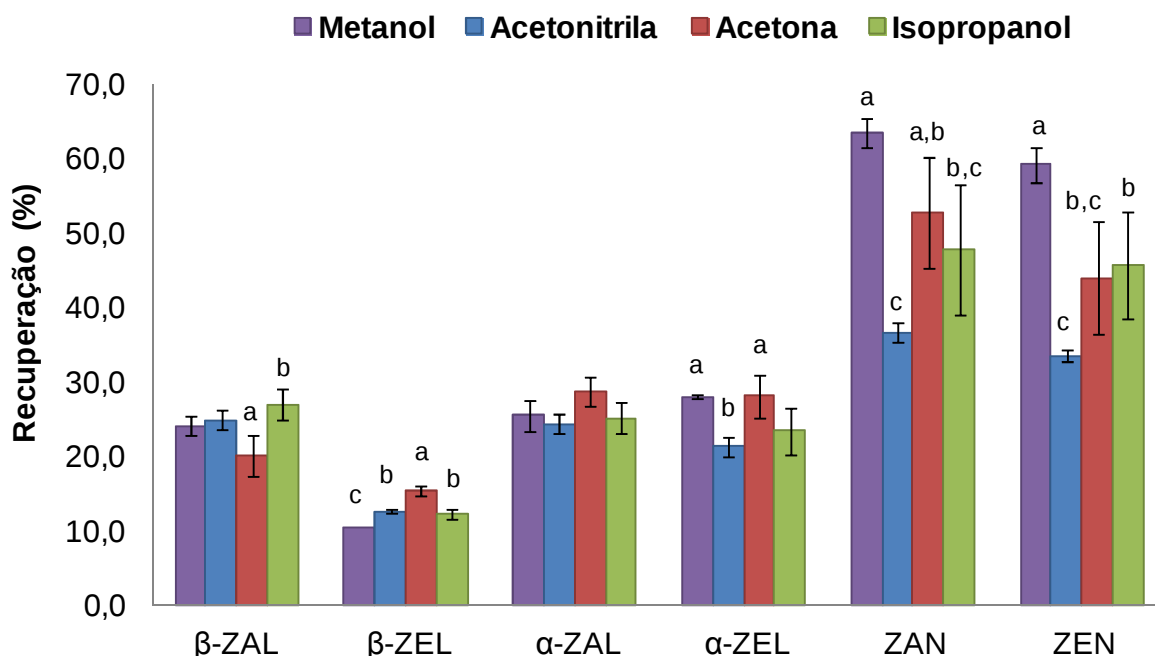
Nota: Condições: volume da amostra, 5 mL; pH, 4; volume do solvente de extração, 80 µL; volume do solvente dispersor (metanol), 0,5 mL; tempo de extração, 1 min. Variáveis que não compartilham a mesma letra (a, b, c) denotam diferenças estatisticamente significativas ao nível de 95% de confiança (teste de Tukey).

2.3.2.2 Seleção do solvente dispersor

Para a escolha do solvente dispersor, a principal característica a ser considerada é a sua miscibilidade na fase orgânica (solvente extrator) e na fase aquosa (amostra). Desse modo, alguns solventes dispersores são usualmente selecionados para a DLLME e foram estudados para esse trabalho como: metanol, acetona, acetonitrila e isopropanol. O efeito destes solventes sobre a eficiência de extração na DLLME foi investigado utilizando 500 µL de cada solvente contendo 80 µL do solvente extrator previamente selecionado (bromociclohexano). Como pode ser visto na Figura 10, o metanol apresentou melhores resultados de recuperação para a maioria dos compostos, atribuído ao efeito sinérgico de boa compatibilidade

desse solvente com a fase aquosa e a baixa razão de distribuição dos analitos na mistura metanol e água (SUN; CHI; CHEN, 2011).

Figura 10 - Efeito do solvente dispersor



Fonte: o autor.

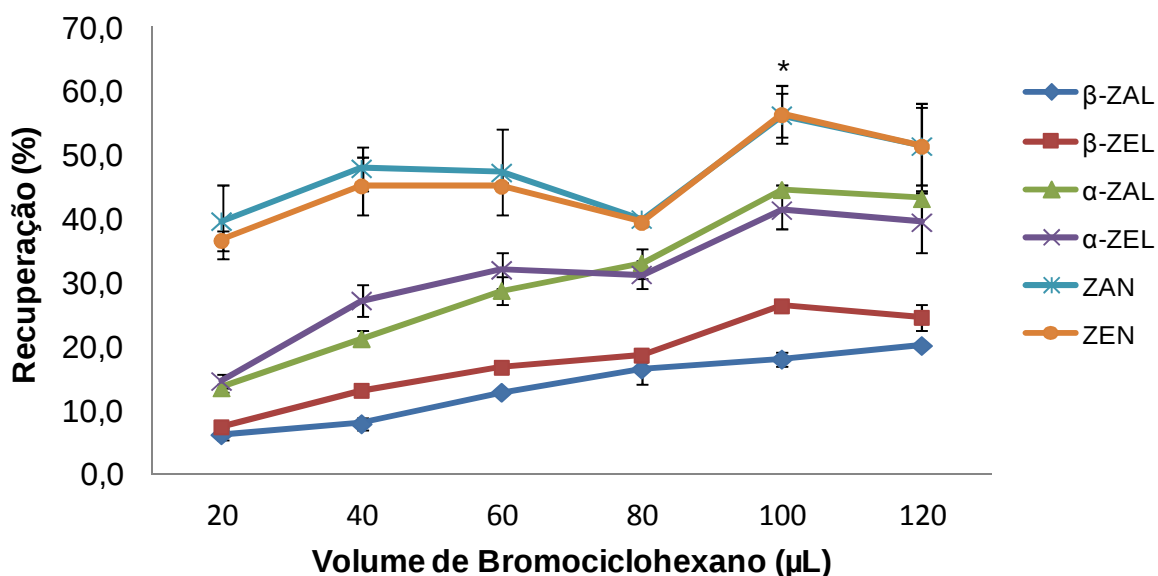
Nota: Condições: volume da amostra, 5 mL; pH, 4; volume do solvente extrator (bromociclohexano), 80 µL; volume do solvente dispersor 0,5 mL; tempo de extração, 1 min. Variáveis que não compartilham a mesma letra (a, b, c) denotam diferenças estatisticamente significativas ao nível de 95% de confiança (teste de Tukey).

2.3.2.3 Efeito do volume de solvente extrator

Para a escolha do volume do solvente extrator, foram realizados experimentos contendo diferentes volumes do bromociclohexano, variando entre 20 e 120 µL, com intervalos de 20 µL. De acordo com a Figura 11, para a maioria dos analitos o volume de 100 µL apresentou maior eficiência na extração. Este comportamento de quanto maior volume maior recuperação dos analitos pode ser explicado pelo aumento do volume de particionamento do solvente extrator no solvente dispersor com aumento do volume do bromociclohexano, conduzindo ao aumento da eficiência de extração (MELWANKI; FUH, 2008). Acima de 100 µL ocorre um decréscimo da eficiência para a maioria dos analitos, provavelmente devido à diminuição da razão do volume entre o solvente dispersor e extrator. A proporção diminuída reduz a quantidade de formação das gotículas de emulsão disponíveis

para a extração, reduzindo assim a eficiência da extração (CALDAS et al., 2010). Aplicando o teste de Tukey verificou-se que o volume de 100 μL apresentou diferença estatística em relação aos outros volumes para a maioria dos analitos.

Figura 11 - Efeito do volume de solvente extrator



Fonte: o autor.

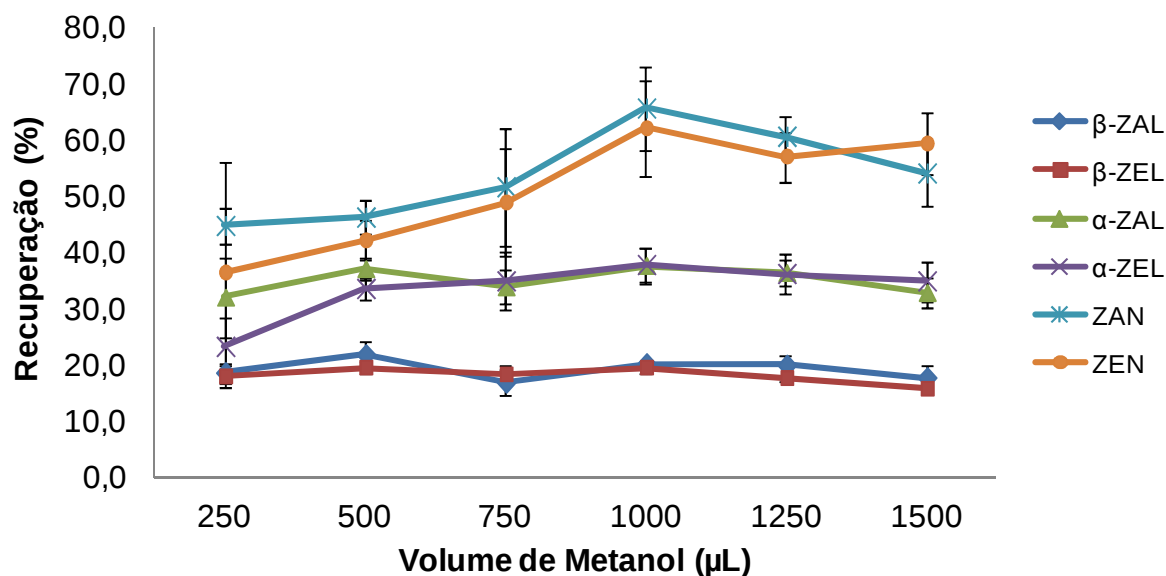
Nota: Condições: volume da amostra, 5 mL; pH, 4; solvente extrator (bromociclohexano); volume do solvente dispersor (metanol), 0,5 mL; tempo de extração, 1 min. O símbolo (*) denota diferença estatisticamente significativa ao nível de 95% de confiança (teste de Tukey).

2.3.2.4 Efeito do volume de solvente dispersor

O volume do solvente dispersor afeta diretamente a formação da solução turva (água / solvente dispersor / solvente extrator), o grau de dispersão do solvente de extração na fase aquosa e, subsequentemente, a eficiência da extração. A variação do volume do solvente dispersor pode mudar o volume da fase sedimentada (REZAEE; YAMINI; FARAJI, 2010). Para avaliar o efeito do volume do solvente dispersor na extração, foram realizados experimentos com diferentes volumes de metanol, variando entre 250 e 1500 μL , com intervalos de 250 μL . Os resultados são apresentados na Figura 12, onde pode ser verificado que o aumento do volume de metanol de 250 a 1000 μL resulta em aumento da eficiência de extração para a maioria dos analitos, porém acima de 1000 μL ocorre uma diminuição da eficiência de extração. Este comportamento está relacionado, provavelmente, ao esperado aumento da solubilidade do solvente extrator na fase aquosa (matriz) com o

aumento do volume de metanol (LEONG; HUANG, 2008). Desse modo, o volume de 1000 μL foi selecionado para o experimento subsequente. A comparação foi realizada através do teste da ANOVA a um nível de 95% de confiança e verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os volumes.

Figura 12 - Efeito do volume de solvente dispersor



Fonte: o autor.

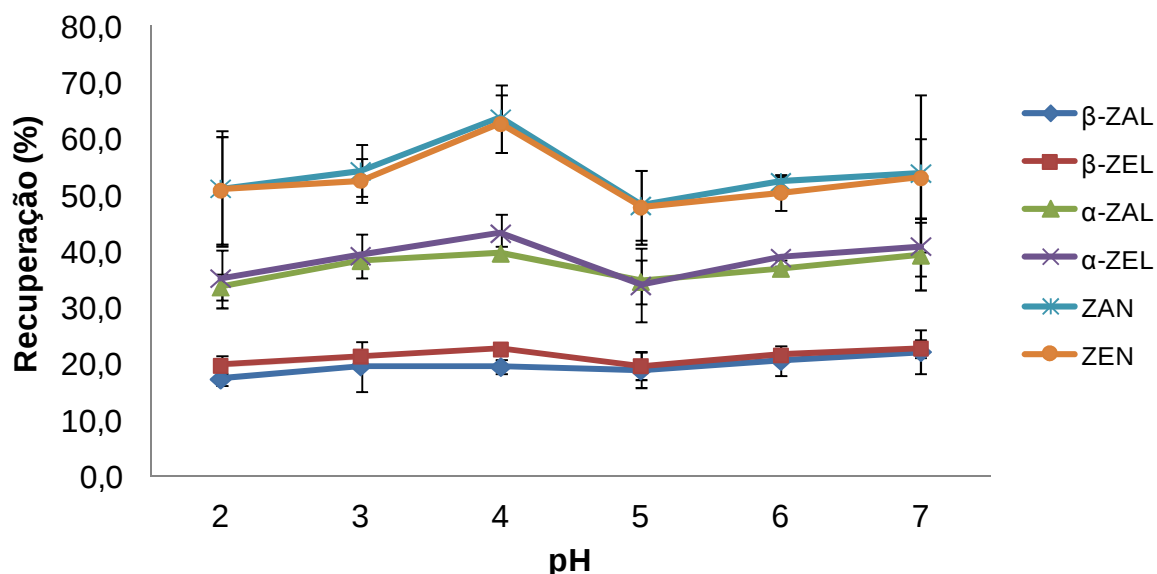
Nota: Condições: volume da amostra, 5 mL; pH, 4; volume do solvente extrator (bromociclohexano), 100 μL ; solvente dispersor, metanol; tempo de extração, 1 min. O símbolo (*) denota diferença estatisticamente significativa ao nível de 95% de confiança (teste de Tukey).

2.3.2.5 Efeito do pH

O efeito do pH na DLLME tem um papel importante em função da acidez ou basicidade dos compostos. Os analitos podem ser extraídos pelo solvente extrator quando eles estão na forma não ionizada. A influência do pH na extração foi investigada pela variação entre pH 2 e 7 pela adição de uma solução de HCl 0,1 mol L^{-1} . A Figura 13 ilustra a influência do pH na extração por DLLME. A eficiência da extração foi aumentada quando o pH variou de 2 a 4, e, em seguida, ocorreu uma pequena diminuição quando o pH foi aumentado para 7. Isso provavelmente é explicado pelos seus valores de pK_a , a ZEN apresenta pK_a de 7,6, o qual indica que em um valor de pH 3 se encontra na forma não ionizada, a um pH 7 o ânion fenólico está presente na fase aquosa e com pH 9 a ZEN se encontra praticamente na forma aniônica (GAJECKA et al., 2011). Desse modo, em meio ácido a ionização é

suprimida, o que leva a uma melhor extração dos micoestrógenos pelo solvente extrator (ZHANG; LEE, 2012). Para a maioria dos analitos, o pH 4 apresentou melhor resultado, sendo este selecionado para a extração. Todos os valores de pH não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) pela ANOVA.

Figura 13 - Efeito do pH.



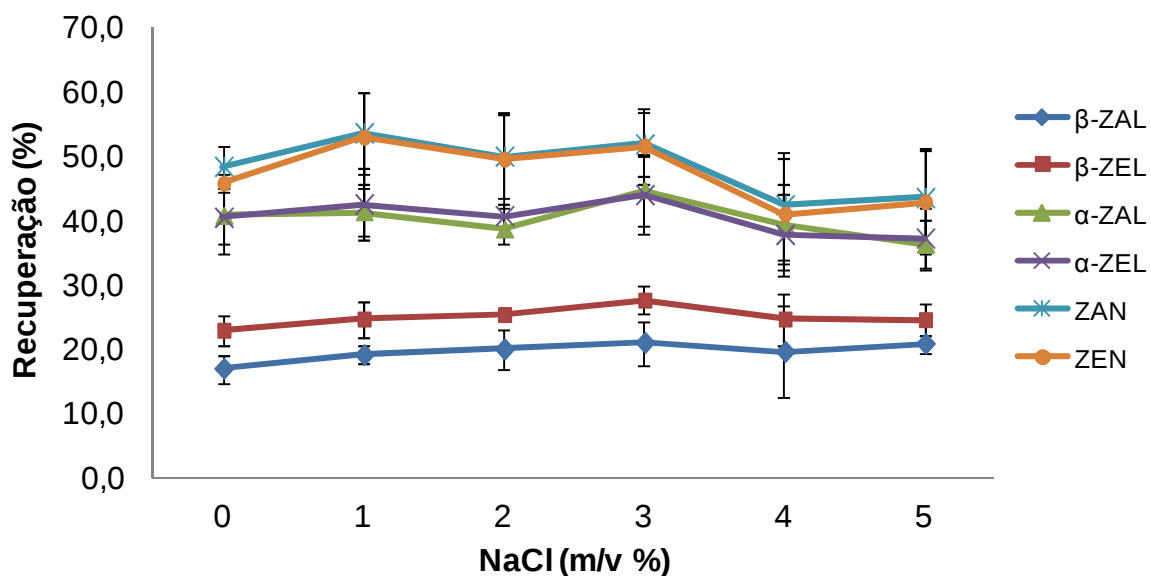
Fonte: o autor.

Nota: Condições: volume da amostra, 5 mL; volume do solvente extrator (bromociclohexano), 100 µL; volume do solvente dispersor (metanol), 1 mL; tempo de extração, 1 min.

2.3.2.6 Efeito da força iônica

Geralmente, o aumento da força iônica de uma solução diminui a solubilidade do analito e aumenta a eficiência da extração (efeito *salting-out*) (HADJMOHAMMADI; GHOREISHI, 2011). Para avaliar a possibilidade do efeito *salting-out*, na eficiência da extração foram realizados experimentos com adição de cloreto de sódio para concentrações na faixa de 0-5% (m/v). De acordo com a Figura 14, na faixa avaliada não houve diferença significativa (ANOVA, $p > 0,05$) na recuperação de extração dos analitos. Portanto, os experimentos subsequentes foram realizados sem a adição de sal à amostra.

Figura 14 - Efeito da força iônica.



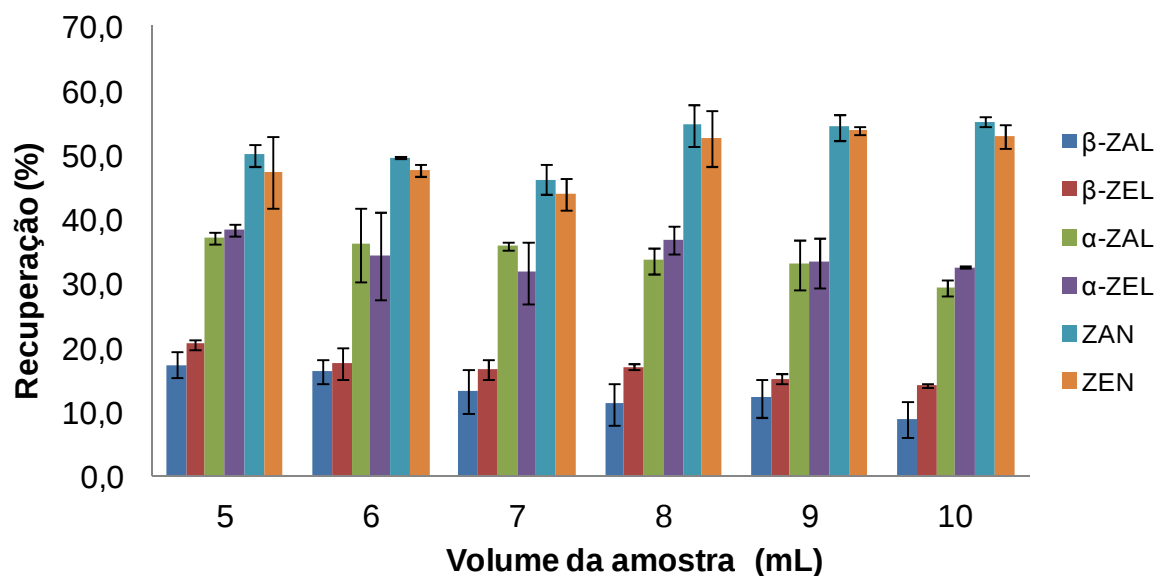
Fonte: o autor.

Nota: Condições: volume da amostra, 5 mL; pH, 4; volume do solvente extrator (bromociclohexano), 100 µL; volume do solvente dispersor (metanol), 1 mL; tempo de extração, 1 min.

2.3.2.7 Efeito do volume da amostra

O volume da amostra aquosa é um importante parâmetro que pode influenciar a eficiência da extração por DLLME (LI et al., 2011). Para avaliar esse efeito, foram testados diferentes volumes de água (5, 6, 7, 8, 9 e 10 mL). Volumes maiores não foram utilizados pela limitação do volume do tubo da centrífuga. Entre os volumes avaliados (Figura 15), a eficiência de extração não apresentou diferença estatística significativa, avaliada pela ANOVA ($p > 0,05$) para todos os analitos. Então, o volume de 10 mL foi selecionado, pois um maior volume de amostra acarretaria em maior fator de enriquecimento e menores limites de detecção podem ser obtidos.

Figura 15 - Efeito do volume da amostra



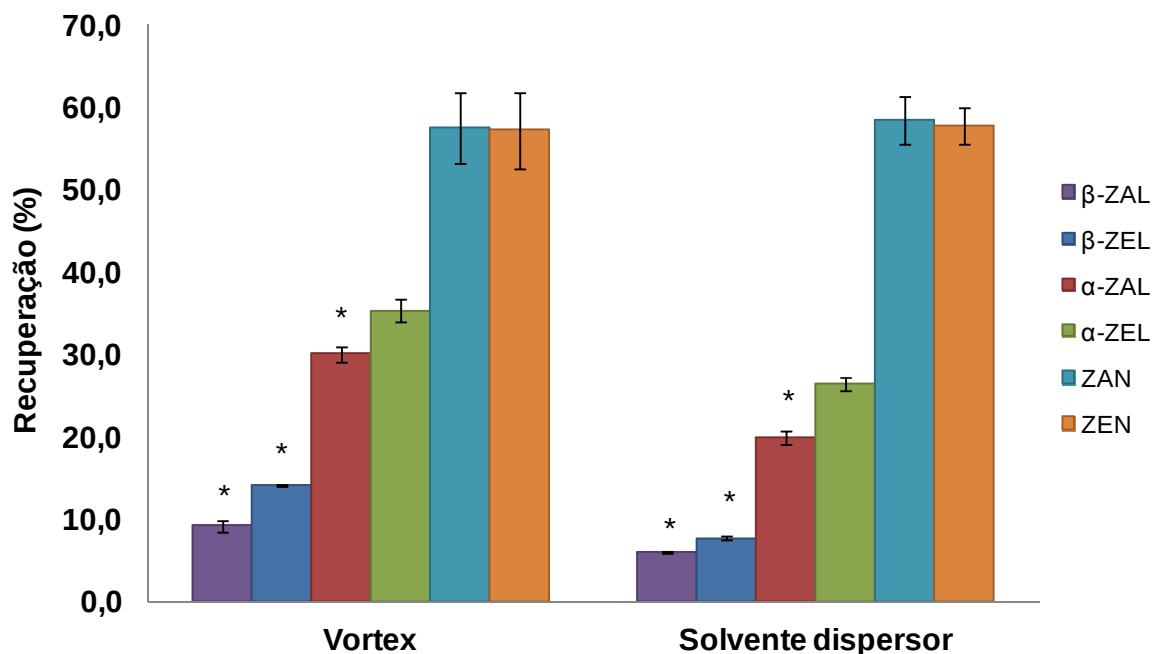
Fonte: o autor.

Nota: Condições: pH, 4; volume do solvente extrator (bromociclohexano), 100 µL; volume do solvente dispersor (metanol), 1 mL; tempo de extração, 1 min.

2.3.2.8 Efeito da agitação por vórtice

Em 2010, Yiantzi et al. desenvolveram a microextração líquido-líquido assistido por vórtice (VALLME) para a análise de alquilfenóis. O agitador tipo vórtice foi configurado a uma velocidade de 2500 rpm por 2 min para o tempo de extração. Durante a agitação microgotas são formadas, facilitando a transferência de massa dos analitos da fase aquosa (20 mL) para o solvente extrator (1-octanol). Após centrifugação a fase orgânica foi coletada por uma microseringa. Na DLLME convencional o uso de um solvente dispersor pode diminuir o coeficiente de partição dos analitos em relação ao solvente extrator (ZHANG; LEE, 2012). Nesse sentido, realizou-se uma comparação das variáveis otimizadas até então na extração por DLLME, com a utilização da agitação por vórtice (VALLME). A mistura (amostra + 100 µL de bromociclohexano) foi vigorosamente agitada a uma velocidade de 2500 rpm por 2 min. Posteriormente a amostra foi centrifugada a 3500 rpm por 10 min. De acordo com a Figura 16, a extração utilizando o vórtice, demonstrou ser equivalente ou superior na eficiência de extração dos analitos (β-ZAL, β-ZEL e α-ZAL) com efeito significativo (teste t pareado, $p < 0,05$), confirmando a hipótese descrita inicialmente.

Figura 16 - Efeito da comparação entre VALLME e DLLME



Fonte: o autor.

Nota: Condições: (1) VALLME: volume da amostra, 10 mL; pH, 4; volume do solvente extrator (bromociclohexano), 100 µL. (2) DLLME: volume da amostra, 10 mL; pH, 4; volume do solvente extrator (bromociclohexano), 100 µL; volume do solvente dispersor (metanol), 1 mL; tempo de extração, 1 min. O símbolo (*) denota diferença estatisticamente significativa ao nível de 95% de confiança (teste t pareado).

2.3.3 Otimização das condições cromatográficas por LC-MS/MS

Com o objetivo de obter melhor detectabilidade das micotoxinas estrogênicas, uma vez que os analitos devem ser encontrados em níveis de ng L^{-1} nas amostras de água, utilizou-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). A composição da fase móvel foi a mesma estabelecida na análise por fluorescência, acrescida da etapa de acidificação com ácido fórmico (0,1%) ao solvente aquoso.

Embora a protonação e a desprotonação de uma substância sejam processos que ocorrem simultaneamente dentro do capilar, a extensão das mesmas depende dentre outros parâmetros da estrutura da substância e do solvente. Substâncias que apresentam grupamentos básicos, principalmente aminas, amidas e ésteres, normalmente são analisadas no modo positivo, dada a relativa facilidade com que as mesmas são protonadas. Por outro lado, substâncias contendo funções ácidas, tais como ácidos carboxílicos e fenóis, são mais facilmente desprotonadas e, conseqüentemente, são analisadas no modo negativo (CROTTI et al., 2006).

As micotoxinas estrogênicas foram detectados utilizando o modo negativo para a ESI e os dados foram adquiridos utilizando o modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM). A aquisição de dados foi dividida em três segmentos de tempo de retenção: segmento 1: β -ZAL e β -ZEL; segmento 2: α -ZAL e α -ZEL; e do segmento 3: ZAN, ZEN- d_6 e ZEN. A seleção das transições do MRM e os parâmetros de aquisição associados foram avaliados para as melhores respostas sob as condições do modo negativo ESI através da infusão direta de soluções-padrão para o espectrômetro de massas sequencial. Os espectros de massas foram registrados a partir da varredura linear completa para selecionar o valor mais abundante da relação m/z . Para cada analito, o íon molecular desprotonado $[M-H]^-$ foi determinado e selecionado como o íon precursor. Em seguida, diferentes energias de colisão foram avaliadas para identificar o íon produto mais abundante. Duas transições foram medidas para as micotoxinas estrogênicas. A primeira transição do monitoramento de reações seletivas (SRM) (mais abundante) foi usada para quantificação, enquanto a segunda foi usada para confirmação da identidade do analito (ARROYO-MANZANARES; GARCÍA-CAMPAÑA; GÁMIZ-GRACIA, 2013).

Na Tabela 7 são apresentados os parâmetros otimizados do modo MS/MS, destacando-se: tempo de leitura (Dwell time – milissegundos), energia de colisão (CE, do inglês “collision energy”), o potencial de desagregação (DP, do inglês “declustering potential”), o potencial de entrada (EP, do inglês “entrance potential”) o potencial de entrada da cela de colisão (CEP, do inglês “collision cell entrance potential”), o potencial de saída da cela de colisão (CXP, do inglês “collision cell exit potential”).

Tabela 7 - Parâmetros otimizados para determinação dos micotoxígenos por LC-ESI-MS/MS-QTRAP no modo de ionização negativo por ESI, usando o modo de aquisição SRM

Analitos	Tempo de retenção (min)	Tempo de leitura (ms)	Íon precursor [M-H] ⁻ (m/z)	Íon produto (m/z)	DP (eV)	EP (eV)	CEP (eV)	CE (eV)	CXP (eV)
β-ZAL	7,03	150	321	277*	-60	-4	-26	-40	-4
				303	-60	-4	-26	-42	-4
β-ZEL	7,68	150	319	160	-60	-9,5	-24	-38	-2
				130*	-60	-9,5	-24	-48	-2
α-ZAL	10,28	150	321	277*	-65	-4	-26	-36	-4
				303	-65	-4	-26	-36	-4
α-ZEL	11,35	150	319	130	-65	-3,5	-36	-48	-4
				275*	-65	-3,5	-36	-38	-2
ZAN	13,91	150	319	275*	-65	-3,5	-28	-34	-4
				205	-65	-3,5	-28	-36	-4
ZEN-d ₆	14,59	150	317	131*	-55	-9,5	-28	-38	-2
				175	-55	-9,5	-28	-26	-2
ZEN	14,83	150	323	131*	-65	-4	-20	-42	-2
				175	-65	-4	-20	-28	-2

*Transições de maior intensidade e utilizadas para quantificação

Fonte: o autor.

2.3.4 Efeito matriz

A presença de alguns compostos na matriz pode afetar a ionização dos analitos quando se utiliza a LC-MS/MS e, em particular, as fontes de ionização ESI. Para avaliar o efeito matriz, nove concentrações dos analitos (8, 20, 40, 80, 200, 400, 600, 800 e 1.200 ng L⁻¹) foram analisadas com solvente orgânico (acetonitrila) e matriz aquosa (água de rio). Soluções de calibração para a matriz foram preparadas pela adição de volumes conhecidos das soluções de trabalho dos analitos, submetido à secura sob uma corrente suave de N₂ gasoso e, finalmente, adição de um volume conhecido dos extratos de água de rio. A comparação das curvas analíticas na matriz e solvente foi realizada por meio das razões dos coeficientes angulares para as duas curvas analíticas. As razões foram 1,01, 1,05, 1,00, 1,02, 1,00 e 1,13 para β-ZAL, β-ZEL, α-ZAL, α-ZEL, ZAN e ZEN, respectivamente. De acordo com Frenich et al. (2011), os efeitos de supressão ou aumento de sinal são toleráveis para valores entre 0,8 e 1,2. Os valores fora desta faixa indicam um efeito de matriz forte. Assim, conclui-se que houve uma baixa interferência da matriz para as seis micotoxinas avaliadas.

2.3.5 Validação do método

O método DLLME foi avaliado de acordo com a faixa linear, precisão, recuperação, limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ), nas condições otimizadas. Para fins de calibração, foram preparados nove níveis de calibração para cada composto (variando de 8 a 1200 ng L⁻¹). Os padrões analíticos foram preparados seguindo o procedimento descrito anteriormente para as amostras fortificadas e extraídas de acordo com o procedimento desenvolvido. As curvas analíticas foram plotadas por meio das concentrações de cada substância na matriz equivalente *versus* a razão das áreas do pico cromatográfico do analito e do padrão interno (zearalenona-d₆ a 200 ng L⁻¹). A linearidade foi estudada por meio da verificação da homoscedasticidade utilizando o teste de *Bartlett*. Teste da falta de ajuste do modelo e o teste de *Mandel* foram realizados para verificar a qualidade do ajuste e a linearidade (BRÜGGEMANN; QUAPP; WENNRICH, 2006; FUNK; DAMMANN; DONNEVERT, 1995). Todos os testes estatísticos foram realizados ao nível de significância de 95%. Ao aplicar o teste de *Bartlett*, os valores de significância (p) obtidos no nível de confiança de 95% foram observados serem maiores que 0,05 (Tabela 8). A partir dos resultados do teste de Mandel, todos os valores calculados de F (F_{calc}) encontrados no nível de confiança de 95% eram menores que aos valores tabelados (F_{tab}). Este resultado mostrou que o modelo quadrático não fornece um ajuste significativamente melhor que o modelo linear. Para o teste de falta de ajuste, valores do nível de significância (p) superiores a 0,05 foram obtidos para todos os analitos, o que indica que o modelo de regressão linear proporciona uma boa interpolação dos dados experimentais (Tabela 8).

Tabela 8 - Linearidade, coeficiente de correlação (r), valores de significância (p) para homoscedasticidade, teste para falta de ajuste e teste de Mandel obtidos para cada micotoxina

Analitos	Faixa linear (ng L ⁻¹)	r	Homoscedasticidade p ^a	Falta de ajuste p ^a	Teste de Mandel ^b	
β-ZAL	40–1200	0,994	0,285	0,716	F _{tab(1,4)95%} =7,71	F _{cal} =0,38
β-ZEL	20–600	0,998	0,298	0,561	F _{tab(1,3)95%} =10,13	F _{cal} =2,75
α-ZAL	20–600	0,999	0,462	0,449	F _{tab(1,3)95%} =10,13	F _{cal} =5,13
α-ZEL	20–1200	0,997	0,280	0,510	F _{tab(1,5)95%} =6,61	F _{cal} =4,77
ZAN	8–600	0,998	0,130	0,910	F _{tab(1,4)95%} =7,71	F _{cal} =3,94
ZEN	8–400	0,999	0,292	0,333	F _{tab(1,3)95%} =10,13	F _{cal} =6,68

^a Nível de significância de 5%.

^b F_{tab}: valor tabelado de “F” da distribuição de Fisher/Snedecor; F_{cal}: calculated F values.

Fonte: o autor.

Os limites de detecção do método foram calculados como a concentração mínima do analito que resulta em um sinal cromatográfico três vezes maior do que o ruído do sistema. O limite de quantificação foi avaliado como a menor concentração do analito que resulta em um sinal cromatográfico dez vezes maior do que o ruído do sistema (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 1997). O LOD e LOQ variaram entre 4 e 20 ng L⁻¹ e de 8 a 40 ng L⁻¹, respectivamente, para todos os analitos. A precisão foi calculada em termos de repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi calculada pelo desvio padrão relativo (RSD) com dez repetições (N=10) a três níveis de concentrações (80, 400 e 800 ng L⁻¹) para cada analito. A precisão intermediária foi avaliada em três dias diferentes nos mesmos níveis de concentração do teste de repetibilidade. A repetibilidade variou de 3 a 12%, e a precisão intermediária variou de 2 a 12%. As recuperações relativas foram calculadas usando as amostras de água de rio isenta dos analitos e com adição de cada composto em três níveis diferentes de concentração (80, 400 e 800 ng L⁻¹) com cinco repetições. As recuperações médias para todos os analitos variaram de 81 a 118%, indicando que o método proposto é suficientemente exato para a determinação das concentrações dos analitos nas amostras de água. A Tabela 9 mostra os parâmetros analíticos obtidos.

Tabela 9 - Validação analítica do método proposto

Analito	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)	Precisão (RSD %)						Recuperação relativa (%) ^a		
			Repetibilidade (n=10)			Precisão intermediária (n=12)			(n=5)		
			C1	C2	C3	C1	C2	C3			
β-ZAL	20	40	10	7	6	12	9	12	117	118	118
β-ZEL	20	40	9	6	5	12	7	8	92	101	101
α-ZAL	8	20	9	8	7	9	7	8	81	97	100
α-ZEL	8	20	12	6	7	8	6	5	87	97	99
ZAN	4	8	4	4	7	4	4	3	91	98	98
ZEN	4	8	9	3	3	9	3	2	97	99	100

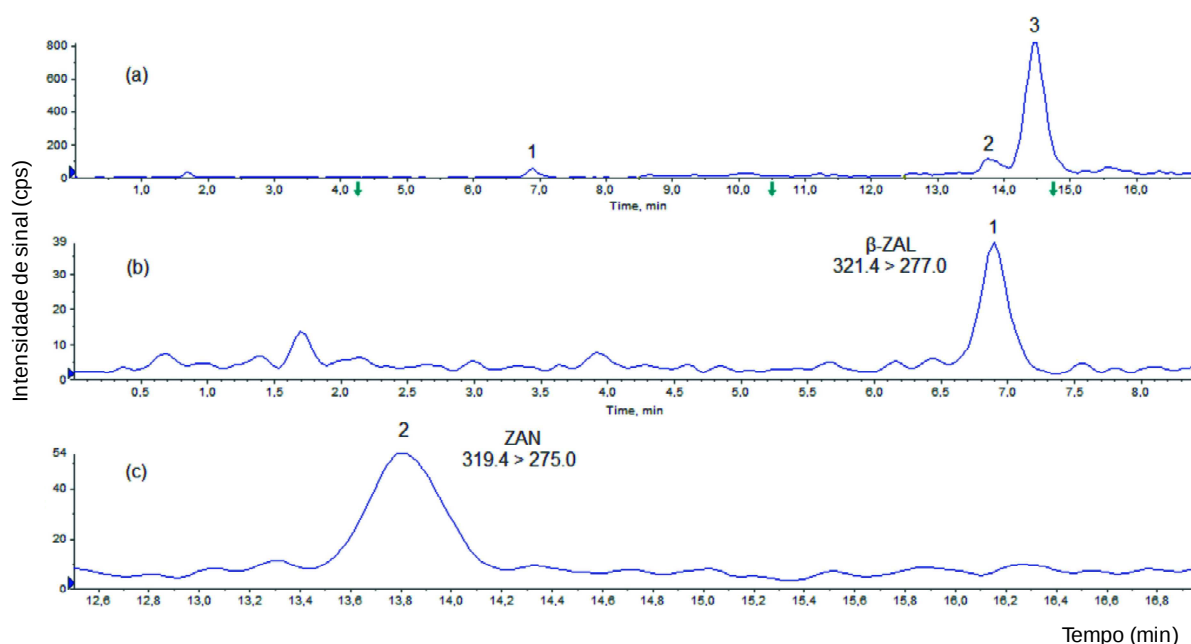
^a Definido como a razão entre a área do pico do analito nas amostras de água de rio e a área do pico do analito em água ultrapura fortificada com os analitos nas mesmas concentrações
C1: 80 ng L⁻¹; C2: 400 ng L⁻¹; C3: 800 ng L⁻¹;

Fonte: o autor.

2.3.6 Aplicação do método DLLME e LC-MS/MS em águas naturais

Para demonstrar a viabilidade e aplicabilidade do método proposto por DLLME e LC-MS/MS foram analisadas três amostras de água doce. Estas amostras foram obtidas a partir da sub-bacia do Córrego Rico, que está localizado nas cidades de Monte Alto e Jaboticabal no estado de São Paulo, Brasil. As amostras de água foram coletadas a partir de três locais: P1 - perto da nascente do Córrego Rico (21°18'38.02 "S 48°27'38.70" O); P2 - sob a influência de plantações de milho e do escoamento de instalações pecuárias ou campos agrícolas que receberam aplicações de esterco animal (21°18'46.30 "S 48°26'56.58" O); P3 – captação de água para o abastecimento público de Jaboticabal (21°18'35.10 "S 48°19'26.69" O). Os resultados da análise indicaram a presença de dois metabólitos da ZEN (β -ZAL e ZAN) no ponto de amostragem P3, que estavam presentes em concentrações de 168 ng L⁻¹ para β -ZAL e 17 ng L⁻¹ para ZAN. Este ponto de amostragem sofre influência de fontes rurais e urbanas (ETE). O cromatograma da amostra do ponto P3 é mostrado na Figura 17.

Figura 17 - Cromatograma da amostra de água do rio (P3) contendo 168 ng L⁻¹ de β -ZAL e 17 ng L⁻¹ de ZAN. Cromatograma de íons totais (a). Cromatograma de íons selecionados para β -ZAL (b) e ZAN (c). 1- β -ZAL, (2) ZAN, e (3) ZEN-d₆



Fonte: o autor.

As concentrações de β -ZAL neste estudo foram maiores (duas ordens de magnitude) do que as relatadas por Lagana et al (2004) para efluentes (até 5 ng L⁻¹), afluente de ETE (até 8 ng L⁻¹) e água de rio (até 3 ng L⁻¹). β -ZAL não foi detectado em amostras de água de drenagem (HARTMANN et al., 2007) (LOQ = 0,5 ng L⁻¹) e em efluente de ETE (LAGANA et al., 2001) (LOQ = 0,4 ng L⁻¹). Pelo nosso conhecimento, o metabólito ZAN foi identificado/quantificado pela primeira vez em água do rio neste trabalho.

2.3.7 Comparação com outros métodos de extração

A extração e determinação das micotoxinas estrogênicas estudadas em amostras de água pelo método proposto foram comparadas com outros métodos, baseando-se no LOD, solvente de extração, volume da amostra e precisão. Os resultados dessa comparação estão apresentados na Tabela 10. O método de DLLME desenvolvido resultou em limites de detecção comparáveis, embora superiores, em relação aos outros métodos convencionais de extração como a extração em fase sólida (SPE) utilizada em combinação com a HPLC/FLD ou LC-MS/MS (GROMADZKA et al., 2009; HARTMANN et al., 2007; LAGANA et al., 2004) e mais baixos quando comparado com método utilizando DLLME. No entanto, vale resaltar que o método DLLME proposto requer um baixo volume de solvente orgânico, é mais rápido e requer um menor volume da amostra (10 mL) enquanto, na SPE o volume de amostra foi de 1000 mL, dificultando o manuseio e armazenamento das amostras. Relativamente a DLLME, destaca-se ainda a substituição de solvente clorado por solvente bromado.

Por comparação ao método DLLME-MEKC-MS (D'ORAZIO et al., 2014), nenhum solvente dispersor foi utilizado no método proposto, o qual mostrou-se simples, econômico e ambientalmente amigável e usando um solvente de baixa toxicidade em comparação ao clorofórmio. Além disso, limites de detecção mais baixos foram obtidos para o método desenvolvido.

Tabela 10 - Comparação do método proposto com outros métodos para a determinação de micotoxinas estrogênicas em amostras de água

Micotoxinas	Método de extração	Técnica instrumental	Volume da amostra (mL)	Solvente organico utilizado na extração	LOD (ng L ⁻¹)	Precisão RSD (%) ^a	Referência
ZEN	SPE	HPLC/FLD	1000	3 mL metanol	0,3	4	Gromadzka et al. (2009)
ZEN, β -ZAL e α -ZAL	SPE	LC-APCI-MS/MS	1000	8.5 mL DCM + 6.9 mL metanol	0,3-1,9	2-8	Laganà et al. (2004)
ZEN, α -ZEL, β -ZEL, β -ZAL, α -ZAL e ZAN	SPE	LC-ESI-MS/MS	1000	9 mL acetonitrila	0,6-1,1	2-13	Hartmann et al. (2007)
ZEN, α -ZEL, β -ZEL, β -ZAL e α -ZAL	DLLME	MEKC-MS	7,5	110 μ L clorofórmio + 500 μ L metanol	140-960	1-18	D'Orazio et al. (2014)
ZEN, α -ZEL, β -ZEL, β -ZAL, α -ZAL e ZAN	DLLME	LC-ESI-MS/MS	10	100 μ L bromociclohexano	4-20	3-12	Método proposto

APCI: ionização química a pressão atmosférica; ESI: ionização por eletrospray; FLD: detector de fluorescência; MS/MS: espectrometria de massas modo sequencial; MEKC: cromatografia eletrocínética capilar micelar

^a Repetibilidade

Fonte: o autor.

2.4 Conclusão

Um método rápido e simples utilizando o procedimento de microextração líquido-líquido dispersiva foi desenvolvido para extrair e concentrar micotoxinas estrogênicas de amostras aquosas ambientais. O método de microextração proposto é ambientalmente amigável (solventes clorados altamente tóxicos não foram utilizados), econômico e rápido, com alta eficiência de extração, baixo LOD e boa repetibilidade. Este estudo fornece uma nova perspectiva para a substituição de solventes clorados por solventes menos tóxicos, tais como, os solventes bromados, contribuindo à química analítica verde.

**CAPÍTULO 3 - DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO ANALÍTICO “VERDE”
PARA A DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS ESTROGÊNICAS EM ÁGUAS
SUPERFICIAIS POR MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA COM
LÍQUIDO IÔNICO E HPLC/FLD**

3.1 Introdução

A DLLME apresenta várias características favoráveis a sua escolha em detrimento as técnicas de extração clássicas e outras técnicas miniaturizadas, conforme detalhado no Capítulo 2. Destacando-se entre estas características: baixo custo, fácil manipulação, rapidez e eficiência.

No entanto, solventes orgânicos voláteis e tóxicos, tais como tetracloreto de carbono, clorobenzeno e clorofórmio ainda são empregados como solvente de extração em DLLME, o que pode representar uma grave ameaça à saúde humana e ao ambiente (ZHOU; PANG; XIAO, 2011).

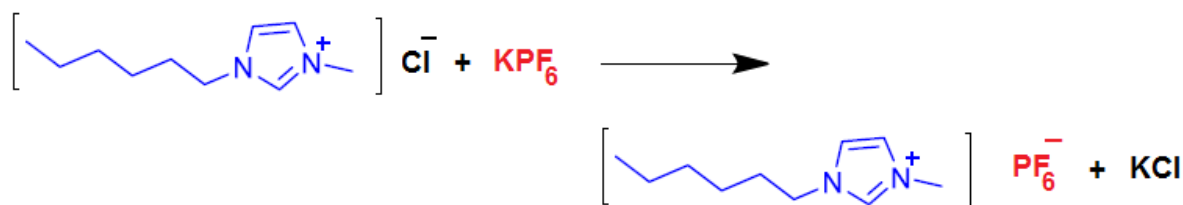
Os líquidos iônicos (ILs) são cada vez mais utilizados na química analítica, uma vez que são menos tóxicos, menos poluentes e menos voláteis do que os solventes orgânicos convencionais. Além disso, apresentam boa solubilidade para compostos orgânicos e inorgânicos, alta estabilidade térmica e são largamente conhecidos como “green solvents” (ZHANG; SHI, 2010).

A composição destes líquidos é de cátions como imidazol, piridínio, pirrolidínio, amônio e fosfônio ligados a um contra íon, orgânico ou inorgânico, como halogenetos, tetraflúorborato (BF_4^-), hexaflúorofosfato (PF_6^-) ou bis[(trifluórmetil)sulfonil]imida (NTf_2^-). Devido à grande variedade de cátions e ânions que podem ser combinados para formar um líquido iônico, esses compostos podem ser alterados para apresentar propriedades de solvatação diferentes dos solventes orgânicos convencionais. A possibilidade de otimizar métodos analíticos pela utilização de líquidos iônicos com propriedades específicas ainda é pouco explorada e o potencial desses compostos ainda deve ser melhor estudado (ZHAO; ANDERSON, 2011).

Há alguns anos, Liu et al. (2009) introduziram a técnica de microextração líquido-líquido dispersiva com líquido iônico (IL-DLLME - Ionic Liquid based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction). Em outro estudo, um método baseado na técnica IL-DLLME *in situ* foi desenvolvido e aplicado para pré-concentrar compostos aromáticos em água (MALLAH; SHERIMANI; MARAGHEH, 2009). Um líquido iônico hidrófilo (cloreto de 1-butil-3-metil-imidazólio – $[\text{C}_4\text{MIM}][\text{Cl}]$) foi utilizado como extrator, capaz de se dissolver completamente na solução aquosa e promover interações do líquido iônico com o analito. Em seguida, um reagente de troca iônica (LiNTf_2 - bis[(trifluórmetano)sulfonil]imida de lítio) foi adicionado. Uma reação de

dupla troca “in situ” produziu um líquido iônico hidrofóbico $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{PF}_6^-]$ (Figura 18). Com a retirada do processo do solvente dispersor orgânico, a reação e a subsequente extração foram realizadas em um único passo, tornando o processo rápido e adequado para uma análise de alto rendimento. Metodologias semelhantes foram utilizadas para outros compostos, como inseticidas de diferentes classes (diacilhidrazina, neonicotinóide, organofosforado e feniltiouréia) (LI et al., 2011) e Cr^{3+} e Cr^{6+} (LÓPEZ-GARCÍA; VICENTE-MARTÍNEZ; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, 2012).

Figura 18 - Formação de $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{PF}_6^-]$ por reação in situ



Fonte: Adaptado de Yu et al. (2013).

A técnica instrumental de análise mais utilizada para a determinação da ZEN e seus metabólitos é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em combinação com uma variedade de detectores, destacando-se o detector de arranjo de diodos (DAD), o detector de fluorescência e em especial, o espectrômetro de massas (KINANI et al., 2008). As fases móveis mais utilizadas nesse tipo de análise consistem na mistura de acetonitrila:água (ACN:H₂O) ou metanol:água (MeOH:H₂O). Estima-se que 34 de milhões litros de resíduos são gerados a cada ano em todo o mundo por meio de análise por HPLC, destacando-se o uso principalmente de ACN e MeOH (GABER et al., 2011). Ambos solventes são bastante tóxicos para os analistas e o ambiente, sendo que a destinação final dos seus resíduos requer etapas de tratamento especial, sobretudo para a acetonitrila (RIBEIRO et al., 2004).

O etanol (EtOH) é um solvente biodegradável, de baixa toxicidade, que pode ser obtido a partir de fontes renováveis, especialmente como um substituto para a acetonitrila ou metanol. O etanol apresenta várias propriedades físicas vantajosas como volatilidade intermediária (ponto de ebulição: 78 °C), entre o metanol (ponto de ebulição: 65 °C) e a acetonitrila (ponto de ebulição: 82 °C), miscibilidade com água, e comprimento de onda de corte no UV de 210 nm, permitindo maior estabilidade da

composição da fase móvel ao longo da corrida cromatográfica (FUNARI et al., 2014). A utilização do etanol como modificador orgânico é uma nova abordagem para diminuição da toxicidade dos solventes orgânicos utilizados na análise por HPLC, onde a mistura etanol:água é utilizada como fase móvel e os resíduos são compatíveis com o ambiente. A substituição da acetonitrila ou metanol por etanol nas separações por HPLC foi evidenciada pelo aumento gradual do número de publicações com esta abordagem (SHAABAN; GÓRECKI, 2015).

Diante desses fatores, esse estudo tem como objetivo contribuir com o desenvolvimento de um método analítico, no contexto da química verde, para determinação das micotoxinas estrogênicas zearalenona (ZEN) e o seu metabólito α -zearalenol (α -ZEL) em águas superficiais utilizando a microextração líquido-líquido dispersiva com líquidos iônicos (IL-DLLME) como técnica de preparação de amostra e HPLC/FLD para a determinação dos analitos utilizando etanol como componente orgânico da fase móvel.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Reagentes e padrões

Os solventes acetonitrila, metanol e etanol (grau HPLC) foram obtidos da J.T. Baker (USA). Os líquidos iônicos Cloreto de 1-butil-3-metil-imidazólio ($[C_4MIM][Cl]$), Cloreto de 1-hexil-3-metil-imidazólio ($[C_6MIM][Cl]$) e Cloreto de 1-octil-3-metil-imidazólio – ($[C_8MIM][Cl]$), hexaflúorofosfato de potássio (KPF_6) e bis[(trifluórometano)sulfonilimida de lítio ($LiNTf_2$) foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Água deionizada utilizada nos ensaios foi obtida pelo sistema de filtração Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Ácido clorídrico (HCl, 37% m/v), cloreto de sódio foram comprados da JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA) e ácido acético (99% grau HPLC) foi da Panreac Química, (Barcelona, Espanha)

Os padrões analíticos de ZEN e α -ZEL foram comprados da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As soluções padrão de ZEN ($400 \mu g mL^{-1}$) e α -ZEL ($200 \mu g mL^{-1}$) foram preparadas em acetonitrila e estocadas em refrigeração a $-20^\circ C$. As soluções padrão de trabalho foram preparadas imediatamente antes do seu uso utilizando alíquotas da solução padrão estoque e volume final de diluição com acetonitrila.

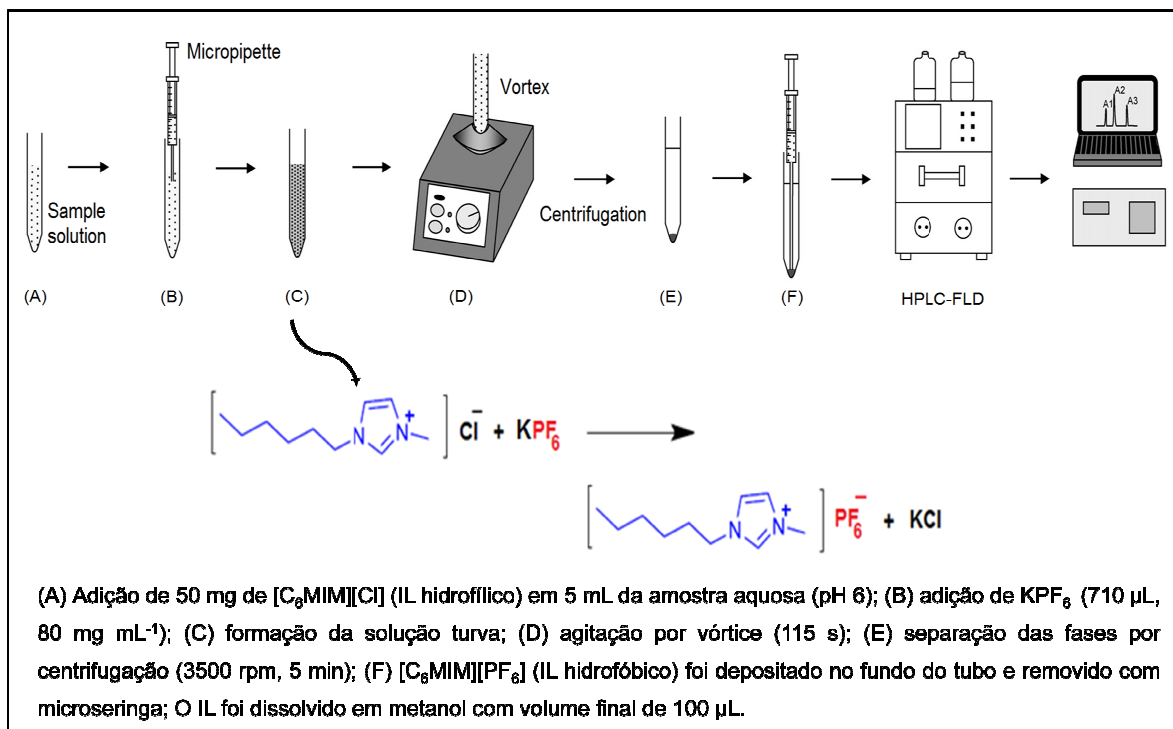
3.2.2 Instrumentação

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a líquido Varian 920-LC, equipado com bomba quaternária, injetor automático (capacidade de 200 posições, vials de 1,8 mL) e detector de fluorescência (FLD). A separação cromatográfica foi realizada por uma coluna Gemini C₁₈ (150 mm x 4,6 mm d.i, 5 µm de diâmetro de partícula, com auxílio de pré-coluna C₁₈ (4,0 mm x 3,0 mm d.i) ambos da Phenomenex (Torrance, CA, USA). O modo isocrático foi utilizado para a eluição com etanol:água (50:50) e 0,1% ácido acético na fase aquosa durante 16 min. A vazão foi de 1,0 mL min⁻¹ com temperatura da coluna em 45 °C e um volume de injeção de 20 µL. Os comprimentos de onda de excitação e emissão para o FLD foram de 274 nm e 440 nm, respectivamente. A aquisição de dados foi realizada usando o software Galaxie.

3.2.3 Procedimento in situ IL-DLLME

Em um tubo de centrífuga com fundo cônico de 10 mL foi adicionado uma alíquota de 5 mL da amostra de água (acidificada previamente usando 0,1 mol L⁻¹ de HCl a pH 6). Então, 100 µL de [C₆MIM][Cl] (0,5 mg µL⁻¹) foi adicionado à solução aquosa da amostra com uma seringa de 100 µL Hamilton (Reno, NV, USA). O líquido iônico foi completamente disperso e dissolvido na solução aquosa após agitação manual. Uma solução aquosa de KPF₆ (710 µL, 80 mg mL⁻¹) foi adicionada à solução aquosa resultando na formação de uma solução turva. Após agitação por 110 s com agitador de vórtice a 2500 rpm, a solução foi centrifugada a 3500 rpm durante 5 min. O líquido iônico (IL) formado e sedimentado no fundo do tubo foi retirado ao máximo e transferido para um insert de vidro de 300 µL utilizando uma microseringa (100 µL). O IL foi então dissolvido em MeOH a um volume final de 100 µL. Finalmente, 20 µL do extrato foram injetados no sistema HPLC/FLD. Um esquema desse procedimento é demonstrado na Figura 19.

Figura 19 - Procedimento in situ IL-DLLME



Fonte: Adaptado de Vázquez et al. (2012).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Otimização das condições cromatográficas

A fim de seguir os princípios da química verde, um procedimento de HPLC foi otimizado para desenvolver um método cromatográfico com adequada separação entre os analitos ZEN e α -ZEL e detecção. Assim, as variáveis como proporção de etanol na fase móvel, vazão da fase móvel, temperatura da coluna e percentagem de ácido acético (adequação à química verde) na fase aquosa foram avaliados. Uma comparação dessas condições da mistura EtOH:H₂O foi realizada com os sistemas ACN:H₂O e MeOH:H₂O, a partir dos parâmetros cromatográficos: tempo de retenção, assimetria (A_s), fator de retenção (k), e resolução (R_s).

As proporções de 45:55, 50:50 (em volume) para EtOH:H₂O; 55:45, 45:55 (em volume) para ACN:H₂O e 70:30, 75:25 (em volume) para MeOH:H₂O foram avaliadas mantendo-se em 35 °C a temperatura da coluna com vazão de 1,0 mL min^{-1} . Essas proporções foram escolhidas de acordo com a similaridade da força eluotrópica (RIBEIRO et al., 2004).

De acordo com a Tabela 11 a proporção 50:50 (em volume) EtOH:H₂O apresenta valores similares ou por vezes melhores, para os parâmetros cromatográficos calculados, em relação as proporções de ACN e MeOH. A substituição de ACN e MeOH por etanol pode ser realizada sem afetar a separação de α -ZEL e ZEN, logo, o sistema binário EtOH:H₂O da fase móvel foi escolhido para esse fim.

Tabela 11 - Parâmetros cromatográficos obtidos no desenvolvimento do método

Parâmetros	ACN:H ₂ O		EtOH:H ₂ O		MeOH:H ₂ O	
	45:55	55:45	45:55	50:50	70:30	75:25
t_R^1	6,99	4,04	7,68	5,01	5,57	4,21
t_R^2	11,22	5,71	9,04	5,79	6,15	4,61
Área do pico ¹	3972	2819	6270	6903	6526	6949
Área do pico ²	2245	1606	4005	4657	4379	4682
As ¹	1,44	1,43	1,12	1,15	1,18	1,22
As ²	1,37	1,48	1,18	1,15	1,15	1,12
R _s	10,8	7,0	2,4	2,2	2,3	1,9
α	1,61	1,42	1,18	1,16	1,10	1,10
k ¹	3,4	1,5	3,8	2,2	4,1	2,5
k ²	6,1	2,6	4,7	2,6	4,6	2,9

ACN – acetonitrila; MeOH – metanol; EtOH – etanol; t_R – tempo de retenção; As – assimetria; α – fator de separação; R_s – resolução; k – fator de retenção; ¹ α -ZEL; ² ZEN.

Fonte: o autor.

Em seguida a influência da temperatura da coluna (35, 40, 45, 50 °C), vazão da fase móvel (0,6; 0,8; 1,0 mL min⁻¹) e uso de ácido acético na fase aquosa (1 % - em volume) foram avaliados, mantendo-se constante a proporção 50:50 (em volume) EtOH:H₂O. A utilização do ácido acético levou a uma melhor simetria dos picos, provavelmente pela supressão iônica, já que os analitos são ácidos fracos. Uma vez que a mistura etanol/água apresenta viscosidade mais elevada em relação à ACN e MeOH, o aumento da temperatura da coluna foi avaliada para contornar esse inconveniente, assim como, a mudança na vazão da fase móvel. O aumento da temperatura resultou em menor pressão do sistema, picos mais simétricos, resolução e número de pratos adequados. A condição com uso de ácido acético (1%), vazão de 1,0 mL min⁻¹ e temperatura da coluna de 45 °C foram escolhidas.

A Figura 20 mostra o cromatograma com a condição otimizada para separação dos dois analitos e a Tabela 12 contém os parâmetros cromatográficos calculados para essa condição final.

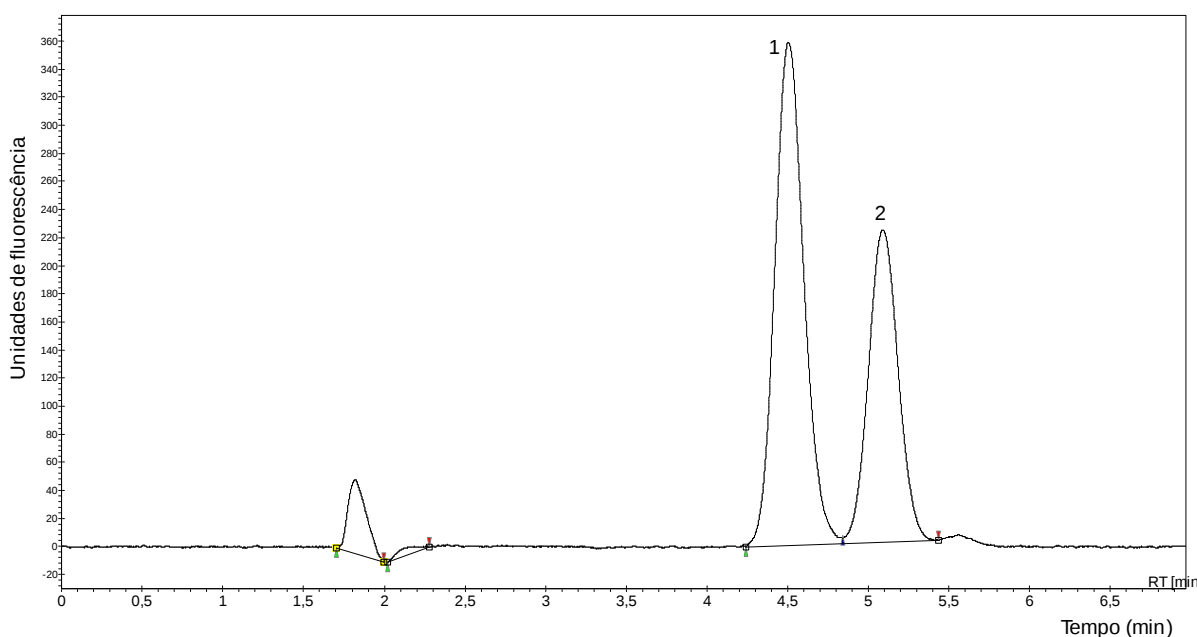
Tabela 12 - Parâmetros cromatográficos obtidos para a separação dos analitos nas condições cromatográficas otimizadas para o HPLC/FLD [50:50 (em volume) EtOH:H₂O, 1% ácido acético, vazão de 1,0 mL min⁻¹ e temperatura da coluna de 45 °C]

Composto	t _R	k	R _s	α	As
α-ZEL	4,68	1,9	1,8	1,13	1,10
ZEN	5,30	2,3			1,01

t_R – tempo de retenção; As – assimetria; α – fator de separação; R_s – resolução; k – fator de retenção

Fonte: o autor.

Figura 20 - Cromatograma final da separação dos analitos por HPLC/FLD



Fonte: o autor.

Nota: Condições cromatográficas: Fase Móvel - H₂O (50%) + 1% ácido acético, etanol (50%), vazão 1,0 mL min⁻¹, temperatura 45 °C, volume de injeção 20 µL. Comprimentos de onda de excitação e emissão de 274 nm e 440 nm, respectivamente. Picos: 1. α-ZEN; 2. ZEN. Concentração: 0,5 mg L⁻¹

3.3.2 Otimização do procedimento in situ IL-DLLME

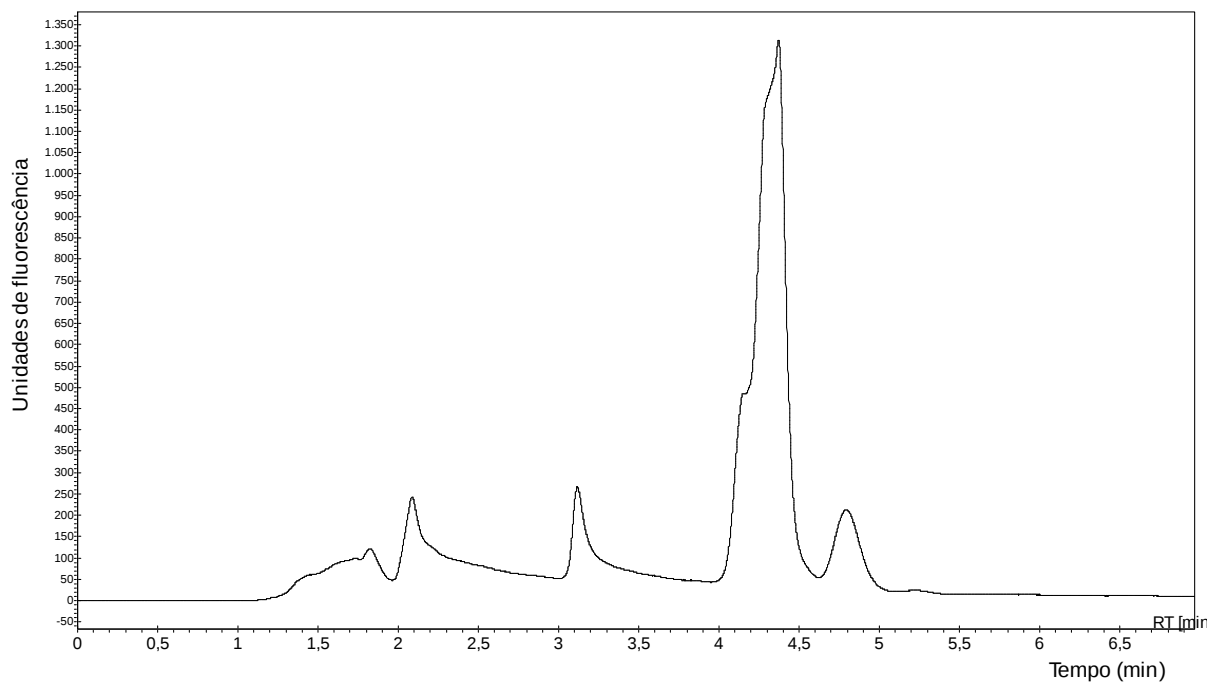
A fim de alcançar as condições experimentais ótimas para extração das micotoxinas α-ZEL e ZEN por meio da in situ IL-DLLME, avaliou-se a influência dos diferentes parâmetros que podem afetar a eficiência de extração, tais como o pH, tipo e quantidade do IL e reagente de troca iônica, tempo e velocidade de centrifugação, tempo de agitação (vórtice) e força iônica. A seleção dos níveis das variáveis foi baseada em trabalhos publicados com a técnica IL-DLLME in situ (TRUJILLO-RODRÍGUEZ et al., 2013).

3.3.2.1 Seleção do líquido iônico e reagente de troca aniônica

A seleção do IL é um dos fatores mais importantes da *in situ* IL-DLLME, o qual pode afetar a eficiência do procedimento de microextração. Para obter a capacidade de extrair os analitos em uma amostra aquosa, o IL deve possuir certas características, como solubilidade em água, baixa volatilidade e afinidade pelos analitos (MAJIDI; SHEMIRANI, 2011). Na *in situ* IL-DLLME, após a reação entre o IL miscível em água e o reagente de troca iônica, um IL imiscível em água deve ser formado. Além disso, a massa específica do IL hidrofóbico tem que ser alta o suficiente para permitir que as microgotas de IL se depositem no fundo do tubo. De acordo com estes critérios e o custo dos líquidos iônicos, $[C_4MIM][Cl]$, $[C_6MIM][Cl]$ e $[C_8MIM][Cl]$ foram utilizados como líquidos iônicos hidrofílicos, enquanto que $LiNTf_2$ e KPF_6 foram utilizados como reagentes de troca iônica, sendo que todas as combinações foram avaliadas em triplicata.

Dentre os seis líquidos iônicos formados na reação de troca aniônica, o $[C_4MIM][PF_6]$ não foi formado nas condições de extração devido à sua maior solubilidade em água em relação aos demais ILs avaliados (BERTHOD; RUIZ-ANGEL; CARDA-BROCH, 2008). Picos interferentes coeluíram no mesmo tempo de retenção de α -ZEL ($t_R \sim 4,5$ min) quando $[C_8MIM][NTf_2]$ foi avaliado, interferindo na sua quantificação (Figura 21). As eficiências de extração dos outros líquidos iônicos estão mostradas na Figura 22. Maiores eficiências de extração dos analitos e com resultados similares foram obtidas pelos líquidos iônicos $[C_6MIM][PF_6]$ e $[C_6MIM][NTf_2]$. Entretanto, foi preferido o líquido iônico $[C_6MIM][PF_6]$ por apresentar uma maior precisão na análise (menor desvio padrão). Wang et al. (2015) utilizaram o IL $[C_6MIM][PF_6]$ para determinação de ZEN em produtos derivados de milho.

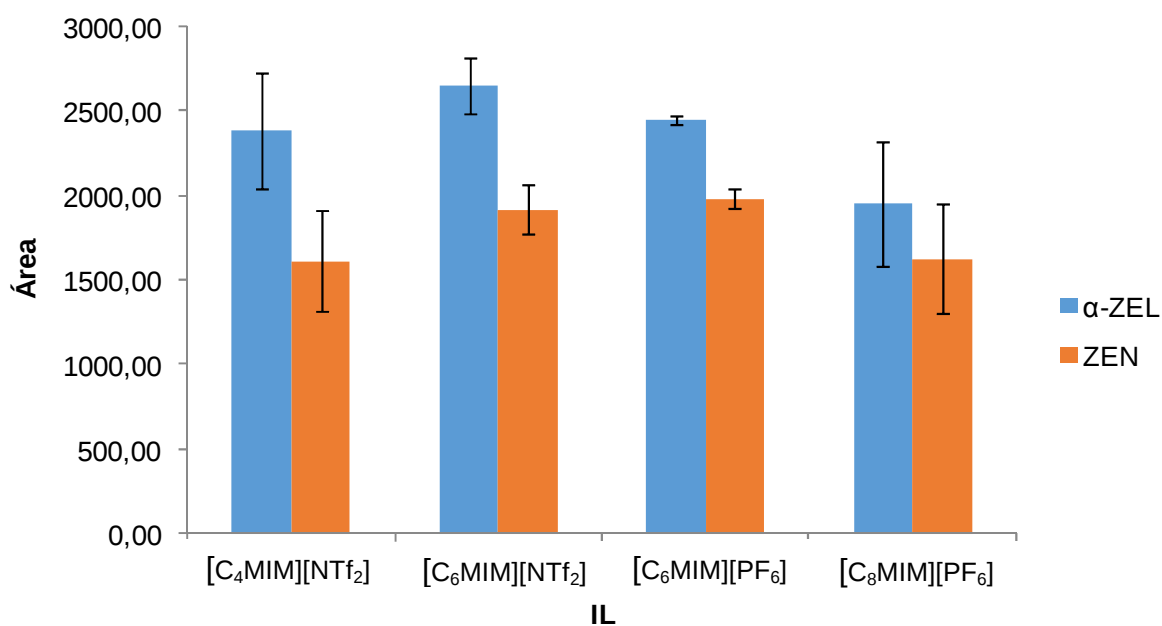
Figura 21 - Cromatograma para extração das micotoxinas em água pelo método in situ IL-DLLME e HPLC/FLD



Fonte: o autor.

Nota: Condições de extração: volume da amostra, 5 mL; quantidade do IL $[C_8MIM][Cl]$, 50 mg; tempo de centrifugação: 5 min; velocidade de centrifugação, 3500 rpm; tempo de vórtice; 60 s; razão molar IL:reagente troca iônica, 1:1; pH, 7; Concentração dos analitos, $20 \mu g L^{-1}$

Figura 22 - Efeito do par líquido iônico e reagente de troca iônica na extração dos analitos



Fonte: o autor.

Nota: Condições de extração: volume da amostra, 5 mL; quantidade do IL, 50 mg; tempo de centrifugação: 5 min; velocidade de centrifugação, 3500 rpm; tempo de vórtice; 60 s; razão molar IL:reagente troca iônica, 1:1; pH, 7; concentração, 20 $\mu\text{g L}^{-1}$.

3.3.2.2 *Planejamento fatorial*

Um planejamento fatorial denominado Plackett–Burman foi utilizado para triagem das variáveis pH, quantidade de $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{Cl}]$ (g), razão molar entre $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{Cl}]$ e $[\text{KPF}_6]$, tempo de agitação (vórtice), força iônica(% de NaCl), tempo e velocidade de centrifugação. O planejamento Plackett–Burman é uma ferramenta extremamente útil para otimização de sistemas multivariáveis. Este método não determina a quantidade exata de cada variável, mas pode fornecer algumas informações importantes sobre a significância de cada uma delas nos resultados obtidos utilizando poucos experimentos (LÓPEZ et al., 2007). Os níveis (baixo e alto) e a matriz do planejamento (2^{7-4}) estão descritos na Tabela 13, totalizando onze ensaios (aleatórios) para avaliar as variáveis que têm efeito significativo na extração dos analitos em água. A matriz do planejamento contém três pontos centrais, a fim de estimar o erro experimental (STALIKAS et al., 2009). O software STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA) foi utilizado para gerar os procedimentos estatísticos.

Tabela 13 - Variáveis experimentais e níveis do planejamento Plackett–Burman

Variáveis	Níveis		
	Baixo (-1)	Central (0)	Alto (+1)
(X ₁) Tempo de vórtice (s)	60	120	180
(X ₂) pH	3	5	7
(X ₃) Tempo de centrifugação (min)	5	7,5	10
(X ₄) % NaCl (m/v)	0	5	10
(X ₅) Quantidade de [C ₆ MIM][Cl] (g)	50	62,5	75
(X ₆) Velocidade de centrifugação (rpm)	2500	3000	3500
(X ₇) Razão molar de [C ₆ MIM][Cl] e [KPF ₆]	1:1	1:1,25	1:1,5

Experimentos	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	-1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	-1	1	-1	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1
9 (C)	0	0	0	0	0	0	0
10 (C)	0	0	0	0	0	0	0
11 (C)	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: o autor.

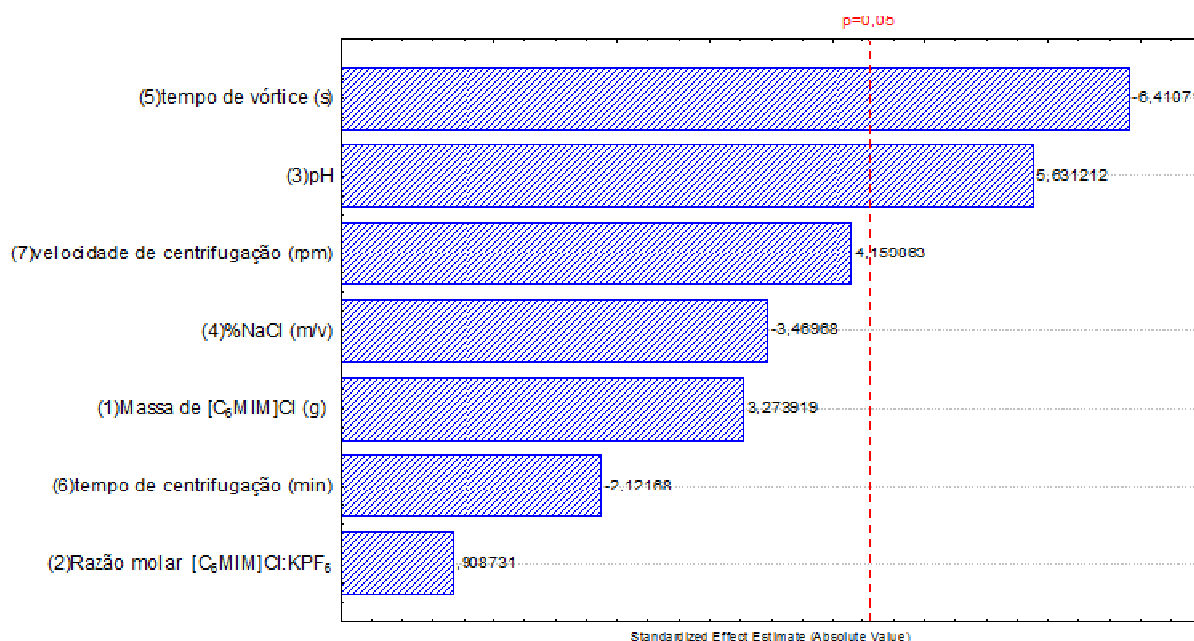
Para avaliar o comportamento conjunto dos analitos α-ZEL e ZEN, e dessa forma chegar a um ponto de máxima resposta para os dois analitos, foi determinada uma resposta normalizada (resposta múltipla, R_m) (GAUJAC et al., 2008). Para o cálculo foi empregada a equação:

$$R_m = \sum \frac{R_x}{R_{x(\max)}} \quad \text{Eq.: 2}$$

onde, x corresponde aos analitos (α-ZEL e ZEN); R_x é a resposta cromatográfica (área do pico) obtida para o composto x ; $R_{x(\max)}$ corresponde a resposta cromatográfica máxima, obtida para o composto x , de todos onze experimentos do planejamento Plackett–Burman executado.

Os efeitos principais das variáveis foram determinados utilizando a ANOVA, e um teste t (*student*) com um nível de confiança de 95% foi utilizado para determinar os efeitos estatisticamente significativos. Os efeitos foram analisados usando um gráfico de Pareto (Figura 23).

Figura 23 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais para resposta múltipla obtida pelo planejamento Plackett–Burman



Fonte: o autor.

As barras horizontais do gráfico que ultrapassam a linha pontilhada vertical, referente ao nível de confiança de 95%, correspondem a fatores significativos de um processo. Variações nesses parâmetros geram aumentos ou diminuições da resposta analítica (área cromatográfica). Os resultados indicam que, no domínio estudado, o tempo de agitação (vórtice) foi a variável mais significativa com efeito negativo (-6,41). Por outro lado, o pH mostrou um efeito positivo (5,63) na resposta. As variáveis quantidade de [C₆MIM][Cl] (g), razão molar [C₆MIM][Cl]:[KPF₆], força iônica, tempo e velocidade de centrifugação não apresentaram efeito significativo na resposta dentro do domínio estudado e, sendo assim, foram mantidas constantes do estudo posterior de otimização (Planejamento Doehlert).

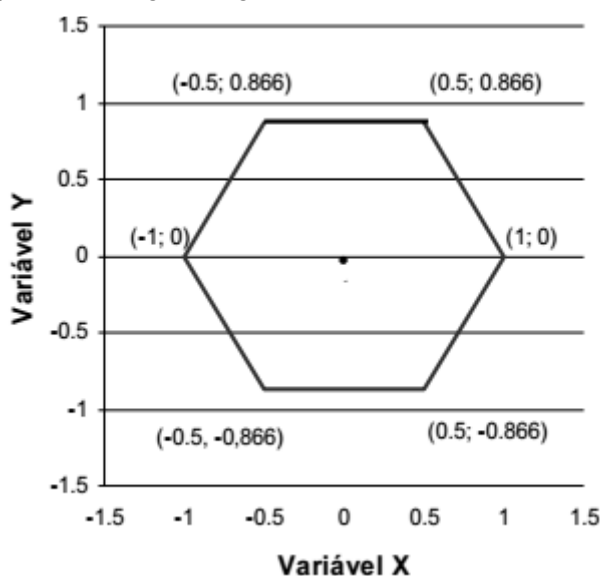
3.3.2.3 Planejamento Doehlert

A metodologia de superfície de resposta é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais e contempla um conjunto de procedimentos estatísticos utilizados na modelagem matemática de respostas (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2002). Essa técnica utiliza também planejamentos fatoriais ampliados, de segunda ordem, onde se destacam os modelos Composto Central, Box-Behnken e Doehlert.

O planejamento Doehlert ou Matriz Doehlert é uma alternativa bastante útil e atrativa aos demais planejamentos experimentais de segunda ordem, tendo sido proposto por Doehlert (1970). A matriz Doehlert possui seus pontos distribuídos uniformemente por todo o espaço experimental, os quais correspondem aos vértices de um hexágono gerado de um simplex regular e, em geral, o número total de pontos experimentais (N) no planejamento é igual a $n^2 + n + n_0$, em que n é o número de fatores e n_0 é o número de experimentos no ponto central (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

A Figura 24 ilustra os pontos experimentais para o planejamento Doehlert de duas variáveis.

Figura 24 - Distribuição dos pontos experimentais de uma matriz Doehlert para otimização de duas variáveis, representada por um hexágono regular com as coordenadas normalizadas



Fonte: Adaptado de Nechar et al. (1995).

Ao contrário dos planejamentos Box-Behnken e composto central, o Doehlert permite o estudo das variáveis em quantidades de níveis diferentes. Esta propriedade permite a escolha dos fatores e o número de níveis, o que é relevante quando alguns fatores são sujeitos a certas restrições como o custo ou limitações instrumentais, de forma que, seu estudo com pequeno número de níveis seja necessário (ARAUJO; BRERETON, 1996).

Com base nos resultados obtidos no planejamento Plackett–Burman, nessa segunda etapa de otimização do método foi desenvolvida a metodologia de

superfície de respostas, através da matriz Doehlert, com o objetivo de otimizar as variáveis independentes tempo de vórtice (X_1) e pH (X_2). A escolha do intervalo e do número de níveis estudados para cada variável foi baseada no grau de significância de cada uma de acordo com o resultado do planejamento fatorial. Sendo assim, a matriz Doehlert consistiu de nove experimentos incluindo três pontos centrais. O tempo de vórtice foi estudado em cinco níveis (maior efeito significativo) e o pH (segundo maior efeito significativo) em três níveis (Tabela 14). As outras variáveis se mantiveram constantes com os seguintes valores: quantidade de $[C_6MIM][Cl]$ (g), 50 mg; razão molar de $[C_6MIM][Cl]$ e $[KPF_6]$, 1:1,25; força iônica, sem adição de NaCl; tempo e velocidade de centrifugação, 5 min e 3500 rpm.

Tabela 14 - Matriz Doehlert para as variáveis pH e tempo de vórtice com os valores utilizados e as respostas obtidas

Experimento	Tempo de vórtice (s)	pH	Área (sinal cromatográfico)		
			α -ZEL	ZEN	Resposta múltipla (RM)
1(C)	110 (0)	7 (0)	2647	2009	1,96
2	190 (1)	7 (0)	2489	1927	1,86
3	150 (0,5)	10 (0,866)	318	479	0,35
4	30 (-1)	7 (0)	2389	1842	1,78
5(C)	110 (0)	7 (0)	2501	1918	1,86
6	70 (-0,5)	4 (-0,866)	2366	1815	1,76
7	150 (0,5)	4 (-0,866)	2335	1765	1,72
8	70 (-0,5)	10 (0,866)	362	582	0,42
9(C)	110 (0)	7 (0)	2718	2047	2,00

Sublinhado - valores codificados

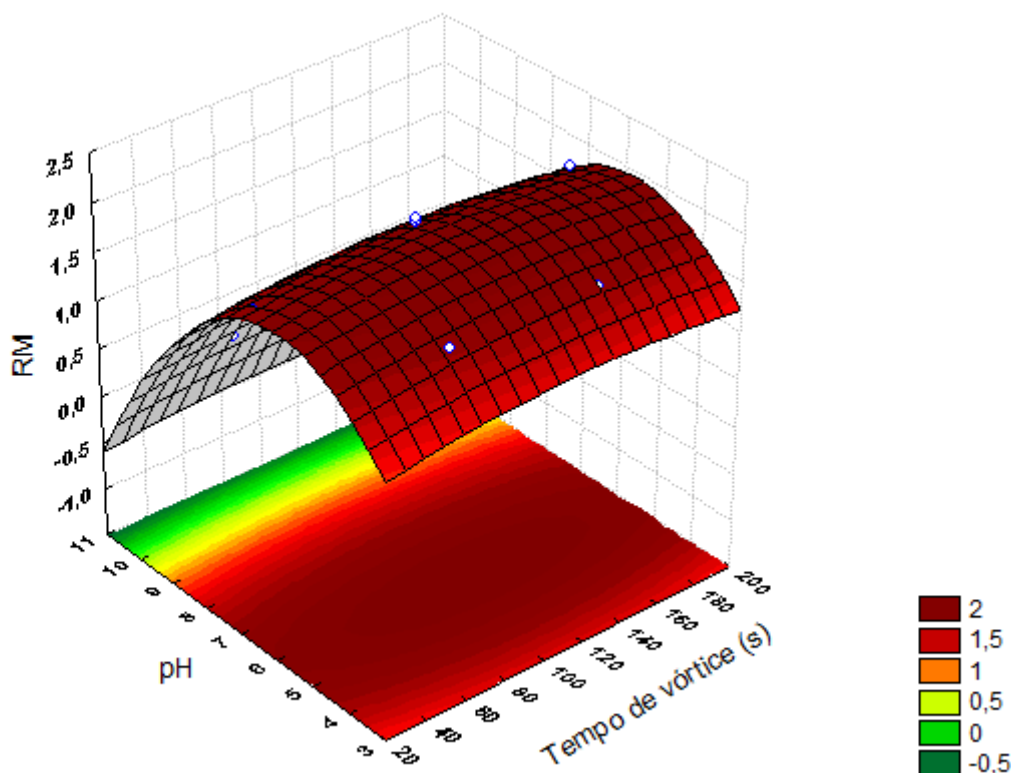
Fonte: o autor.

Os dados obtidos para a matriz Doehlert (os efeitos principais, de interações e quadráticos) foram avaliados utilizando ANOVA. O valor de “p” menor que 0,05 na tabela ANOVA indica um efeito estatístico significativo com nível de confiança de 95%. O valor de “p” para o teste de falta de ajuste (*Lack of Fit* – LOF) foi de 0,42, isso implica que a falta de ajuste do modelo não é significativa em relação ao erro puro. A qualidade do modelo polinomial foi dada pelo coeficiente de determinação (R^2) com valor de 99,52 %. O valor de R^2 ajustado foi de 98,73 % mostrando boa concordância dos dados experimentais e o modelo ajustado.

O modelo de superfície de resposta (Figura 25) gerado pela execução da matriz deste planejamento pode ser representado pela equação:

$$RM = -1,38 + 0,00467 x_1 - 0,0000187 x_1^2 + 1,10 x_2 - 0,0940 x_2^2 - 0,0000638 x_1 x_2 \quad \text{Eq.: 3}$$

Figura 25 - Superfície de resposta obtida por planejamento Doehlert



Fonte: o autor.

Pela Figura 25, observa-se que a superfície de resposta evidencia a existência de um ponto máximo (área de curvatura acentuada) que corresponde ao pH igual a 5,8 e o tempo de vórtice igual a 115 s. A variável tempo de vórtice não apresentou efeito significativo sobre a resposta múltipla, mesmo no novo domínio estabelecido, entre 30 e 190 s. A utilização de agitação por vórtice na *in situ* IL-DLLME visa aumentar a cinética da reação de troca aniônica (formação do IL hidrofóbico) e extração dos analitos (TRUJILLO-RODRÍGUEZ et al., 2013). Provavelmente a extração dos analitos ocorreu em um tempo menor que 30 s. Para garantir uma boa robustez foi adotado o valor de 115 s para o tempo de vórtice no procedimento.

Para o pH os termos linear ($p=0,003$) e quadrático ($p=0,003$) foram significativos com valor máximo (5,8) próximo da região central do domínio estudado

(ver superfície de resposta, Figura 25). Considerando que a ZEN e α -ZEL são ácidos fracos com baixo valor da constante de ionização (ZEN - $pK_{a1} = 7,58$; α -ZEL - $pK_{a1} = 7,61$) (Tabela 1), valores elevados do pH aumentariam a solubilidade do analito na fase aquosa (incremento da desprotonação), reduzindo, assim, a distribuição para o líquido iônico (SOCAS-RODRÍGUEZ et al., 2014).

3.3.3 Validação do método

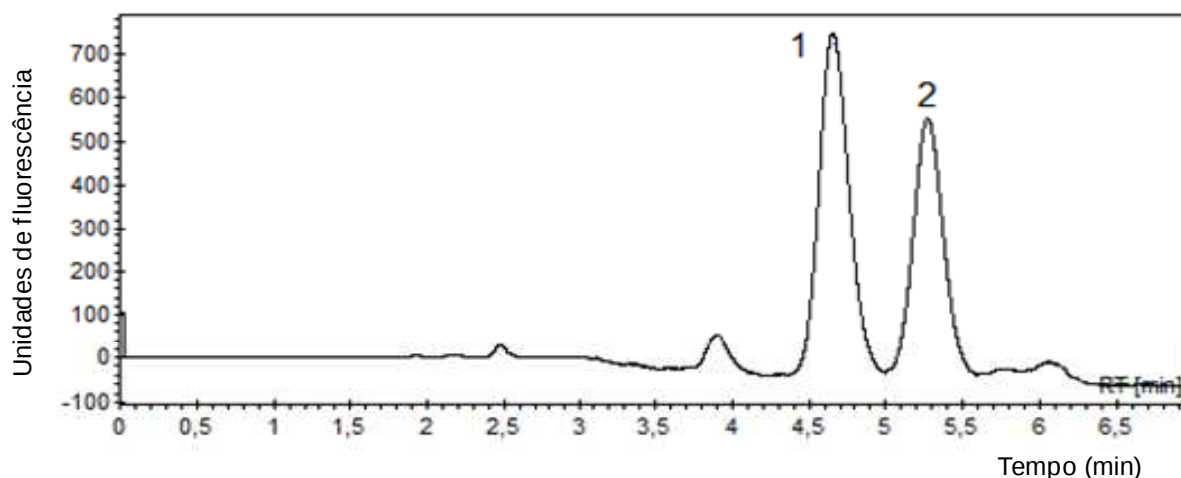
A validação do método proposto foi avaliada pelas figuras de mérito: linearidade, precisão (repetibilidade), exatidão (ensaios de recuperação), limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ). Os resultados estão listados na Tabela 15. A curva analítica foi baseada na extração dos analitos pelo procedimento otimizado em água ultrapura fortificada (triplicata). A linearidade entre 1 and 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi obtida em sete valores de concentração. O LOD do método foi calculado pela relação sinal/ruído igual a 3 ($S/N=3$), obtendo-se o valor de 0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ZEN e α -ZEL. O LOQ foi calculado pela relação sinal/ruído igual a 10 ($S/N=10$), este valor foi de 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ZEN e α -ZEL. A repetibilidade do método foi dada pelo RSD (%) com cinco replicatas em dois níveis de concentração (4 e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$). O RSD variou de 3 a 8 %, ilustrando uma precisão satisfatória. A recuperação média ($n=5$) do método variou de 76 a 81 %. O cromatograma típico de uma amostra de água de rio (Ribeirão das Cruzes – Araraquara/SP) é apresentado na Figura 26.

Tabela 15 - Figuras de mérito obtidas para o método IL-DLLME e HPLC/FLD, aplicado a água ultrapura fortificada com os analitos

Analito	Linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão RSD (%) ($n = 5$)		Recuperação (%) ($n = 3$)	
				4 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	15 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	4 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	15 ($\mu\text{g L}^{-1}$)
ZEN	1-20	0,2	0,5	8	3	81	81
α -ZEL	1-20	0,2	0,5	8	3	78	76

Fonte: o autor.

Figura 26 - Cromatograma (HPLC/FLD) fortificado com as micotoxinas em amostra de água de rio utilizando o método IL-DLLME proposto



Fonte: o autor.

Nota: (1) α -ZEL; (2) ZEN. Nível de fortificação: $20 \mu\text{g L}^{-1}$ valor acima dos níveis de fortificação para o estudo de validação

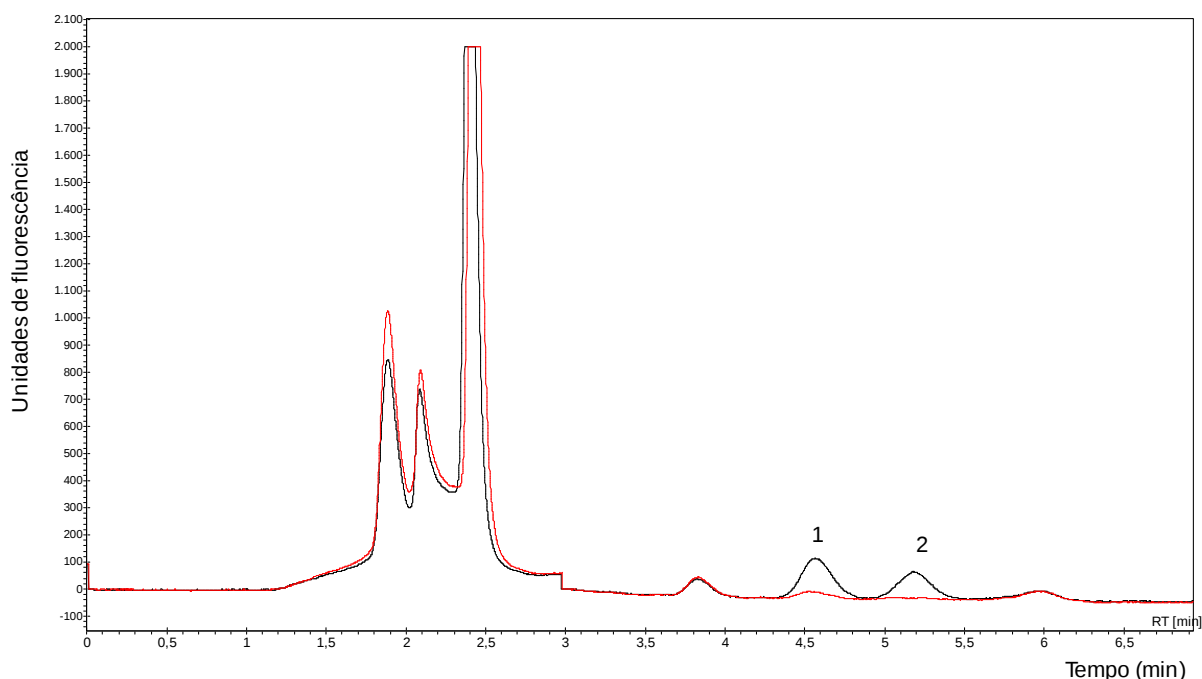
3.3.4 Aplicação do método

A aplicação do método desenvolvido foi realizada em três amostras de águas naturais, incluindo água potável, água superficial e água mineral. A água potável foi coletada diretamente de uma das torneiras do laboratório, no IQ/UNESP, após 10 min de escoamento. A água superficial foi obtida do Ribeirão das Cruzes (Araraquara-SP) próximo à captação da Estação de Tratamento de Água em Araraquara/SP. A água mineral foi analisada de uma embalagem (500 mL) adquirida no comércio local (Araraquara/SP). Estas amostras foram filtradas através de filtros de seringa com membrana de PTFE possuindo um tamanho de poro de $0,45 \mu\text{m}$ e estocadas ao abrigo da luz solar sob refrigeração a 4°C antes do uso.

Os resultados, apresentados na Tabela 16, indicaram que a concentração dos analitos nas amostras estava abaixo do limite de quantificação do método. Estas amostras foram então fortificadas com as micotoxinas com concentrações de $4 \mu\text{g L}^{-1}$ para investigar o efeito matriz a partir dos valores obtidos para as recuperações relativas (%). De acordo com a Tabela 16, as recuperações relativas (RR) para as amostras de água variaram de 83 a 86% (água de rio), 99 a 102% (água mineral) e 6 a 13% (água de abastecimento), com precisão entre 3 e 9% (RSD). Estes resultados indicam que a complexidade da matriz teve pouco efeito sobre o método *in situ* IL-DLLME (Figura 27), com exceção da análise de água de abastecimento. É a primeira vez em que se analisa esse tipo de água na determinação de ZEN e/ou

metabólitos. O baixo valor de recuperação obtido para essa amostra pode estar relacionado à degradação dessas micotoxinas por meio do cloro residual livre (ácido hipocloroso e íon hipoclorito) com a formação de subprodutos clorados não detectáveis na análise por fluorescência. A cloração é bastante utilizada como tratamento essencial em sistemas de abastecimento de água para desinfecção. Há relatos na literatura que compostos fenólicos (alquilfenóis, bisfenol A, estradiol e estrona) são reativos com hipoclorito formando produtos monoclorados e diclorados (FAN et al., 2013).

Figura 27 - Cromatograma (HPLC/FLD) em amostra de água de rio utilizando o método IL-DLLME proposto



Fonte: o autor.

Nota: Amostra sem fortificação dos analitos (vermelho). Amostra + fortificação de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada micotoxina (preto). (1) α -ZEL; (2) ZEN.

Tabela 16 - Resultados obtidos pela análise das amostras de água fortificada pelas micotoxinas utilizando o método proposto

Analitos	Água de rio		Água mineral		Água de abastecimento	
	RR% ^a	RSD%	RR% ^a	RSD%	RR% ^a	RSD%
ZEN	86	6	99	6	13	9
α -ZEL	83	4	102	3	6	3

^a Definido como a razão entre a área do pico do analito na amostra de água e a área do pico do analito na amostra de água deionizada na mesma concentração.

Fonte: o autor.

3.4 Conclusão

Um método rápido e simples, usando o procedimento *in situ* IL-DLLME foi desenvolvido para a extração e concentração de ZEN e α -ZEL a partir de amostras aquosas. Para a separação dos analitos por HPLC o etanol mostrou ser um bom eluente para a fase móvel. Substituição de acetonitrila ou metanol por etanol como eluente da fase móvel em HPLC é uma nova abordagem no âmbito da Química Verde. O método de microextração proposto tem vantagens, como uso de solventes de baixa toxicidade (sem necessidade de solventes orgânicos), boa repetibilidade, faixa de linearidade e os efeitos da matriz não interferem com o processo de quantificação, exceto para água potável.

**CAPÍTULO 4 - OCORRÊNCIA E CONCENTRAÇÕES DE MICOTOXINAS
ESTROGÊNICAS NA SUB-BACIA HIDROGRÁFICA DO CÓRREGO RICO**

4.1 Introdução

Pouco se sabe sobre a distribuição de micotoxinas sintetizadas pelo fungo do gênero *Fusarium* no ambiente. Os recentes esforços da União Europeia para abordar esta questão resultaram na inclusão de monitoramento de micotoxinas em águas superficiais (GROMADZKA et al., 2015). De acordo com Hartmann et al. 2007, a presença de micotoxinas no ambiente aquático pode ser resultado do escoamento de campos agrícolas. No entanto, Criado et al. (2005) demonstraram que fungos dos gêneros *Alternaria*, *Penicillium* e *Cladosporium* podem crescer e sintetizar micotoxinas em água mineral engarrafada, o que gera uma séria ameaça para a saúde dos consumidores. Russell e Paterson (2007), por sua vez, confirmaram a capacidade de *Fusarium graminearum* para produzir ZEA na água potável.

Há uma série de discussões sobre as vias de entrada de micotoxinas no meio aquático, e por isso é necessário realizar estudos adicionais, que irão estabelecer claramente como é o transporte dessas substâncias no ambiente. Estudos sobre a prevalência de micotoxinas no ambiente aquático são principalmente focados na ZEN devido à sua forte atividade estrogênica. Publicações recentes relataram a ocorrência de ZEN em águas superficiais. Mesmo que as concentrações dessa micotoxina em água não sejam elevadas, a sua acumulação na água utilizada para a produção de alimentos pode apresentar um risco de saúde para os humanos e animais (GROMADZKA et al., 2015). Este risco aumenta com a presença de outros interferentes endócrinos, tais como, os estrógenos naturais (BUCHELI et al., 2005).

No Brasil, a principal fonte de contaminação ambiental das águas se dá por meio de esgotos domésticos não tratados, uma vez que os efluentes urbanos não passam pelo processo de tratamento terciário pela sua inexistência ou o tratamento secundário é insuficiente para remoção completa de contaminantes e desinfecção. Dados da Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (PNSB) de 2008 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2008), que avalia os serviços de abastecimento de água, esgotamento sanitário, manejo de águas pluviais e manejo de resíduos sólidos, prestados à população por entidades que atuam no setor, apontam que a coleta de esgotos estava presente em apenas 55 % dos municípios brasileiros, marca pouco superior à observada na pesquisa anterior, realizada em 2000, que registrava 52 %. Apesar de menos de 1/3 dos municípios brasileiros terem

tratamento de esgoto, o volume tratado representava, em 2008, 68,8% do que era coletado. Esse resultado é explicado pelo fato dos municípios com tratamento de esgoto concentrarem uma parcela significativa do esgoto coletado. Nesse indicador, houve um avanço considerável em relação a 2000, quando, segundo a PNSB, a proporção era de 35,3%.

Em águas residuárias domésticas e industriais podem ser encontrados hormônios naturais e sintéticos (estrógenos, andrógenos), ingredientes ativos de produtos farmacêuticos, metais, pesticidas, aditivos de produtos de higiene pessoal e industrial, entre outros produtos químicos (BERGMAN et al., 2012).

A principal fonte de contaminação de águas superficiais por interferentes endócrinos (IE) é o lançamento de esgotos sanitários tratados ou *in natura*. Alguns estudos realizados no Brasil relataram a ocorrência de IE em águas superficiais, cujos resultados de monitoramento mostram a presença descontínua desses compostos nos mananciais, sugerindo que fontes difusas, dentre elas esgoto não tratado, contribuem para o aporte nos mananciais analisados (PESSOA et al., 2012).

Até o momento, nenhum estudo teve o propósito de verificar a contaminação por micotoxinas estrogênicas em águas superficiais no Brasil. Nesse contexto, o objetivo desta parte da tese foi avaliar as concentrações de micotoxinas estrogênicas (ZEN e seus metabólitos), considerando as variações espaciais e sazonais em águas superficiais, tendo como estudo de caso o Córrego Rico entre as cidades de Monte Alto-SP e Jaboticabal-SP.

4.2 Materiais e métodos

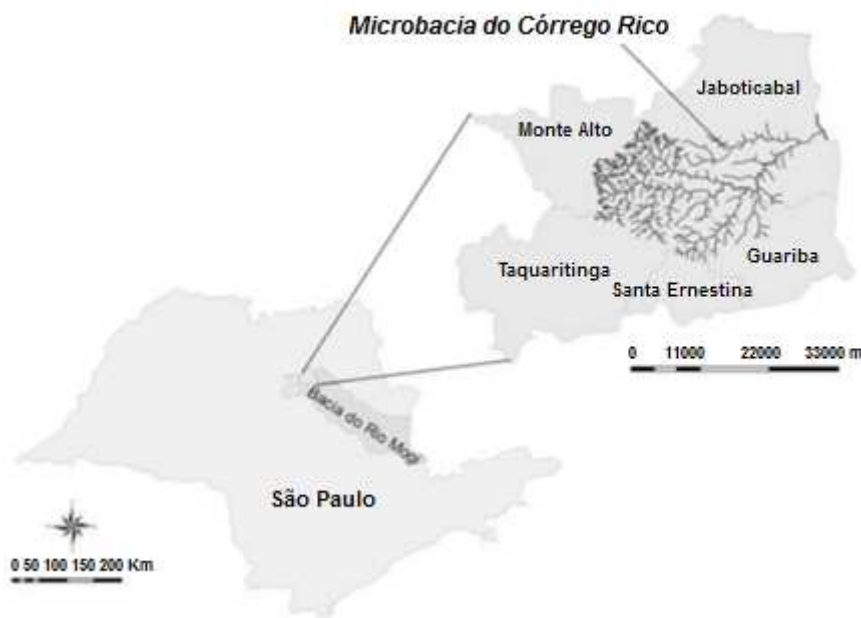
4.2.1 Área de estudo

A área de desenvolvimento deste trabalho está inserida na Bacia Hidrográfica do Rio Mogi Guaçu, constituindo-se em parte da microbacia hidrográfica do Córrego Rico (Figura 28), que está localizada na 7ª Zona Hidrográfica do Estado e corresponde a 9ª Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos – UGRHI-9, e ocupa uma área de 76 km² com altitude média de 591 m. O córrego Rico é o principal manancial da microbacia, possuindo aproximadamente 24 km de extensão, onde deságuam 13 afluentes principais, somando um total de 59,2 km de extensão em cursos d'água (PEREIRA, 2010). Por sua alta representatividade na região, o

Córrego Rico, se destaca por ser a principal fonte de água superficial para o abastecimento de água para a cidade de Jaboticabal-SP (75.820 habitantes), sendo relevante esse corpo d'água para a região, visto que os efeitos antrópicos neste sistema ocorrem de forma direta ou indireta, provavelmente em função do lançamento do efluente da estação de tratamento de esgoto doméstico do município de Monte Alto e da criação de animais (aves, suínos e bovinos) (ZANINI et al., 2010).

O clima da região é classificado como Cwa (classificação climática de Köppen), do tipo subtropical, com inverno seco e chuvas no verão. Tem precipitação entre 24,8 mm a 254,9 mm anuais e temperaturas médias mínimas e máximas do ar de 16,9 °C a 29,7 °C anuais, respectivamente. O trimestre mais chuvoso é o primeiro (janeiro, fevereiro e março), com 628,8 mm, equivalentes a 44,2% do total anual, e o trimestre menos chuvoso é o terceiro (julho, agosto e setembro), com 116,2 mm, equivalentes a 8,2% do total anual, e a 18,5% do trimestre mais chuvoso (CENTRO DE PESQUISAS METEOROLÓGICAS E CLIMÁTICAS APLICADAS À AGRICULTURA, 2016).

Figura 28 - Localização da microbacia hidrográfica do córrego Rico, Estado de São Paulo

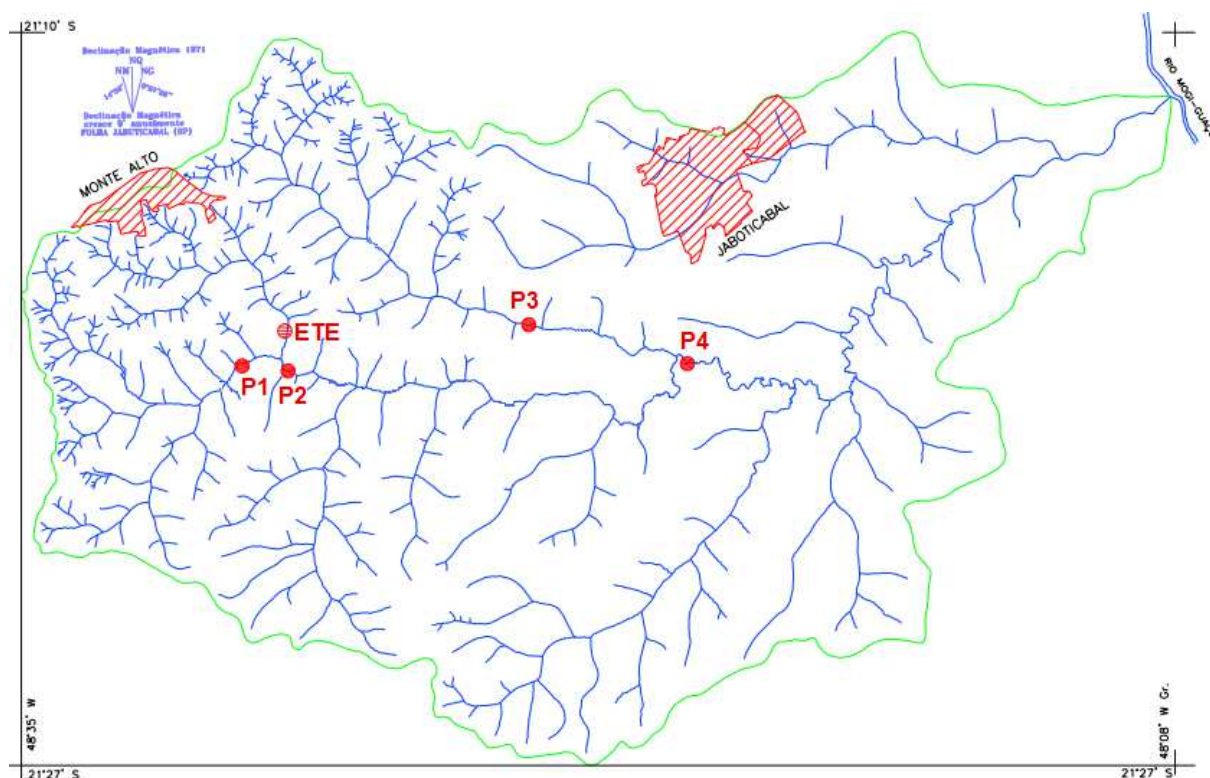


Fonte: Adaptado de Zanini (2009).

4.2.2 Amostragem e preparo de amostras

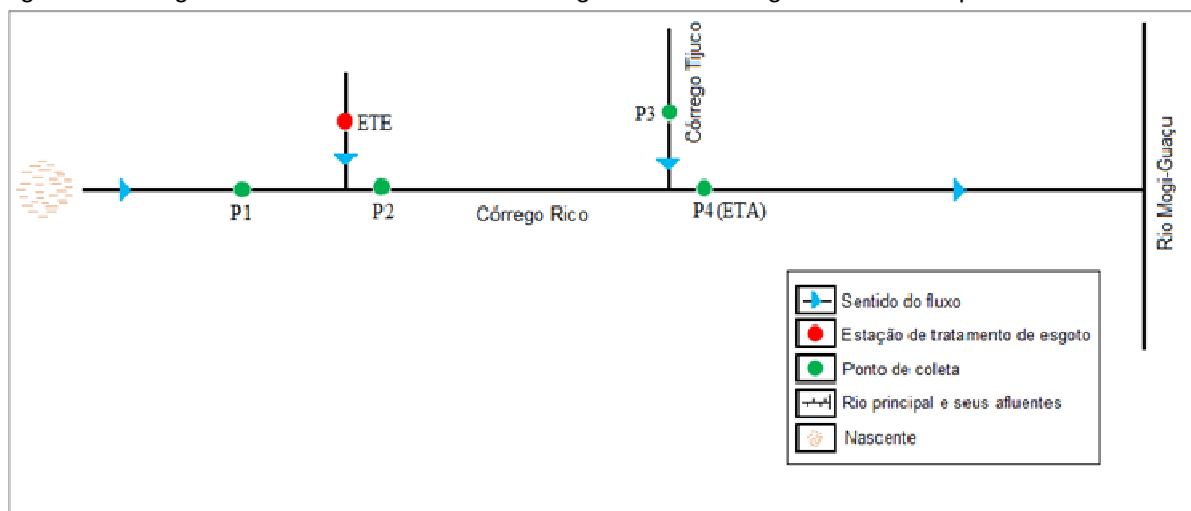
Dez campanhas de amostragem foram realizadas entre outubro de 2014 e julho de 2015, em três diferentes trechos do Córrego Rico e um do Córrego Tijucu, entre as cidades de Monte Alto-SP e Jaboticabal-SP. Nestas datas, as coletas foram realizadas em horários fixos para cada ponto, a fim de impedir a interferência da variação horária da composição do esgoto lançado no córrego, quando for o caso, na comparação entre períodos (seca e chuva). Os trechos selecionados estavam localizados a montante e a jusante da entrada de esgoto e da barragem para captação de água (Figuras 29, 30 e 31; Tabela 17).

Figura 29 - Microbacia hidrográfica do Córrego Rico com os pontos de coleta



Fonte: Adaptado de Pissarra (2002).

Figura 30 - Diagrama unifilar da microbacia hidrográfica do Córrego Rico com os pontos de coleta



Fonte: o autor.

Tabela 17 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta da microbacia hidrográfica do Córrego Rico (Figura 30)

Ponto	Latitude	Longitude	Descrição
P1	21°18'37,26"S	48°27'39,49"O	À jusante de uma área de várzea e a montante da ETE de Monte Alto
P2	21°18'46,08"S	48°26'56,33"O	À jusante da ETE de Monte Alto
P3	21°17'56,08"S	48°22'31,69"O	No Córrego Tijuco a montante da captação de água da ETA de Jaboticabal
P4	21°18'36,07"S	48°19'26,11"O	No ponto de captação de água da ETA de Jaboticabal

Fonte: o autor.

Figura 31 - Fotos dos locais de amostragem na Microbacia hidrográfica do Córrego Rico



Fonte: o autor.

A seleção dos pontos de coleta se baseou no estudo realizado por Lopes et al., (2010) onde foi avaliada a presença de estrógenos naturais na microbacia hidrográfica do Córrego Rico. Inferindo-se que as fontes de contaminação (pontuais ou difusas) das micotoxinas estrogênicas se assemelham aos estrógenos nessa região, foram escolhidos pontos de amostragem utilizados no estudo citado.

No ponto de coleta, os frascos amostradores foram enxaguados com a água do manancial e, então foram tomados 500 mL de amostra em frasco de vidro âmbar com tampa rosqueável, para cada ponto de amostragem. As amostras foram transportadas até o laboratório do IQ-UNESP em caixa isotérmica contendo gelo reciclável e armazenadas sob refrigeração a 4°C até o momento da extração e concentração dos analitos. As análises foram realizadas em no máximo 48 h após a coleta.

4.2.3 Reagentes e padrões

Os padrões das micotoxinas estrogênicas ZEN, ZAN, α -ZAL, β -ZAL, α -ZEL e β -ZEL foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA), com pureza superior a 98%. O padrão interno (IS) zearalenona-d₆ (ZEN-d₆) foi obtido da Toronto Research Chemicals (North York, ON, Canadá). Os solventes orgânicos metanol (MeOH), acetonitrila (ACN), todos grau HPLC, foram adquiridos da JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). Bromociclohexano foi obtido da Alfa Aesar (MA, EUA). O hidróxido de sódio e ácido clorídrico (HCl, 37% m/v) foram comprados da JT Baker (Phillipsburg, NJ, EUA) e foram usados para ajustar o pH das amostras de água. A água deionizada utilizada no sistema de HPLC e dissolução de reagentes foi obtida por um sistema de de purificação Milli-Q (Millipore, EUA).

4.2.4 Tratamento das amostras

O tratamento da amostra consistiu na filtração em membrana de fibra de vidro (Macherey-Nagel GF3) com 0,6 μ m (diâmetro do poro). Após filtração, o pH das amostras de água foi ajustado (pH 4), utilizando-se ácido clorídrico (0,1 mol L⁻¹) e fortificada com 80 μ L do padrão interno (ZEN-d₆) a 200 ng L⁻¹ para avaliar o rendimento da extração de ZEN e seus metabólitos. Posteriormente, a técnica

utilizada na extração dos analitos nas amostras foi a DLLME, de acordo com o procedimento descrito na seção 2.23.

4.2.5 Análise cromatográfica e quantificação dos analitos

A detecção e quantificação dos analitos foram realizadas utilizando um cromatógrafo Agilent 1200 LC acoplado com um espectrômetro de massa híbrido QTRAP 3200 (LC-MS/MS) da Applied Biosystems/MDS Sciex Instruments com fonte de ionização por eletrospray (ESI). As condições cromatográficas do sistema LC-MS/MS estão descritas na seção 2.24.

A quantificação dos compostos foi realizada por meio de padronização interna, empregando-se uma curva analítica com oito diferentes valores de concentração: 8; 16; 40; 80; 160; 320, 480 e 680 ng L⁻¹. Para cada ponto da curva analítica realizou-se a extração dos analitos por DLLME previamente à análise cromatográfica. A curva analítica foi obtida a partir da média dos valores das áreas dos picos cromatográficos para três determinações.

A confiabilidade analítica do procedimento de extração foi avaliada por meio de quatro análises por amostragem: branco dos reagentes (água ultrapura), branco de campo (água ultrapura foi transportada para campo em um recipiente adequado e passou pelas mesmas etapas que a amostra, ou seja, manuseada no equipamento de coleta, armazenada em uma garrafa de vidro, transportada nas mesmas condições e, por fim, analisada como se fosse uma amostra), água ultrapura enriquecida com os analitos (320 ng L⁻¹) e amostra de água de rio enriquecida com os analitos (320 ng L⁻¹). O branco de campo foi empregado para determinar se houve alguma contaminação durante amostragem e o branco dos reagentes está relacionado ao controle de possíveis interferentes durante o preparo das amostras em laboratório.

4.2.6 Análises físico-químicas e microbiológicas

Para complementar as avaliações das concentrações das micotoxinas estrogênicas, foram realizadas determinações de *Escherichia coli*, carbono orgânico total, DQO, DBO, fósforo total, nitrato, nitrito, nitrogênio total, nitrogênio amoniacal total, sólidos dissolvidos totais, potássio e turbidez (AMERICAN PUBLIC HEALTH

ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION, 2012). Esses parâmetros foram selecionados para expressar tanto a qualidade de água, quanto para auxiliar na identificação da fonte das micotoxinas seja por efluente de ETE, despejo de esgoto doméstico ou drenagem de áreas de agricultura.

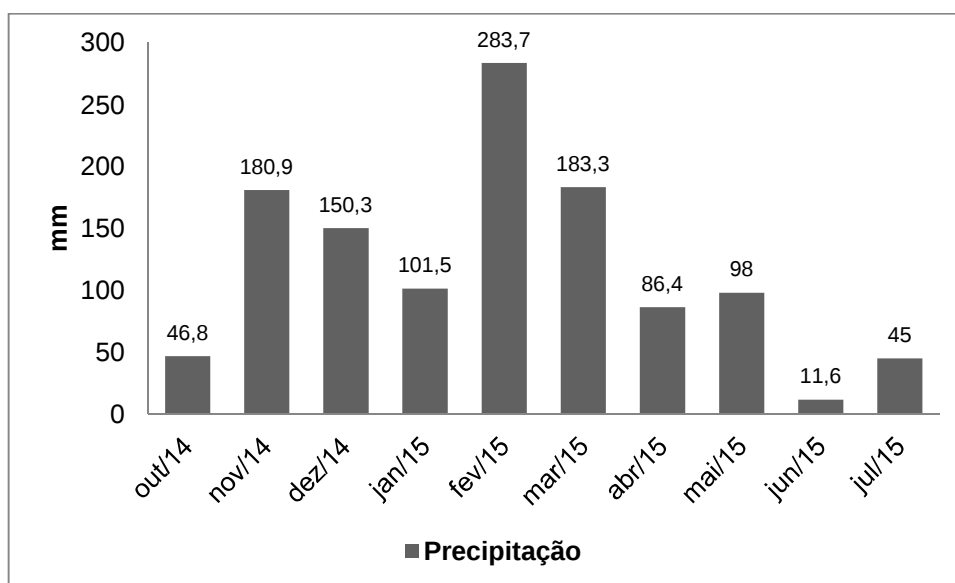
Para os parâmetros físico-químicos e microbiológicos as amostras de água foram analisadas pela empresa Venturo Análises Ambientais Ltda., localizada em Araraquara-SP. Os resultados desses parâmetros foram interpretados segundo a legislação para águas naturais, expressos pela Resolução CONAMA 357/2005 (Água doce - classe 2) (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2005).

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Ocorrência das micotoxinas estrogênicas e variáveis hidrológicas na microbacia do Córrego Rico

O período de amostragem foi caracterizado por uma estação seca (abril a outubro) e chuvosa (novembro a março) de acordo com os dados da estação agroclimatológica do Departamento de Ciências Exatas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP de Jaboticabal (Figura 32).

Figura 32 - Precipitação acumulada mensal durante o período de realização das coletas na região da bacia hidrográfica do Córrego Rico



Fonte: Adaptado de Universidade Estadual Paulista (2016).

Os resultados obtidos para as coletas do período de amostragem (outubro de 2014 a julho de 2015) estão expressos na Tabela 18. Os valores de recuperações do surrogate (ZEN-d₆) variaram de 71 % a 124 %, sendo assim, o método por DLLME tem confiabilidade para as quantificações dos analitos presentes nas amostras de água.

Todos os analitos foram detectados pelo menos uma vez entre os pontos amostrais e o período avaliado. A ZEN teve maior frequência na detecção (52,5 %), seguido por α -ZAL (12,5 %), β -ZAL (5,0 %), ZAN (5,0 %), α -ZEL (2,5 %), e β -ZEL (2,5 %). Um total de 47,5 % das amostras apresentavam concentrações acima do limite de quantificação variando de 10,6 a 59,5 ng L⁻¹ em que todos os analitos foram quantificados pelo menos uma vez em um dos pontos amostrais no período de amostragem. Dos seis analitos, a ZEN foi determinada em todos os pontos amostrais em cinco das campanhas de amostragem. Os níveis mais elevados deste composto foram determinados nos pontos durante o período de maior pluviosidade. Assim como, a maioria dos metabólitos de ZEN foi detectada no período chuvoso. Os compostos β -ZAL, α -ZAL e ZAN foram quantificados apenas uma vez, sendo que, α -ZEL e β -ZEL não apresentaram concentrações acima do LOQ (Tabela 18).

Tabela 18 - Concentrações das micotoxinas estrogênicas (ng L⁻¹) na microbacia do Córrego Rico. Para ZEN-d₆ recuperações médias (n=3)

Analito	out/14				nov/14			
	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
β-ZAL	nd	nd	nd	nd	48,0	nd	nd	nd
β-ZEL	nd	<40,0**	nd	nd	nd	nd	nd	nd
α-ZAL	nd	nd	nd	nd	<20,0**	<20,0**	27,3	<20,0**
α-ZEL	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ZAN	nd	nd	nd	nd	<8,0**	nd	nd	nd
ZEN-d ₆ *	112	108	107	106	107	96	76	91
ZEN	<8,0**	<8,0**	<8,0**	<8,0**	<8,0**	<8,0**	<8,0**	<8,0**
Analito	dez/14				jan/15			
	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
β-ZAL	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
β-ZEL	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
α-ZAL	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
α-ZEL	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ZAN	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ZEN-d ₆ *	89	80	91	93	112	81	74	77
ZEN	nd	nd	nd	nd	21,7	28,8	25,4	27,0
Analito	fev/15				mar/15			
	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
β-ZAL	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
β-ZEL	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
α-ZAL	nd	nd	nd	nd	<20,0**	nd	nd	nd
α-ZEL	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ZAN	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ZEN-d ₆ *	118	105	97	97	73	71	115	100
ZEN	nd	nd	nd	nd	59,5	45,5	50,6	41,9
Analito	abr/15				mai/15			
	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
β-ZAL	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
β-ZEL	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
α-ZAL	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
α-ZEL	nd	nd	nd	nd	<20,0**	nd	nd	nd
ZAN	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ZEN-d ₆ *	91	81	73	78	114	124	101	127
ZEN	nd	nd	nd	nd	18,8	nd	nd	nd
Analito	jun/15				jul/15			
	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
β-ZAL	nd	nd	<40,0**	nd	nd	nd	nd	nd
β-ZEL	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
α-ZAL	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
α-ZEL	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ZAN	nd	nd	18,1	nd	nd	nd	nd	nd
ZEN-d ₆ *	117	119	119	88	102	103	98	88
ZEN	13,8	12,5	10,6	<8,0**	nd	nd	nd	nd

ZEN-d₆* - fortificado a 200 ng L⁻¹

** < limite de quantificação

nd – não detectado

Fonte: o autor.

Os resultados obtidos nesse trabalho são comparáveis aos obtidos por outros pesquisadores. Nesses estudos, a frequência de detecção para a ZEN está na faixa de 0 a 30 % e difere entre as estações do ano na amostragem (GROMADZKA et al., 2009; HARTMANN et al, 2008b; KOLPIN et al., 2014; MARAGOS, 2012). As maiores concentrações de ZEN (até 96 ng L⁻¹) foram detectadas em pequenos córregos ou canais próximos a campos agrícolas com culturas contaminadas por *Fusarium sp.* (BUCHELI et al, 2008;. GROMADZKA et al., 2009; KOLPIN et al., 2014). Concentrações mais baixas (de não detectado a baixos níveis de ng L⁻¹) foram encontrados em rios e lagos (LAGANA et al, 2004; BUCHELI et al, 2008; GROMADZKA v., 2009; KOLPIN et al., 2010; MARAGOS, 2012). Em estudos realizados por Gromadzka et al. (2009) e Waśkiewicz et al. (2012), as concentrações de ZEN em rios (Polônia) foram investigados durante um ano e os valores variaram de LOD (0,3 ng L⁻¹) a 44 ng L⁻¹, dependendo da época de amostragem. Os valores mais elevados foram detectados durante o verão e no início do outono após a colheita de culturas agrícolas. Os metabólitos β -ZAL e α -ZAL foram investigados em dois rios contaminados por efluentes de ETE (LAGANA et al., 2004). A concentração máxima de qualquer um dos compostos foi de 3 ng L⁻¹. Concentrações de dois outros metabólitos β -ZEL e α -ZEL foram investigados em córregos agrícolas e também a montante e jusante de ETE em Nova York, EUA (KOLPIN et al., 2014). As concentrações de α -ZEL e β -ZEL nos campos agrícolas foram geralmente abaixo do LOD, mas as concentrações máximas detectadas destes compostos atingiram dezenas ou mesmo centenas de ng L⁻¹ (KOLPIN et al., 2014). Em suma, os níveis detectados das micotoxinas estrogênicas em rios, córregos e canais de drenagem ocorreram geralmente em níveis de dezenas de ng L⁻¹. No entanto, concentrações muito mais elevadas foram relatadas ocasionalmente (um único estudo), como a detecção de centenas de ng L⁻¹ de α -ZEL e β -ZEL em córregos próximos a áreas agrícolas ou em um ponto que recebe efluentes da ETE, em Nova Iorque (KOLPIN et al., 2014).

Os resultados obtidos para os parâmetros físicos, químicos e microbiológicos nos pontos amostrais (Apêndice A) mostram que as variáveis *Escherichia coli* (dezembro, janeiro, fevereiro, março, abril, maio, junho e julho), DBO (outubro e janeiro), fósforo total (outubro, novembro, dezembro, janeiro, março, abril, e julho), nitrato (abril), nitrito (dezembro) e nitrogênio amoniacal total (outubro) ultrapassaram

os valores estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005 (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2005) para rio de classe 2.

A maioria das variáveis hidrológicas foi antagônica entre o período de seca e chuva, ou seja, aumento da turbidez, sólidos dissolvidos totais, potássio e fósforo total em período de chuva e redução em período de seca, mostrando indícios da lixiviação desses dois últimos constituintes. Destaca-se que no início do período chuvoso (novembro/2014; 180,9 mm), houve redução na concentração da série nitrogenada, caracterizando a diluição dessas variáveis no córrego.

De acordo com os resultados desses parâmetros (Apêndice A), observa-se incremento das concentrações de fósforo total, potássio, sólidos totais dissolvidos e turbidez no período chuvoso, característica do deflúvio pluvial e consequente transporte das partículas finas do solo para o corpo d'água. Para a série nitrogenada houve aumento da concentração com o agravamento da seca em outubro/2014. Supõe-se que a alta concentração de nitrogênio amoniacal (ponto P2 - 42 mg L⁻¹) nesse período, tenha sido originada de lançamentos pontuais de esgotos domésticos das propriedades rurais presentes em torno do córrego.

O indicador de contaminação fecal (*Escherichia coli*) ultrapassa o limite de 1000 UFC/100 mL da amostra (valor máximo permitido) em todos os meses, com exceção de outubro e novembro/2014, para todo o período do estudo (seco e chuvoso). Estes resultados indicam que o córrego sofre grande influência antropogênica, provavelmente relacionada a uso e ocupação do solo desta bacia, uma vez que, a microbacia do Córrego Rico apresenta atualmente sérios problemas de degradação ambiental, sendo caracterizada por ocupação de fins residenciais e rural, com grande desmatamento em seu entorno e a falta de manejo adequado dos dejetos da criação de animais que contaminam toda a rede de drenagem. Almeida, Petersen e Cordeiro (2001) destacaram em seus estudos, que no meio rural a qualidade das águas superficiais de consumo humano está diretamente relacionada com a forma de ocupação do solo, à transformação de ecossistemas naturais equilibrados em áreas de plantação e fertilizantes e à falta de tratamento dos dejetos animais e humanos nestas propriedades.

Para as variáveis hidrológicas, o trecho onde ocorreram as maiores alterações na qualidade da água foi o ponto P2 (seis variáveis com quatorze valores acima da legislação CONAMA). Esse ponto amostral é caracterizado pelo deságue de afluentes que drenam a área urbana do município de Monte Alto e localizado a

jusante da descarga de efluente da ETE de Monte Alto (ponto que recebe maior aporte de contaminações pontuais dentre os outros). Para esse ponto, houve maiores concentrações para a maioria dos parâmetros hidrológicos durante todo o período de amostragem, destacando-se fósforo total, nitrito, sólidos dissolvidos totais e potássio.

A maior frequência e/ou concentrações das micotoxinas estrogênicas foram observadas nos meses de novembro/2014, janeiro/2015 e março/2015. Nesse período elevadas concentrações de fósforo total, DBO, *Escherichia coli* foram obtidas para os pontos amostrais excedendo os valores estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005. Esse comportamento pode estar relacionado a fontes de contaminações difusas em que as águas de escoamento superficial na época de chuvas podem carrear resíduos da criação de animais contaminados com as micotoxinas ou por drenagem de solos agrícolas que usam de excrementos de animais como adubo.

A ocupação e o uso do solo na parcela do município de Monte Alto na área da microbacia hidrográfica do Córrego Rico consistem em pequenas propriedades com exploração diversificada, podendo-se encontrar, conforme observações em campo durante o período de amostragem, horticultura, suinocultura (em destaque) e diversas culturas agrícolas (destacando-se cana-de-açúcar em maior escala e amendoim). Também foi notória a presença de irrigação mecanizada de culturas agrícolas tanto no período seco quanto no período chuvoso. De acordo com D'Águila et al. (2000), a ocupação e uso do solo pelas atividades agropecuárias são fatores que contribuem direta e indiretamente na contaminação dos corpos hídricos, e alteram sensivelmente os processos biológicos, físicos e químicos dos sistemas naturais. Esses fatores podem se expressar com maior relevância na degradação da qualidade da água quando aliados à falta ou ineficácia de sua utilização, as formas de proteção do solo e de reservatórios e ao deflúvio superficial.

A partir desses fatores supracitados, pode-se inferir que a presença das micotoxinas na região do Córrego Rico pode ser devida aos lançamentos de efluente da ETE de Monte Alto, despejos de esgotos domésticos das propriedades rurais em torno do córrego. A contaminação do córrego a partir de culturas agrícolas contaminadas por fungos é pouco provável, uma vez que o plantio de milho (lavoura temporária) na região é insignificante.

4.3.2 Relevância ambiental dos resultados obtidos

Para a avaliação da atividade estrogênica em amostras aquosas, os resultados podem ser expressos em atividade equivalente comparada a uma substância referência, no caso o hormônio natural 17- β -estradiol (JAROŠOVÁ et al., 2014). A contribuição potencial de cada micotoxina estrogênica para a atividade estrogênica total das águas superficiais estudadas foi calculada de acordo com a equação:

$$cEEQ = \text{concentração da micotoxina estrogênica} \times RP \quad \text{Eq.: 4}$$

onde, cEEQ é a concentração equivalente estrogênica calculada ao hormônio natural 17- β -estradiol e RP é a potência estrogênica relativa do composto de interesse em um determinado bioensaio *in vitro* (JAROŠOVÁ et al., 2014).

Para a caracterização mais representativa da contribuição global das micotoxinas estrogênicas individuais para cEEQ, as concentrações (Tabela 18) de cada analito foram multiplicadas pela média geométrica de seu RP, que se utiliza como uma medida da potência em ensaios *in vitro* para cada composto (Tabela 19).

Tabela 19 - Concentrações das micotoxinas estrogênicas a partir da microbacia hidrográfica do Córrego Rico, suas correspondentes cEEQ e potência estrogênica relativa. Os cEEQs foram calculadas multiplicando-se as concentrações dos analitos e suas potências relativas

Micotoxinas	Faixa de concentração (ng L ⁻¹)	cEEQ (valor médio) ¹ (ng L ⁻¹)	Faixa cEEQ ² (ng L ⁻¹)	RP
ZEN	nd-59,5	<0,06-0,47	<0,02-4,99	7,87 × 10 ⁻³
ZAN	nd-19,1	<0,06-0,34	<0,04-3,11	1,76 × 10 ⁻²
α -ZAL	nd-27,3	<1,04-1,42	<0,37-4,72	5,20 × 10 ⁻²
β -ZAL	nd-48,0	<0,86-1,02	<0,18-2,16	2,14 × 10 ⁻²
α -ZEL	não quantificado	-	-	4,75 × 10 ⁻¹
β -ZEL	não quantificado	-	-	2,25 × 10 ⁻³

¹ cEEQs médios foram calculados a partir das concentrações das micotoxinas individuais multiplicadas pela média geométrica da potência relativa (RP) estrogênica dessa micotoxina a partir de diferentes sistemas *in vitro*

² a faixa de cEEQs foram calculadas a partir das concentrações (mínimo e máximo) das micotoxinas multiplicados pelas RPs mínima e máxima dessa micotoxina a partir de diferentes sistemas *in vitro*.

nd – não detectado

Fonte: o autor e adaptado de Jarošová et al. (2015)

As concentrações relatadas nesse estudo para as micotoxinas estrogênicas (n.d-59,5 ng L⁻¹) são similares (ordem de magnitude) e por vezes maiores em relação aos estudos internacionais em águas naturais (Tabela 20). Nesses estudos as principais fontes de contaminação das micotoxinas são áreas de agricultura (trigo e milho) e o deságue de efluentes de ETE nas águas fluviais. Áreas de criação de animais próximas aos rios não foram avaliados em grande parte dos estudos internacionais. As maiores concentrações determinadas para as micotoxinas ZEN, α -ZEL, β -ZEL foram relatadas por Kolpin et al. (2014) alcançando inéditas três ordens de magnitude (n.d-817 ng L⁻¹). Os autores concluíram que houve grande relevância para concentrações maiores desses compostos nos rios que recebem efluente proveniente de ETE com menor grau de contaminação em áreas de cultivo de plantações de milho e trigo contaminadas com os fungos produtores das micotoxinas estrogênicas.

Os valores calculados da cEEQ a partir das concentrações obtidas dos analitos variaram de <0,06 a 1,42 ng L⁻¹ (valor médio) (Tabela 19). Os maiores valores de cEEQ (valor médio) foram calculados para α -ZAL, uma vez que, esse composto entre as micotoxinas quantificadas que apresenta a maior potência estrogênica relativa, mesmo considerando-se que a concentração máxima calculada nas amostras foi menor que as obtidas para ZEN. A cEEQ para as micotoxinas estrogênicas nesse estudo (Tabela 19) foram superiores aos relatados internacionalmente em águas naturais (<0,002-0,34 ng L⁻¹) (Tabela 20) com exceção do estudo realizado por Kolpin et al. (2014), no qual o maior valor de cEEQ calculado foi para o α -ZEL. Uma vez que esse composto apresenta a maior potência estrogênica relativa (Tabela 19) entre as micotoxinas estrogênicas.

Especificamente no caso de ZEN, alguns efeitos adversos *in vivo* têm sido detectados com concentrações comparáveis às relatadas nesse estudo. Em concentrações entre 2 e 50 ng L⁻¹ (menor concentração efetiva observável - LOEC) para ZEN há ativação de genes que regulam o crescimento e reprodução de peixes (*Pimephales promelas*) (JAROŠOVÁ et al., 2015).

Ressalta-se que as concentrações de ZEN relatadas em águas de drenagem, córregos e alguns rios (Tabela 4) foram maiores ou comparáveis a LOEC de estudos *in vivo* (peixes). Além disso, alguns dos metabólitos de ZEN ocorrem em concentrações ainda mais elevadas e pode ser ainda mais potentes. Isso indica que

os metabólitos da ZEN podem contribuir ou mesmo representar risco para a biota aquática em locais contaminados.

Tabela 20 - Concentrações de micotoxinas estrogênicas detectadas em águas superficiais e cEEQ

Substâncias	Tipo de amostra	Local, características	Concentrações (ng L ⁻¹)	cEEQ (valor médio) (ng L ⁻¹)	Referência
α-ZEL	Água fluvial	Alemanha, amostra coletada a montante do lançamento do efluente de ETE	Água fluvial <10	<4,75	Pawlowski et al. (2004)
ZEN, α-ZAL, β-ZAL	Água fluvial	Itália, amostra coletada a montante do lançamento do efluente de ETE	Água fluvial 2-5 (ZEN); n.d-3 (α-ZAL); n.d-3 (β-ZAL)	<0,02-0,16	Lagana et al. (2004)
ZEN	Água fluvial	Suíça, áreas de cultivo de trigo e milho no entorno do rio	n.d-35	<0,01-0,28	Bucheli et al. (2008)
ZEN	Água fluvial, água de drenagem e água subterrânea	Polônia, amostras coletadas entorno de áreas agrícolas (trigo) e florestais	Água fluvial 1,4-43,7 Água subterrânea <LOD-0,5 Água de drenagem 7,6-12,3	<0,002-0,34	Gromadzka et al. (2009)
ZEN, α-ZEL, β-ZEL	Água fluvial e água de drenagem	Suíça, área de pastagem e cultivo de trigo e milho no entorno do rio	< LOQ (ZEN) para água fluvial e drenagem LOQ = 6 ng L ⁻¹	<0,05	Schenzel, Schwarzenbach e Bucheli (2010)
ZEN	Córregos fluviais	Estados Unidos, áreas de cultivo de soja e milho e criação de animais no entorno do córrego	n.d-8	<0,01-0,06	Kolpin et al. (2010)
ZEN, α-ZEL, β-ZEL	Córregos fluviais	Estados Unidos, áreas de cultivo de milho e lançamento do efluente de ETE no entorno do córrego	n.d-843	<0,05-388,08	Kolpin et al. (2014)

n.d – não detectado

Fonte: o autor.

4.4 Conclusão

Nesse estudo pode-se concluir que as micotoxinas estrogênicas estão presentes ao longo da microbacia hidrográfica do Córrego Rico, sendo que, as vias de aporte desses compostos seriam o deflúvio superficial de resíduos da criação de animais, drenagem de solos agrícolas que usam excrementos de animais como adubo, lançamentos de efluente da ETE de Monte Alto ou lançamentos de esgotos domésticos não tratados das propriedades rurais em torno do córrego. As concentrações quantificáveis (10,6 a 59,5 ng L⁻¹) são similares aos estudos efetuados em outros países em regiões que sofrem influência tanto de áreas agrícolas, criação de animais em torno de águas fluviais, assim como corpos d'água que recebem efluentes de ETE. Na literatura, os efeitos sobre a biota aquática (LOEC) para essas substâncias, são relatados para concentrações a partir de 2 ng L⁻¹, sugerindo que os organismos vivos que habitam o Córrego Rico podem estar suscetíveis a alterações das funções endócrinas.

Portanto, os dados obtidos apontam para a necessidade de aprofundamento de estudos ambientais visando gerar informações sobre o aporte de micotoxinas estrogênicas no ambiente em locais sob a influência de excrementos de animais e esgoto não tratado. Assim como o aperfeiçoamento dos sistemas de tratamento e disposição de resíduos provenientes da criação de animais e pequeno, médio e grande porte.

**CAPÍTULO 5 – FOTODEGRADAÇÃO DE ZEARALENONA EM AMOSTRAS
AQUOSAS SOB RADIAÇÃO SOLAR SIMULADA**

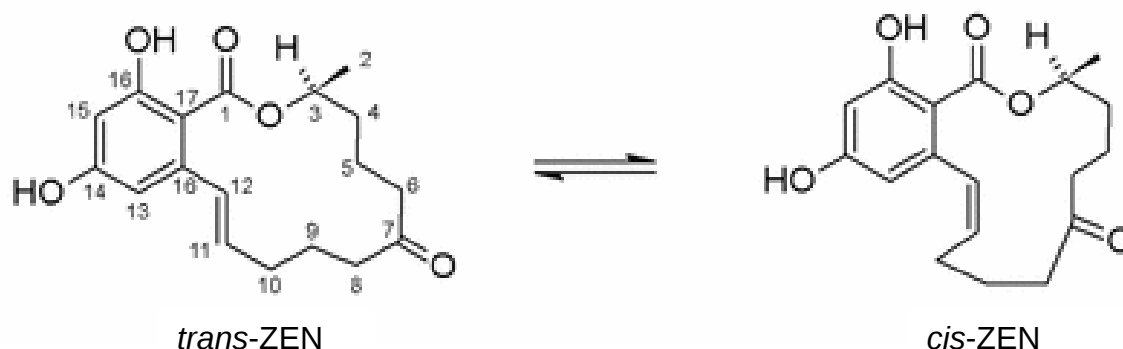
5.1 Introdução

Entre os vários processos de degradação ambiental (abióticos/bióticos), a fotodegradação pela luz solar é um dos fatores mais importantes para determinar o destino de contaminantes em ambientes aquáticos (CHOWDHURY; CHARPENTIER; RAY, 2011). Como a ZEN absorve na região espectral de espectro ultravioleta (230-360 nm) (LI et al., 2015), supõe-se que a fotólise direta pode ter um papel importante para a fotodegradação de ZEN em ambientes aquáticos, uma vez que a fotólise direta é possível apenas se o contaminante de interesse absorve a luz na faixa do UV-visível (290 a 750 nm) (CHOWDHURY; CHARPENTIER; RAY, 2010).

A fototransformação sob radiação solar ou a degradação de compostos orgânicos em ambientes aquáticos podem ocorrer por fotólise direta ou indireta. A fotólise direta ocorre devido à absorção de fótons pela substância e depende tanto da taxa de absorção de luz e do rendimento quântico de reação (CHOWDHURY; CHARPENTIER; RAY, 2010). Por outro lado, a fotólise indireta ocorre por meio da absorção de luz por fotossensibilizadores, sendo os mais importantes, a matéria orgânica dissolvida (DOM), íons nitrato ou nitrito, os complexos orgânicos com íons Fe (III) e Fe (II) (ZHAN et al., 2009). Fotossensibilizadores no estado excitado geram oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), radicais OH ($^{\bullet}\text{OH}$), radicais peróxido derivados da DOM ($\text{ROO}^{\bullet}$), DOM no estado tripleto ($^3\text{DOM}^*$) e outros fotorreagentes que podem reagir com os compostos de interesse e, portanto, influenciar o seu destino ambiental, persistência e risco ecológico em água naturais (LIN; REINHARD, 2005).

Embora muitas vezes ignorada, a ZEN pode ocorrer em duas configurações. A dupla ligação entre o carbono C_{11} e C_{12} pode isomerizar a partir da configuração trans para a configuração cis (Figura 33) (DRZYMALA et al., 2014). O isômero cis-ZEN tem sido descrito em óleos alimentares, grãos e milho. A isomerização ocorre em elevado grau sob luz solar, mas a razão cis/trans pode variar consideravelmente, dependendo das condições ambientais (BREZINA et al., 2013 e KÖPPEN et al., 2012). Devido à limitação analítica, dados sobre sua incidência são escassos e um estudo preliminar de avaliação de risco nunca foi realizado. Recentemente, Drzymala et al. (2015) compararam a estrogenicidade de onze metabólitos da ZEN, utilizando o ensaio E-Screen. Os resultados demonstram que uma mudança na configuração de trans para cis mantém a atividade estrogênica significativamente.

Figura 33 - Estruturas químicas da *trans*-ZEN e da *cis*-ZEN



Fonte: Adaptado de Brezina et al. (2013).

O objetivo deste estudo foi determinar a cinética de fototransformação da ZEN em águas naturais e compreender os efeitos dos constituintes dessas águas em sua fotólise. Atualmente, o comportamento fotoquímico e especialmente a contribuição da fotólise para a degradação da ZEN em água não têm sido estudados.

Esse estudo foi realizado no Grupo de Química Analítica e Ambiental do Departamento de Química da Universidade de Aveiro/Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) sob orientação do Prof. Valdemar Inocêncio Esteves e supervisão científica da Dra. Vânia Calisto no período de setembro de 2015 a fevereiro de 2016 sob suporte financeiro e bolsa de estudos do programa CNPq/Ciências sem Fronteiras – Processo nº 233160/2014-0.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Reagentes

O padrão analítico da ZEN (Fórmula empírica: $C_{18}H_{22}O_5$, número de registro CAS: 17924-92-4) foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) com pureza superior a 99%. Metanol (MeOH) para análise por HPLC foi adquirido da Fisher Scientific (Otava, Ontário, Canadá) e Tropic Marin® (sal sintético da água do mar) obtido da Marinus Inc., Long Beach, CA. Todos os outros reagentes utilizados para as soluções aquosas foram de qualidade P.A. Água deionizada foi obtida a partir de um sistema de purificação de Millipore (Milli-Q Plus 185). A partir do padrão sólido de ZEN foi preparado uma solução estoque em água deionizada com concentração de $2,8 \text{ mg L}^{-1}$. A solução foi armazenada a 4°C em frascos protegidos da luz para evitar

qualquer processo de fotodegradação. As amostras de água de trabalho foram preparadas por adição da solução estoque em água deionizada ou em águas naturais.

5.2.2 Amostras de água

Amostras de águas superficiais (Figura 34) foram coletadas em outubro de 2015, em garrafas de vidro de 1 L, previamente lavadas com solução de detergente alcalino diluído (5 %), água destilada, acetona e enxaguada com a água natural imediatamente antes de sua coleta. Todas as amostras foram filtradas através de filtro de membrana de PVDF 0,22 μm (Red Analytical, UK) para remover quaisquer partículas e microorganismos e, por fim, armazenadas protegidas da luz a 4 °C. As amostras de água foram utilizadas em um período menor que 14 dias. Uma das amostras foi coletada a partir da “Ria de Aveiro”, estuário localizado no centro urbano da cidade de Aveiro, Portugal (Cais da Fonte Nova, Ria de Aveiro, Aveiro, Portugal). A segunda amostra de água foi coletada no Rio “Novo do Príncipe” (localizado em uma área agrícola rural de Aveiro, Portugal). Os parâmetros de salinidade, pH, carbono total (TC), carbono inorgânico (IC), carbono orgânico dissolvido (DOC) e ferro total foram determinados para as amostras de água.

Figura 34 - Fotos dos locais de amostragem em Aveiro, Portugal. (A) Rio Novo do Príncipe; (B) Cais da Fonte Nova (Ria de Aveiro)



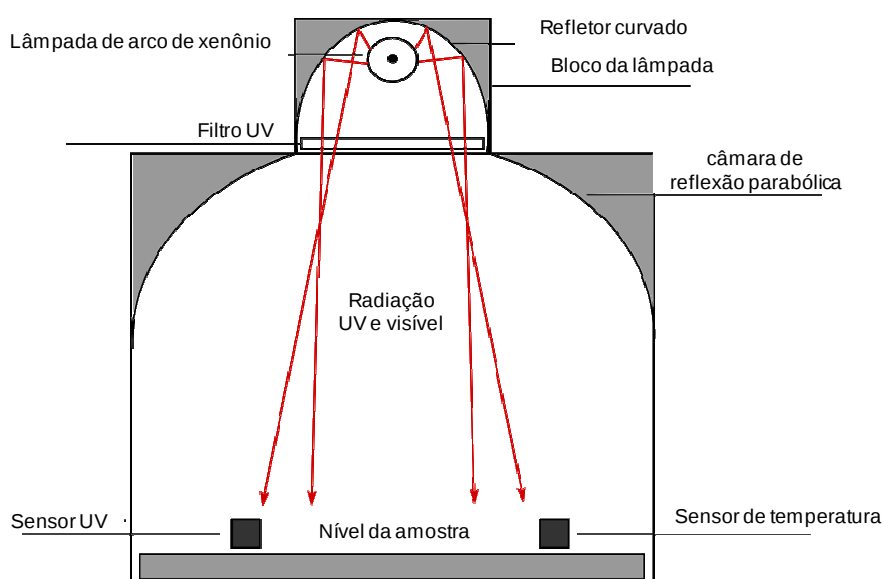
Fonte: o autor.

5.2.3 Experimentos de irradiação

5.2.3.1 Simulador de radiação solar

Os experimentos de fotodegradação foram realizadas sob radiação solar simulada utilizando um Solarbox 1500 (Co.fo.me.gra, Milano, Itália) (Figura 35), equipado com uma lâmpada de xenônio 1500 W e filtros UV que limitam a transmissão de luz com comprimentos de onda abaixo de 290 nm. Durante o experimento de irradiação, a irradiação da lâmpada foi mantida constante a 55 W m^{-2} (290-400 nm), o que corresponde a 550 W m^{-2} em todo o espectro UV-VIS (290-800 nm). Um multímetro (Co.fo.me.gra, Itália), equipado com um sensor de temperatura e de UV (290-400 nm) foi usado para monitorar os níveis de irradiância e temperatura. O dispositivo foi refrigerado por um sistema de ar e a uniformidade de irradiação foi garantida por um refletor parabólico. As irradiações foram realizadas utilizando tubos de quartzo (diâmetro interno de 1,5 cm e altura de 20 cm), distribuídos em um suporte com ângulo de 45° em relação ao eixo horizontal. Uma representação esquemática do simulador de irradiação solar é mostrada na Figura 35.

Figura 35 - Representação esquemática do simulador de irradiação solar (visão lateral) utilizado nas experiências de fotodegradação (Solarbox 1500, Co.fo.me.gra, Itália)



5.2.3.2 Cinética da fototransformação

As amostras irradiadas consistiram em soluções aquosas com uma concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ para a ZEN. As soluções de trabalho de ZEN foram irradiadas em triplicata usando tubos de quartzo (diâmetro interno de 1,5 cm e altura de 20 cm) com volume de 25 mL. Para cada conjunto de experimentos, um grupo controle (tubos foram cobertos com papel alumínio) foi realizado em triplicata. Os tubos de quartzo foram ajustados dentro da câmara de irradiação usando um suporte metálico de fabricação caseira, garantindo que as amostras fossem irradiadas homogeneamente.

Inicialmente, os experimentos da cinética de fototransformação foram realizados para água deionizada, água de rio e água estuarina. Aos tubos de quartzo (para as amostras e controles) foi adicionado um volume de 15 mL de solução aquosa. Alíquotas (1 mL) foram recolhidas entre 0 e 180 min (água de rio e água estuarina), e entre 0 e 1680 min (água deionizada).

Outros experimentos de irradiação foram realizados, avaliando a presença separadamente de possíveis constituintes de águas naturais que influenciem a fototransformação da ZEN. Todos os experimentos foram realizados em solução aquosa (água ultrapura) com NaCl, íons Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , NO_3^- e oxalato, água do mar artificial, complexos Fe(III)-oxalato e Mg^{2+} -oxalato, ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e fração XAD-4. As substâncias húmicas foram utilizadas para simular a matéria orgânica natural dissolvida. Uma solução de tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$ – pH 7,3) foi adicionada aos constituintes acima citados a fim de eliminar o efeito do pH, exceto na presença de ácidos húmicos (HA), ácidos fúlvicos (FA) e fração XAD-4. A mesma solução tampão fosfato também foi avaliada separadamente sem adição de qualquer constituinte, a qual serviu como um branco dos testes. O tempo de irradiação foi avaliado entre 0 e 180 min.

As alíquotas foram armazenadas a 4°C (refrigeração) até a análise por HPLC. Os dados cinéticos experimentais foram ajustados em um modelo de cinética de pseudo primeira ordem por análise de regressão não linear: $C(t) = C_0 e^{-kt}$, onde C_0 e $C(t)$ são as concentrações de ZEN no tempo zero e o tempo de reação t em minutos, k é a constante da velocidade de transformação de pseudo primeira ordem (min^{-1}), e a meia-vida de ZEN foi determinada por $t_{1/2} = \ln 2 \times k^{-1}$. O programa GraphPad Prism 5[®] foi utilizado na análise estatística.

5.2.4 Métodos analíticos

5.2.4.1 Determinação de ZEN por HPLC

A análise quantitativa de ZEN foi realizada pelo sistema Shimadzu Prominence HPLC (Kyoto, Japan) equipado com um desgaseificador em linha DGU-20A5, forno da coluna CTO-10ASVP, detector UV-Vis SPD-20A e detector de fluorescência RF-20A XS. A separação foi realizada com uma coluna analítica ACE[®] C18-PFP (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) acoplada a uma pré-coluna ACE[®] C18 com 4,6 mm (diâmetro interno). A fase móvel foi constituída por uma mistura de MeOH e água deionizada (75:25), com vazão da coluna de 0,5 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. As fases móveis foram filtradas através de filtros de membrana de poliamida (0,2 µm) (Whatman Inc., EUA). A detecção foi realizada utilizando fluorescência, com comprimentos de onda de 275 nm e 460 nm para excitação e emissão, respectivamente. A temperatura da coluna foi de 30 °C, e a temperatura da célula de fluxo do detector de 35 °C.

A curva analítica foi obtida com sete concentrações do padrão de ZEN (5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 µg L⁻¹) em água ultrapura e cada nível foi analisado em triplicata. O limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) para a ZEN foram determinados utilizando as equações $3.3 \times (S_{y/x})/m$ e $10 \times (S_{y/x})/m$, respectivamente, onde $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva analítica e m é o coeficiente angular da reta (ERMER, 2001). A curva analítica foi linear para ZEN na faixa de 10-150 µg L⁻¹ ($r = 0,999$), enquanto que o LOD e LOQ foi de 9 µg L⁻¹ e 27 µg L⁻¹, respectivamente.

5.2.4.2 Outras análises

As concentrações de carbono total (TC) e carbono inorgânico (IC) foram determinados utilizando um analisador Shimadzu TOC-CVSP. O teor de carbono orgânico dissolvido (DOC) das amostras foi calculado como a diferença entre o TC e IC. O pH foi medido usando um aparelho de medição de pH Ecoscan, EUTECH. Instruments (Singapura). A concentração de ferro total foi determinada utilizando um espectrômetro de absorção atômica AAnalyst 100 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA).

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Fototransformação em água ultrapura

A fototransformação da ZEN foi investigada em água ultrapura (deionizada), sob irradiação da solução durante 28 h (1680 min). No grupo controle, não foi observada nenhuma transformação expressiva de ZEN, indicando que os processos microbiológicos, térmicas e hidrolíticos foram insignificantes durante as experiências de fotólise. Assim, assumiu-se que a diminuição da concentração foi devida apenas ao processo de fotólise.

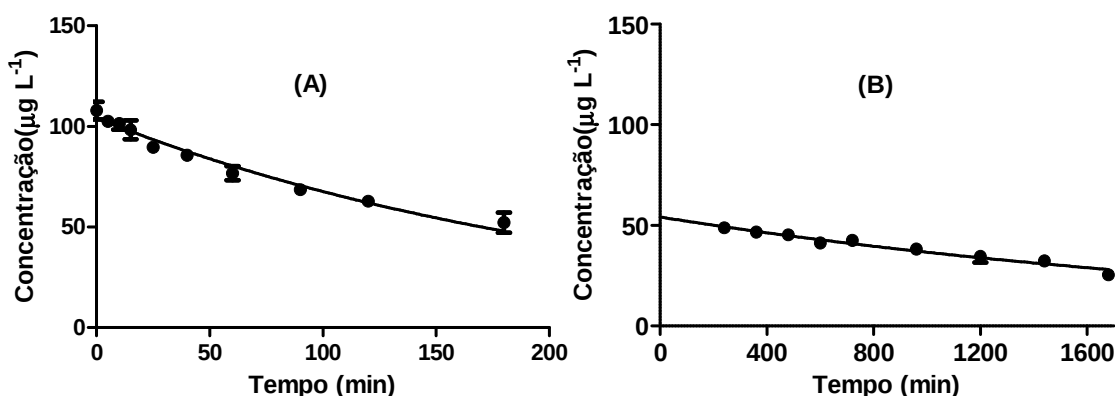
Os resultados obtidos desse experimento permitiram identificar a ocorrência de dois fenômenos de fototransformação: (1) conversão de trans-ZEN para cis-ZEN; (2) fototransformação de trans-ZEN e de cis-ZEN. Durante o período inicial da irradiação, a diminuição de trans-ZEN foi acompanhada por um aumento de cis-ZEN (área do pico de cis-ZEN nos cromatogramas). A área do pico de cis-ZEN alcançou um máximo até 180 min do tempo de irradiação, correspondendo a 50,2% de transformação da trans-ZEN. Após 180 min do tempo de irradiação, observou-se uma diminuição de trans-ZEN e cis-ZEN. A representação gráfica da concentração de trans-ZEN ao longo da irradiação (Figura 36) permite identificar de que os dois fenômenos descritos acima resultam em dois processos cinéticos diferentes: a primeira parte da cinética é atribuída à fotoisomerização trans/cis, enquanto que a segunda parte da cinética está relacionada à fotodegradação de trans-ZEN (e também pela fotodegradação de cis-ZEN). Por conseguinte, os dados experimentais de irradiação da fototransformação de trans-ZEN foram divididos em duas partes (de 0 a 180 min e de 180 min a 1680 min) e cada parte foi ajustada ao modelo de cinética de pseudo primeira ordem. Os valores das constantes de velocidade (k) e R^2 foram $k = (4,3 \pm 0,6) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ e 0,977 (isomerização principalmente), $k = (3,9 \pm 0,7) \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ e 0,965 (degradação principalmente), respectivamente, nos quais evidenciam que o período de irradiação dominado por fotoisomerização tem uma constante de velocidade 10 vezes maior do que o período subsequente, dominado por processos de fotodegradação.

Este comportamento (isomerização/degradação) é consistente com o estudo realizado por Köppen et al. (2012) em óleo de milho na determinação de ZEN. A trans-ZEN que ocorre naturalmente em alimentos foi convertida por irradiação

ultravioleta para a mais estável cis-ZEN. Assim, ambos os isômeros podem estar presentes. A cis-ZEN foi relatada em óleos alimentares e milho quando expostos a luz UV (UVA 315-380 nm) (BREZINA et al., 2013 e KÖPPEN et al., 2012).

O método de HPLC utilizado (descrito na seção 4.2.4.1) separa trans-ZEN e cis-ZEN ($t_R = 8,03$ min e $t_R = 8,62$ min, respectivamente). Apesar da detecção dos dois isômeros durante a irradiação, outros produtos secundários fluorescentes não foram detectados.

Figura 36 - Cinética de pseudo primeira ordem para fotoisomerização/degradação obtidas sob irradiação solar simulada em água ultrapura. (A) fotoisomerização de trans-ZEN a cis-ZEN. (B) Fotodegradação de trans-ZEN. Barras de erros referem-se ao desvio padrão absoluto ($n = 3$)



Fonte: o autor.

5.3.2 Fototransformação em águas naturais

Os testes foram conduzidos para amostras de águas naturais (rio e estuário). A Tabela 21 descreve algumas características físico-químicas destas águas naturais. A taxa de fototransformação da ZEN decresceu na seguinte ordem: água estuarina > água de rio > água ultrapura, ilustrando uma forte dependência da composição da matriz aquosa. Usando a mesma abordagem utilizada para amostras em água deionizada, assumiu-se que durante o tempo inicial de irradiação, 30 min e 15 min para a água do rio e da água do estuário, respectivamente, ocorreu principalmente a fotoisomerização seguido principalmente pela fotodegradação de trans-ZEN. Comparado com água ultrapura, as águas naturais contêm substâncias opticamente ativas, que são propensas a gerar algumas espécies ativas (por exemplo, $\bullet\text{OH}$ e $^1\text{O}_2$) contribuindo para a fototransformação de ZEN sob irradiação de luz solar.

Tabela 21 - Características físico-químicas das águas naturais estudadas

Amostra	pH	Salinidade (‰)	TC (mg L ⁻¹)	IC (mg L ⁻¹)	DOC (mg L ⁻¹)	Fe _{tot} (mg L ⁻¹)
Água estuarina (Ria de Aveiro)	7,3	23	33,7	29,3	4,4	b.q ^a
Rio Novo Príncipe	7,7	b.d ^b	8,0	4,8	3,2	b.q ^a

^a menor que o limite de quantificação (0,1 mg L⁻¹).

^b menor que o limite de detecção

Fonte: o autor.

Da mesma forma ao processo de fototransformação da ZEN em água ultrapura, os resultados foram divididos em dois processos cinéticos diferentes (isomerização e degradação). Em todos os casos, os processos de transformação foram adequadamente ajustados pelo modelo de cinética de pseudo primeira ordem (R^2 entre 0,985 e 0,995). Os parâmetros cinéticos estimados são apresentados na Tabela 22, enquanto que os gráficos da cinética de fototransformação da ZEN nas águas naturais avaliadas estão representados na Figura 37. Dentro do erro experimental não foi observada nenhuma transformação aparente de ZEN no grupo controle durante os experimentos.

Uma taxa mais rápida de transformação (fotoisomerização) nos primeiros 15 min (água de rio) e 30 min (água estuarina) de irradiação foi observada, seguido por uma taxa mais lenta de transformação até 180 min (fotodegradação). Ressalta-se que os gráficos A2 e B2 foram extrapolados entre os tempos de 45 min (água de rio) e 25 min (água estuarina) e os tempos iniciais, admitindo que neste intervalo de tempo a cinética de degradação será a mesma obtida depois dos mesmos. Embora a isomerização trans-cis esteja ocorrendo, a fotodegradação é a reação predominante (maior período) levando-se em conta o tempo total de irradiação avaliado.

Tabela 22 - Parâmetros da cinética de fototransformação da ZEN em três tipos de águas.

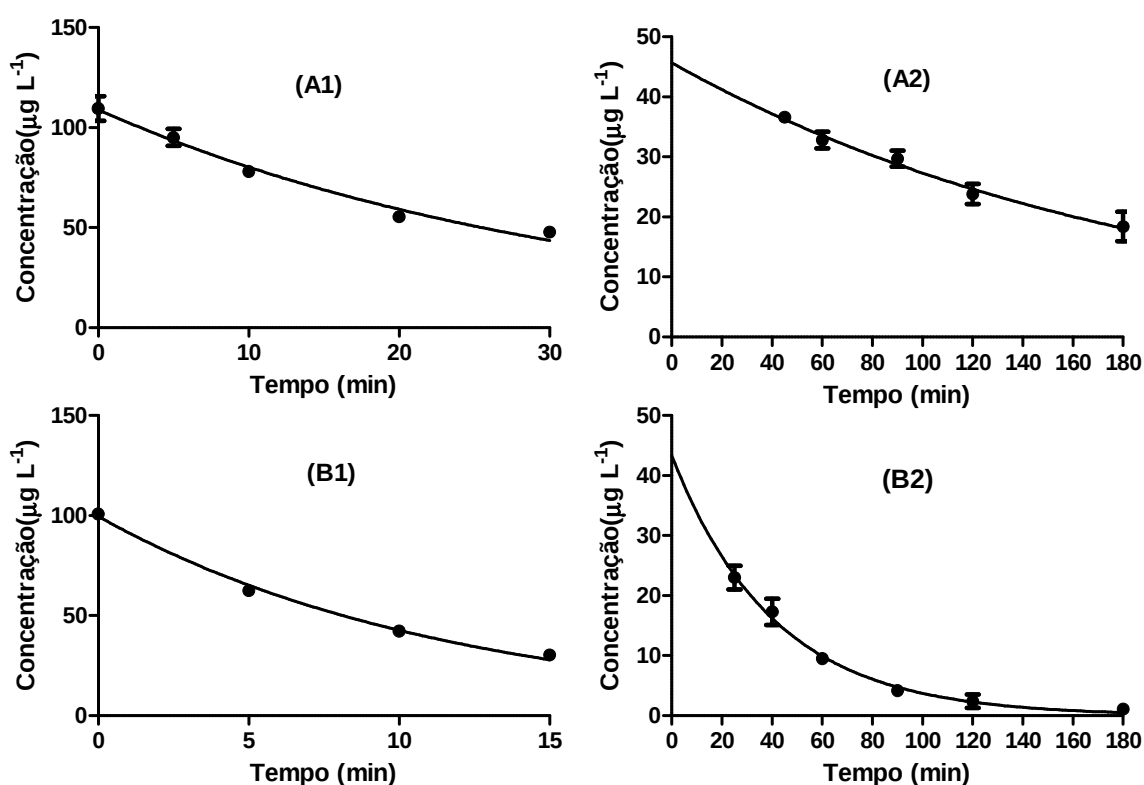
Amostra	R ²	k _{iso} (min ⁻¹)	k _{deg} (min ⁻¹)	t _{1/2} (min)	t _{1/2} (SSD)
Água ultrapura	0,965-0,977	(4,3 ± 0,6) × 10 ⁻³	(3,9 ± 0,7) × 10 ⁻⁴	1777,3 ± 412,3	7,8 ± 1,8
Água de rio	0,985-0,989	(3,0 ± 0,8) × 10 ⁻²	(5,1 ± 1,1) × 10 ⁻³	135,9 ± 21,0	0,6 ± 0,1
Água estuarina	0,994-0,995	(8,5 ± 2,1) × 10 ⁻²	(24,5 ± 4,2) × 10 ⁻³	28,3 ± 4,3	0,1 ± 0,02

SSD – dias ensolarados de verão

k_{iso} – constante de velocidade de isomerização; k_{deg} – constante de velocidade de degradação

Fonte: o autor.

Figura 37 - Curvas da cinética de pseudo primeira ordem de fotoisomerização/degradação obtidas sob irradiação solar simulada em águas naturais. (A1) fotoisomerização de trans- a cis-ZEN em água de rio. (A2) Fotodegradação de trans-ZEN na água do rio. (B1) fotoisomerização de trans- a cis-ZEN em água estuarina. (B2) Fotodegradação de trans-ZEN em água estuarina. Barras de erros referem-se ao desvio padrão absoluto (n = 3)



Fonte: o autor.

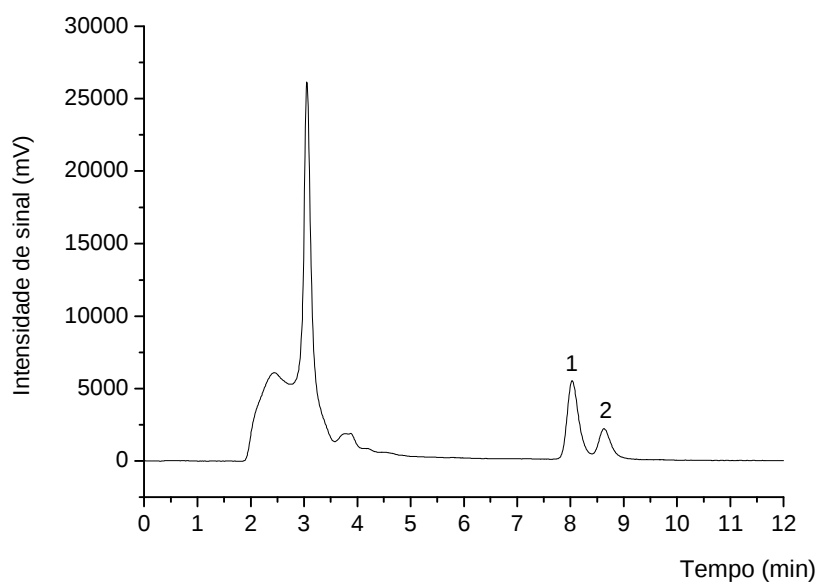
Os resultados indicaram que, após 1 h de tempo de irradiação, a remoção de ZEN foi de 30,6% (água deionizada), 69,4% (água de rio) e 90,8% (água estuarina), correspondendo aos tempos de meia-vida da fotodegradação de ZEN de 1777,3 ± 412,3 min, 135,9 ± 21,0 min e 28,3 ± 4,3 min, respectivamente. No entanto, esses tempos são estritamente dependentes das condições experimentais utilizadas

durante as experiências de irradiação (ou seja, nível de irradiância e espectro da lâmpada). Assim, a fim de transformar os resultados obtidos em dados com relevância ambiental, os tempos de meia-vida de ZEN foram convertidos em unidades equivalentes a dias ensolarados de verão (*summer sunny days* - SSD). Levando em consideração a energia total que atinge o solo em um dia ensolarado de verão sem nuvens (45 °N - latitude) é de $7,5 \cdot 10^5 \text{ J m}^{-2}$, um dia ensolarado de verão corresponderá a 3,8 h de irradiação (CALISTO; DOMINGUES; ESTEVES, 2011) e empregando esta conversão é possível determinar o tempo de meia-vida de ZEN em condições reais (Tabela 22).

A fototransformação mais rápida de ZEN nas duas águas naturais examinadas é devida principalmente a reações de oxidação desencadeadas pelas espécies reativas geradas por outras por meio da absorção de luz, tais como, substâncias húmicas, metais de transição, íons nitrato ou nitrito. Um estudo realizado por Qu, Kolodziej e Cwiertny (2012) relatou que metabólitos de ZEN (α -ZAL, β -ZAL e ZAN) exibem reatividade em soluções irradiadas com ácidos húmicos e fúlvicos, e velocidade da transformação da trans-ZEN para a fotólise indireta aumentou entre o pH 7 e 9. O radical hidroxila e estado tripleto da matéria orgânica dissolvida são responsáveis pela degradação de α -ZAL, β -ZAL e ZAN em meio neutro, embora o oxigênio singleto contribua em menor grau em águas mais alcalinas.

Estudos anteriores indicaram que alguns constituintes aquáticos (por exemplo, DOM, nitrato, bicarbonato e halogênios) podem afetar a fotólise de poluentes orgânicos (ZHOU et al., 2015). No entanto, ainda não está claro se a ZEN pode ser suscetível a esses ou outros fatores sob irradiação solar. Nesse sentido, na próxima etapa, foram realizados testes para avaliar as taxas de fototransformação da ZEN e a influência de alguns constituintes da água estuarina (para o qual foi observada maior taxa de transformação da ZEN) que podem acelerar ou retardar o processo fotolítico, de acordo com as propriedades físico-químicas determinadas nas águas naturais (Tabela 21). A Figura 38 apresenta um cromatograma típico da amostra de água de rio com a presença dos isômeros trans-ZEN e cis-ZEN obtido após irradiação solar simulada.

Figura 38 - Cromatograma obtido na fotólise de trans-ZEN em água de rio após 20 min de irradiação. Picos: 1: trans-ZEN; 2: cis-ZEN. Concentração inicial de trans-ZEN: $100 \mu\text{g L}^{-1}$



5.3.3 Efeitos de alguns constituintes em águas na fototransformação de ZEN

Os constituintes orgânicos e inorgânicos de águas naturais são frequentemente utilizados em experiências controladas com o objetivo de determinar os mecanismos específicos de fotólise indireta (nas quais as espécies fotossensibilizantes estão envolvidas) (CHALLIS et al., 2014). A Tabela 23 mostra os resultados na avaliação de diferentes constituintes aquosos presentes em águas naturais.

Tabela 23 - Parâmetros cinéticos de pseudo primeira ordem para a fototransformação de ZEN em diferentes soluções aquosas

Matriz	k, min ⁻¹	t _{1/2} , min	R ²
Água ultrapura	(4,3±0,6)×10 ⁻³	160,7±3,6	0,977
NaCl Salinidade (‰) = 23	(6,5±0,9)×10 ⁻³	106,7±18,1	0,983
Água do mar artificial Salinidade (‰) = 23	(39,4±17,2)×10 ⁻³	17,6±5,4	0,954
Tampão fosfato (0,01 mol L ⁻¹)	(5,7±1,0)×10 ⁻³	121,3±27,5	0,969
Ácidos fúlvicos (9 mg L ⁻¹)	(6,2±1,0)×10 ⁻³	110,9±24,5	0,975
XAD-4 (9 mg L ⁻¹)	(5,9±0,9)×10 ⁻³	117,7±24,0	0,978
Ácidos húmicos (9 mg L ⁻¹)	(5,5±0,7)×10 ⁻³	126,9±20,7	0,985
Ca ²⁺ (9,2 mg L ⁻¹)	(5,3±0,6)×10 ⁻³	129,7±21,2	0,985
Mg ²⁺ (24,1 mg L ⁻¹)	(7,6±1,2)×10 ⁻³	91,3±17,4	0,978
Fe ³⁺ (0,1 mg L ⁻¹)	(4,3±0,5)×10 ⁻³	161,3±26,4	0,983
NO ₃ ⁻ (0,7 mg L ⁻¹)	(4,6±0,5)×10 ⁻³	150,8±23,5	0,985
[Fe (III)]/[Oxalato] 0,4/6,0 (μmol L ⁻¹)	(11,3±1,7)×10 ⁻³	61,3±9,3	0,987
Oxalato 6,0 (μmol L ⁻¹)	(4,0±0,5)×10 ⁻³	172,1±25,4	0,977
[Mg ²⁺]/[Oxalato] 100/6,0 (μmol L ⁻¹)	(4,5±0,6)×10 ⁻³	154,5±33,2	0,984

Fonte: o autor.

A constante de velocidade de transformação da trans-ZEN variou de (4,0±0,5)×10⁻³ min⁻¹ a (39,4±17,2)×10⁻³ min⁻¹ com tempos de meia-vida entre 17,6±5,4 min e 172,1±25,4 min (Tabela 23), correspondendo a percentagens de fototransformação da trans-ZEN entre 43,5 % e 83,0 %. A isomerização da trans-ZEN a cis-ZEN também foi observada em todos os constituintes avaliados.

A velocidade de transformação da trans-ZEN foi muito mais elevada ($k = 39,4 \pm 17,2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2} = 17,6 \pm 5,4 \text{ min}$) em água do mar artificial por comparação com outros constituintes em água (Tabela 23), presumivelmente devido à presença de fotossensibilizadores naturais na água do mar. O tempo de meia-vida é ainda mais baixo do que o obtido com a água estuarina ($t_{1/2} = 28,3 \pm 4,3 \text{ min}$). A fotólise dos compostos de interesse na água do mar depende da formação e posterior reatividade dos intermediários reativos (fotólise indireta), tais como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$), estados tripleto da matéria orgânica natural dissolvida ($^3\text{DOM}^*$) e os radicais haleto ($\text{X}^\bullet$, $\text{X}_2^{\bullet-}$) (GROVER et al, 2014). Os compostos triclosan (ARANAMI; READMAN, 2007), carbofurano (CAMPBELL et al., 2004) e a carbamazepina (CHIRON; MINERO; VIONE, 2006) foram degradados em águas marinhas com maior percentual, em comparação com água de rio, nos quais, atribuídos à formação de radicais haleto. Housari et al. (2010) constataram que $\text{HO}^\bullet$, $^1\text{O}_2$, e cromóforos no estado tripleto da matéria orgânica natural dissolvida foram maiores em uma água estuarina em comparação com água de rio.

Além da água do mar artificial, a adição de $[\text{Fe(III)}]/[\text{Oxalato}]$ ($0,4/6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em água ultrapura resultou em um segundo maior aumento da taxa de transformação de ZEN (Tabela 23). Após 180 min do tempo de irradiação, resultou em 83 % de transformação da trans-ZEN. Em águas superficiais sob luz solar, reações fotoquímicas de complexos de oxalato e Fe (III) podem produzir Fe (II) e uma série de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{HO}_2^\bullet$, H_2O_2 e $\text{HO}^\bullet$. A produção resultante de radicais $\text{HO}^\bullet$ são muito importantes, pois podem oxidar várias substâncias orgânicas e inorgânicas naturais e antropogênicas (LIU et al., 2010). Por exemplo, o anel fenólico dos estrógenos naturais é uma estrutura química potencial da reação de radicais livres, que pode ser oxidado por ROS (ZHOU; WU; DENG, 2004).

O efeito dos íons oxalato e Fe^{3+} separadamente resultaram em tempos de meia-vida semelhantes aos obtidos em água ultrapura, confirmando-se assim que especificamente há interação entre Fe^{3+} e oxalato no aumento da velocidade de transformação de trans-ZEN. Observa-se também que a influência de outro cátion na presença de oxalato, como o Mg^{2+} não resultou no mesmo efeito de transformação. Neste caso e ao contrário do ferro, a transformação com Mg^{2+} -oxalato foi ainda mais lenta do que o efeito isolado de Mg^{2+} em solução.

Vale a pena notar que as taxas de transformação de trans-ZEN não apresentam diferenças expressivas na presença de frações diferentes da DOM (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e fração XAD-4) em comparação com outros constituintes em água (Tabela 23). Estes resultados estão de acordo com um estudo publicado por Qu, Kolodziej e Cwiertny (2012) em que os metabólitos de ZEN, a pH 7,0, a degradação do composto α -zearalanol foi observada em todas as soluções na presença de 5 mg L⁻¹ de DOM, com maior velocidade de degradação ($k = 0,214 \pm 0,009 \text{ h}^{-1}$, $t_{1/2} \sim 3 \text{ h}$) observada com ácido húmico extraído de solos, e para testes com luz solar simulada.

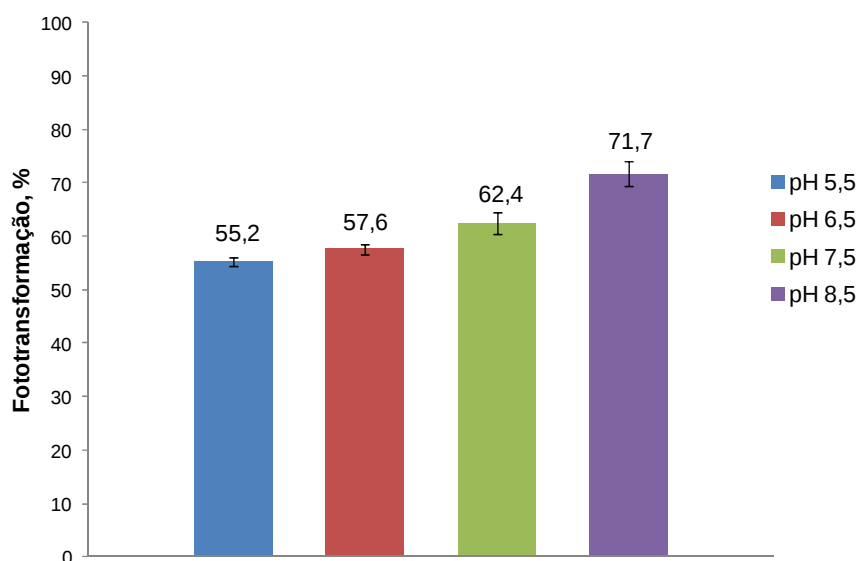
O comportamento da fototransformação observado para trans-ZEN pode, em parte, ser atribuído a minerais e compostos orgânicos dissolvidos em água salina, o que leva a um aumento cinético de degradação nesse processo. Outros constituintes não tiveram influência na constante de velocidade em relação à água ultrapura destacando-se os íons Fe(III), nitrato, oxalato e Mg²⁺-oxalato. Vale ressaltar que apesar do efeito de degradação expressivo em água salina e com a água do mar sintética, o teste com a solução com NaCl (salinidade = 23 ‰) não apresentou o mesmo efeito, ou seja, a salinidade não explica isoladamente o grande aumento da fotodegradação da água doce para a água salina. Assim como, a participação de outras espécies reativas que não foram investigadas aqui não pode ser descartada.

5.3.4 Influência do pH na fototransformação de ZEN

Em comparação com outros compostos fenólicos, pode-se presumir que a desprotonação da hidroxila fenólica da ZEN favorece uma degradação mais rápida do que o composto não ionizado (NEAMTU; FRIMMEL, 2006). Neste estudo, a fotólise da ZEN foi realizada em solução tampão fosfato (0,01 mol L⁻¹) em diferentes pH (5,5; 6,5; 7,5 e 8,5) durante 180 min de irradiação. Não houve quaisquer mudanças ou controle do pH durante o curso da irradiação. Após 180 min de irradiação o pH 5,5 e pH 8,5, ocorreu uma taxa de transformação de 55 e 72% para a trans-ZEN, respectivamente, que demonstram um aumento considerável na fototransformação quando o meio é mais básico. Isto é provavelmente devido ao fato que em meio alcalino os coeficientes de absorção molar da ZEN na forma ionizada são ligeiramente mais elevados do que em meio ácido (LI et al., 2015).

Como a ZEN tem um valor pK_{a1} de cerca de 7,6, ela existe predominantemente na forma não ionizada em meio ácido, ao passo que o ânion fenolato correspondente existe em solução a pH 7,0 (em equilíbrio com a forma protonada) e predomina a pH 9,0 (GAJEČKA et al., 2011). Consequentemente, tanto a forma protonada e o íon fenolato estão presentes em águas naturais. Os resultados obtidos para as experiências realizadas em diferentes valores de pH ambientalmente relevantes encontram-se resumidos na Figura 39.

Figura 39 - Efeito do pH na fototransformação de ZEN



Fonte: o autor.

Nota: Condições: tempo de irradiação, 180 min; $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de ZEN em tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$).

5.3.5 Determinação do rendimento quântico da ZEN para a fotólise direta

A eficiência de um processo de fototransformação pode ser expressa em termos de rendimento quântico (Φ), que é a relação entre o número total de moléculas do composto transformado em uma reação química por mols totais de fótons absorvidos (LEIFER, 1988). O rendimento quântico serve como um parâmetro de melhor avaliação da fotólise direta do que a constante de velocidade e o tempo de meia-vida. No entanto, poucos estudos tendem a medi-lo uma vez que sua determinação é mais complexa (CHALLIS et al., 2014).

O rendimento quântico de fotólise direta de ZEN foi determinado considerando uma média geral sobre a faixa de comprimento de onda de emissão da lâmpada (290-800 nm) e respectivas intensidades de emissão. Consequentemente, o

rendimento quântico médio da ZEN (ϕ_{ave}) foi calculado usando a equação (CALISTO; DOMINGUES; ESTEVES, 2011):

$$\phi_{ave} = \frac{C_0 \times k}{\sum I_{\lambda i}^0 \times (1 - 10^{-\epsilon_{\lambda i} \times l \times C_0})} \quad \text{Eq.: 5}$$

onde, k é a constante de velocidade de pseudo primeira ordem (s^{-1}), C_0 representa a concentração inicial de trans-ZEN em solução ($mol\ L^{-1}$), $I_{\lambda i}^0$ é a intensidade de emissão da lâmpada no comprimento de onda λi ($einstein\ L^{-1}\ s^{-1}$), ϵ é a coeficiente de absorção molar de trans-ZEN a λi ($L\ mol^{-1}\ cm^{-1}$) e b é o comprimento do percurso ótico no interior do fotorreator (cm) (diâmetro do fotorreator cilíndrico, 1,5 cm).

O espectro de emissão da lâmpada é apresentado no Apêndice B. Um rendimento quântico médio de $9,3 \times 10^{-5}$ foi obtido na faixa de comprimento de onda de 290-800 nm, em água deionizada e sob irradiação solar simulada. Não há na literatura dados do rendimento quântico sobre a fototransformação da ZEN.

5.3.6 Significância ambiental dos resultados

Esse estudo indicou que a trans-ZEN pode degradar significativamente na zona eufótica de águas superficiais. No entanto, a fototransformação no ambiente pode ser mais lenta devido a fatores tais como a turbidez e cor da água (o que iria reduzir a intensidade de luz solar, um efeito que é parcialmente eliminado pela filtragem das águas em estudo) e também devido à altura da coluna de água que também afeta significativamente a penetração da luz solar.

Os tempos de meia-vida medidos em águas naturais sugerem que a fototransformação é um processo de degradação potencialmente significativo para a trans-ZEN com valores dos tempos de meia-vida em condições ambientais reais (SSD) extremamente baixos, menor que 1 dia para água de rio e estuarina.

Os dados aqui apresentados não levam em conta a atenuação da luz na coluna de água e outros fatores específicos do local. No entanto, o efeito da fotodegradação de compostos de interesse deve ser considerada, especialmente em água cristalina superficial (onde há menor atenuação da luz solar) e sob irradiação de luz intensa.

Sob condições ambientais, a fotólise direta é esperada ser uma via menor para a transformação da trans-ZEN. Assim, a fotólise indireta deverá ser a principal via de

fototransformação e a persistência dependerá de fotossensibilizadores que estão presentes, tais como, a matéria orgânica dissolvida, sais de águas estuarinas ou complexos Fe (III)/oxalato.

Em um trabalho futuro, pretende-se investigar a identificação dos produtos de transformação da trans-ZEN, avaliar a cinética de degradação do cis-ZEN que é desconhecida, uma vez que aparentou ser o principal produto de transformação do trans-ZEN em condições ambientais. Considerar também os potenciais riscos ecotoxicológicos dos produtos de degradação associados à sua formação.

5.4 Conclusão

O presente estudo demonstrou que a fototransformação da ZEN em águas naturais (rio e estuário) por luz solar simulada é bastante rápida (com tempos de meia-vida, que vão desde 0,1 a 0,6 min para SSD). Na água de rio e água estuarina, a fotólise indireta é a principal responsável pela fototransformação da ZEN com a degradação maior quando comparado à água ultrapura. Em todos os testes avaliados nas amostras aquosas, a cis-ZEN foi o produto majoritário na fototransformação da trans-ZEN e que outros produtos fluorescentes não foram detectados. Uma avaliação preliminar dos constituintes de água ambientais, nos quais são os principais responsáveis por esta aceleração na fototransformação da trans-ZEN em águas fluviais e estuarinas revelaram um efeito sinérgico expressivo entre Fe (III) e oxalato (proporção 1:15). A fototransformação da trans-ZEN também foi significativamente acelerada na presença de sais de água do mar. No entanto, esta aceleração não pode ser explicada apenas pelo NaCl. Estudos adicionais são necessários para investigar os produtos de fototransformação da ZEN e de outros metabólitos, avaliando seus efeitos nos organismos que habitam em ambientes aquáticos contaminados. Vale ressaltar também que apesar de sua rápida degradação em águas naturais, também é relevante destacar o aporte continuado dessa substância tanto em áreas rurais ou urbanas, o que pode gerar uma rápida acumulação no ambiente, causando um desequilíbrio na biota aquática.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Este estudo forneceu ferramentas para a compreensão de um tema pouco explorado no país, no que tange às micotoxinas estrogênicas em ambientes aquáticos. O tema “Contaminantes Emergentes” tem chamado a atenção de inúmeros países, além de ter sido apontado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um problema real que demanda ações imediatas no conhecimento das fontes de emissão e controle ambiental dessas substâncias.

Os dados gerados permitiram conhecer os níveis de concentrações das micotoxinas estrogênicas na microbacia hidrográfica no Córrego Rico no estado de São Paulo, na qual há presença desses compostos em níveis comparáveis aos estudos internacionais e suscetíveis a alterações endócrinas na biota aquática. Os resultados podem servir de subsídios na elaboração de uma legislação ambiental que contemple a presença desses contaminantes emergentes/interferentes endócrinos, muito embora estudos complementares ainda sejam imperativos a fim de que se avaliem os riscos referentes à exposição crônica causada por eles, principalmente ao ser humano.

Os impactos ecotoxicológicos em longo prazo, exposição a baixos níveis de contaminantes naturais, tais como micotoxinas e/ou misturas de produtos químicos, incluindo estes compostos e a infinidade de outros contaminantes (por exemplo, pesticidas, hormônios e fármacos) que são conhecidos por serem também frequentemente presentes em rios ou córregos. No entanto, esses compostos são pouco avaliados em estudos ambientais. Assim, uma melhor compreensão da ocorrência espacial e temporal de contaminantes naturais é importante para avaliar potenciais impactos cumulativos de tais compostos e de misturas e seus efeitos sobre a biota aquática, bem como a sua presença potencial em fontes de água potável.

DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS QUÍMICOS GERADOS

Em virtude do desenvolvimento de métodos analíticos de acordo com os princípios da Química Verde, os resíduos gerados foram bastante reduzidos e de baixa toxicidade. Dentre esses resíduos, os mesmos foram armazenados em frascos devidamente identificados, seguindo os procedimentos preconizados nas Normas para Gerenciamento de Resíduos Químicos do IQ-UNESP (UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, 2002). Os resíduos serão mantidos no laboratório até o volume de 20 litros (bombona de plástico), depois serão transferidos para o Entrepasto de Resíduos do IQ/UNESP, de onde serão encaminhados para incineração por empresa autorizada pela CETESB ou reaproveitados pelo próprio Instituto.

REFERÊNCIAS

- AL HOUSARI, F.; VIONE, D.; CHIRON, S.; BARBATI, S. Reactive photoinduced species in estuarine waters. Characterization of hydroxyl radical, singlet oxygen and dissolved organic matter triplet state in natural oxidation processes. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 9, n. 1, p. 78-86, 2010.
- ALMEIDA, S. G. de; PETERSEN P.; CORDEIRO, A. **Crise socioambiental e conversão ecológica da agricultura brasileira**: subsídios à formulação de diretrizes ambientais para o desenvolvimento agrícola. Rio de Janeiro: AS-PTA, 2001. 122 p.
- AMARAL, K. A. S.; NASCIMENTO, G. B.; SEKIYAMA, B. L.; JANEIRO, V.; MACHINSKI JUNIOR, M. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 336-342, 2006.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard methods for examination of water and wastewater**. 22nd. Washington, DC, 2012. 1360 p.
- ARANAMI, K.; READMAN, J. W. Photolytic degradation of triclosan in freshwater and seawater. **Chemosphere**, v. 66, n. 6, p. 1052-1056, 2007.
- ARAUJO, P. W.; BRERETON, R. G. Experimentals designs II. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 15, n. 2, p. 63-70, 1996.
- ARROYO-MANZANARES, N.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; GÁMIZ-GRACIA, L. Multiclass mycotoxin analysis in *Silybum marianum* by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a procedure based on QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1282, p. 11-19, 2013.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. São Paulo: Ed. Unicamp, 2002. 401 p.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.
- BERGMAN, A.; HEINDEL, J. J.; JOBLING, S.; KIDD, K. A.; ZOELLER, R. T. **State of the science of endocrine disrupting chemicals-2012**. Geneva: United Nations Environment Programme; World Health Organization, 2013.
- BERTHOD, A.; RUIZ-ANGEL, M. J.; CARDA-BROCH S. Ionic liquids in separation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1/2, p. 6-18, 2008.
- BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes**. Boca Raton: Lewis Publishers, 2003. 295 p.

BREZINA, U.; KERSTEN, S.; VALENTA, H.; SPERFELD, P.; RIEDEL, J.; DANICKE, S. UV-induced cis-trans isomerization of zearalenone in contaminated maize. **Mycotoxin Research**, v. 29, n. 4, p. 221-227, 2013.

BRÜGGEMANN, L.; QUAPP, W.; WENNRICH, R. Test for non-linearity concerning linear calibrated chemical measurements. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 11, n. 12, p. 625-631, 2006.

BUCHELI, T. D.; ERBS, M.; HARTMANN, N.; VOGELGSANG, S.; WETTSTEIN, F. E.; FORRER, H. R. Estrogenic mycotoxins in the environment. **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, v. 96, n. 6, p. 386-403, 2005.

BUCHELI, T. D.; WETTSTEIN, F. E.; HARTMANN, N.; ERBS, M.; VOGELGSANG, S.; FORRER, H. R.; SCHWARZENBACH, R. P. *Fusarium* mycotoxins: overlooked aquatic micropollutants? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 1029-1034, 2008.

CALDAS, S. S.; COSTA, F. P.; PRIMEL, E. G. Validation of method for determination of different classes of pesticides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 665, n. 1, p. 55-62, 2010.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

CALISTO, V.; DOMINGUES, M. R. M.; ESTEVES, V. I. Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments e kinetics and photodegradation products. **Water Research**, v. 45, n. 18, p. 6097-6106, 2011.

CAMPBELL, S.; DAVID, M. D.; WOODWARD, L. A.; LI, Q. X. Persistence of carbofuran in marine sand and water. **Chemosphere**, v. 54, n. 8, p. 1155-1161, 2004.

CENTRO DE PESQUISAS METEOROLÓGICAS E CLIMÁTICAS APLICADAS À AGRICULTURA. **Clima dos municípios paulistas**. Campinas. Disponível em: <http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima_muni_279.html>. Acesso em: 01 fev. 2016.

CHALLIS, J. K.; HANSON, M. L.; FRIESEN, K. J.; WONG, C. S. A critical assessment of the photodegradation of pharmaceuticals in aquatic environments: defining our current understanding and identifying knowledge gaps. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 16, n. 4, p. 672-696, 2014.

CHEN, H.; CHEN, R.; LI, S. Low-density extraction solvent-based solvent terminated dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of carbamate pesticides in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 8, p. 1244-1248, 2010.

CHIRON, S.; MINERO, C.; VIONE, D. Photodegradation processes of the antiepileptic drug carbamazepine, relevant to estuarine waters. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 19, p. 5977-5983, 2006.

CHOWDHURY, R. R.; CHARPENTIER, P.; RAY, M. B. Photodegradation of estrone in solar irradiation. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 15, p. 6923-6930, 2010.

CHOWDHURY, R. R.; CHARPENTIER, P.; RAY, M. B. Photodegradation of 17 β -estradiol in aquatic solution under solar irradiation: kinetics and influencing water parameters. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 219, n. 1, p. 67-75, 2011.

COLBORN, T.; DUMANOSKI, D.; MYERS, J. P. **O futuro roubado**. Porto Alegre: L&PM, 1997. 354 p

COLDHAM, N. G.; DAVE, M.; SIVAPATHASUNDARAM, S.; McDONNELL, D. P.; CONNOR, C.; SAUER, M. J. Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, n. 7, p. 734-742, 1997.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Org.). **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Ed. Unicamp, 2006. 453 p.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução n. 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63.

CRIADO, M. V.; FERNÁNDEZ, P. V. E.; BADESSARI, A.; CABRAL, D. Conditions that regulate the growth of moulds inoculated into bottled mineral water. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 343-349, 2005.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por "eletrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.

DAMSTRA, T.; BARLOW, S.; BERGMAN, A.; KAVLOCK, R.; VAN DER KRAAK, G. (Ed.). **Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors**. Geneva: World Health Organization, 2002. 515 p. (International programme on chemical safety).

D'ORAZIO, G.; ASENSIO-RAMOS, M.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; FANALI, S.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. Estrogenic compounds determination in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction and micellar electrokinetic chromatography coupled to mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1344, p. 109-121, 2014.

DOEHLERT, D. H. Uniform shell designs. **Applied Statistics**, v. 19, n. 3, p. 231-239, 1970.

DOLL, S.; DANICKE, S. The *Fusarium* toxins deoxinivalenol (DON) and zearalenone (ZEN) in animal feeding. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, n. 2, p. 132-145 2011.

DORS, G. C.; BIERHALS, V. S.; BADIALE-FURLONG, E. Parboiled rice: chemical composition and the occurrence of mycotoxins. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 172-177, 2011.

DRZYMALA, S. S.; HERRMANN, A. J.; MAUL, R.; PFEIFER, D.; GARBE, L. A.; KOCH, M. In vitro phase I metabolism of cis-zearalenone. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, n. 11, p. 1972-1978, 2014.

DRZYMALA, S. S.; BINDER, J.; BRODEHL, A.; PENKERT, M.; ROSOWSKI, M.; GARBE, L. A.; KOCH, M. Estrogenicity of novel phase I and phase II metabolites of zearalenone and cis-zearalenone. **Toxicon**, v. 105, p. 10-12, 2015.

DUDZIAK, M. Analysis of zearalenone in aqueous environment using GC-MS. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 20, n. 1, p. 231-235, 2011.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: an integrated approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, n. 5/6, p. 755-767, 2001.

ESCRIVÁ, L.; FONT, G.; MANYES, L. In vivo toxicity studies of *Fusarium* mycotoxins in the last decade: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 78, p. 185-206, 2015.

FAN, Z.; HU, J.; AN, W.; YANG, M. Detection and occurrence of chlorinated byproducts of bisphenol a, nonylphenol, and estrogens in drinking water of china: comparison to the parent compounds. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 19, p. 10841-10850, 2013.

FERNANDEZ, M. A.; LIMAVERDE, A. M.; CASTRO, I. B.; ALMEIDA, A. C. M.; WAGENER, A. L. R. Occurrence of imposex in *Thais haemastoma*: possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, n. 2, p. 463-476, 2002.

FRENICH, A. G.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; GÓMEZ-PÉREZ, M. L.; VIDAL, J. L. M. Multi-mycotoxin analysis in eggs using a QuEChERS-based extraction procedure and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 28, p. 4349-4356, 2011.

FUNARI, C. S.; CARNEIRO, R. L.; ANDRADE, A. M.; HILDER, E. F.; CAVALHEIRO, A. J. Green chromatographic fingerprinting: an environmentally friendly approach for the development of separation methods for fingerprinting complex matrices. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 1/2, p. 37-44, 2014.

FUNK, W.; DAMMANN, V.; DONNEVERT, G. **Quality assurance in analytical chemistry**. Weinheim: VCH, 1995. 238 p.

FURLONG, E. B.; SOARES, L. M. V.; LASCA, C. C.; KOHARA, E. Y. Mycotoxins and fungi in wheat harvested during 1990 in test plots in the state of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v. 131, n. 3, p. 185-190, 1995.

GABER, Y.; TORNVALL, U.; KUMAR, M. A.; AMIN, M. A.; HATTI-KAUL, R. HPLC-EAT (Environmental Assessment Tool): a tool for profiling safety, health and environmental impacts of liquid chromatography methods. **Green Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 2021-2025, 2011.

GAJĘCKA, M.; JAKIMIUK, E.; SKORSKA-WYSZYŃSKA, E.; ZIELONKA, Ł.; POLAK, M.; PALUSZEWSKI, A.; RYBARCZYK, L.; GAJĘCKI, M. Influence of zearalenone micotoxicosis on selected immunological, hematological and biochemical indexes of blood plasma in bitches. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 7, n. 3, p. 175-180, 2004.

GAJĘCKA, M.; ZIELONKA, U.; ŁDABROWSKI, M.; GAJĘCKI, M. Threats resulting from the presence of zearalenone in water. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 67, n. 10, p. 643-646, 2011.

GAUJAC, A.; EMÍDIO, E. S.; NAVICKIENE, S.; FERREIRA, S. L. C.; DÓREA, H. S. Multivariate optimization of a solid phase microextraction-headspace procedure for the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in effluent samples from a waste treatment plant. **Journal of Chromatography A**, v. 1203, n. 1, p. 99-104, 2008.

GLOVER, C. M.; MEZYK, S. P.; LINDEN, K. G.; ROSARIO-ORTIZ, F. L. Photochemical degradation of corexit components in ocean water. **Chemosphere**, v. 111, p. 596-602, 2014.

GROMADZKA, K.; WASKIEWICZ, A.; CHELKOWSKI, J.; GOLINSKI, P. Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 2, p. 209-220, 2008.

GROMADZKA, K.; WASKIEWICZ, A.; GOLINSKI, P.; SWIETLIK, J. Occurrence of estrogenic mycotoxin - zearalenone in aqueous environmental samples with various NOM content. **Water Research**, v. 43, n. 4, p. 1051-1059, 2009.

GROMADZKA, K.; WAŚKIEWICZ, A.; ŚWIETLIK, J.; BOCIANOWSKI, J.; GOLIŃSKI, P. The role of wastewater treatment in reducing pollution of surface waters with zearalenone. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 66, n. 2, p. 159-164, 2015.

GUEVEL, L.; PAKDEL, F. Assessment of oestrogenic potency of chemicals used as growth promoter by in-vitro methods. **Human Reproduction**, v. 16, n. 5, p. 1030-1036, 2001.

GUO, L.; LEE, K. H. Low-density solvent based ultrasound-assisted emulsification microextraction and on-column derivatization combined with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of carbamate pesticides in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1235, p. 1-9, 2012.

HADJMOHAMMADI, M. R.; GHOREISHI, S. S. Determination of estrogens in water samples using dispersive liquid liquid microextraction and high performance liquid chromatography. **Acta Chimica Slovenica**, v. 58, n. 4, p. 765-771, 2011.

HARTMANN, N.; ERBS M.; WETTSTEIN, F. E.; SCHWARZENBACH, R. P.; BUCHELI, T. D. Quantification of estrogenic mycotoxins at the ng/L level in aqueous environmental samples using deuterated internal standards. **Journal of Chromatography A**, v. 1138, n. 1/2, p. 132-140, 2007.

HARTMANN, N.; ERBS, M.; WETTSTEIN, F. E.; HORGER, C. C.; VOGELGSANG, S.; FORRER, H. R.; SCHWARZENBACH, R. P.; BUCHELI, T. D. Environmental exposure to estrogenic and other myco- and phytotoxins. **Chimia**, v. 62, n. 5, p. 364-367, 2008a.

HARTMANN, N.; ERBS, M.; FORRER, H. R.; VOGELGSANG, S.; WETTSTEIN, F. E.; SCHWARZENBACH, R. P.; BUCHELI, T. D. Occurrence of zearalenone on *Fusarium graminearum* infected wheat and maize fields in crop organs, soil, and drainage water. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 15, p. 5455-5460, 2008b.

HARTMANN, N.; ERBS, M.; WETTSTEIN, F. E.; HOERGER, C. C.; SCHWARZENBACH, R. P.; BUCHELI, T. D. Quantification of zearalenone in various solid agroenvironmental samples using D₆-zearalenone as the internal standard. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 2926-2932, 2008c.

IHA, D. S. **Características limnológicas da bacia hidrográfica do córrego Rico, Jaboticabal, SP**. 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa nacional de saneamento básico 2008**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb2008/PNSB_2008.pdf>. Acesso em: 09 fev. 2016.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO/TR 13530: 1997**. Guide to analytical quality control for water analysis, Genève, 1997.

JAROSOVA, B.; BLÁHA, L.; GIESY, J. P.; HILSCHEROVÁ, K. What level of estrogenic activity determined by in vitro assays in municipal waste waters can be considered as safe? **Environment International**, v. 64, p. 98-109, 2014.

JAROSOVA, B.; JAVUREK, J.; ADAMOVSKY, O.; HILSCHEROVA, K. Phytoestrogens and mycoestrogens in surface waters-their sources, occurrence, and potential contribution to estrogenic activity. **Environment International**, v. 81, p. 26-44, 2015.

KINANI, S.; BOUCHONNET, S.; BOURCIER, S.; PORCHER, J. M.; AIT-AISSA, S. Study of the chemical derivatization of zearalenone and its metabolites for gas chromatography-mass spectrometry analysis of environmental samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1190, n. 1/2, p. 307-315, 2008.

KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. J.; MEYER, A. Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, n. 2, p. 435-445, 2002.

KOIFMAN, S.; PAUMGARTTEN, F. J. R. O impacto dos desreguladores endócrinos ambientais sobre a saúde pública. **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, n. 2, p. 354-355, 2002.

KOLPIN, D. W.; HOERGER, C. C.; MEYER, M. T.; WETTSTEIN, F. E.; HUBBARD, L. E.; BUCHELI, T. D. Phytoestrogens and mycotoxins in Iowa Streams: an examination of underinvestigated compounds in agricultural basins. **Journal of Environmental Quality**, v. 39, n. 6, p. 2089-2099, 2010.

KOLPIN, D. W.; SCHENZEL, J.; MEYER, M. T.; PHILLIPS, P. J.; HUBBARD, L. E.; SCOTT, T.-M.; BUCHELI, T. D. Mycotoxins: diffuse and point source contributions of natural contaminants of emerging concern to streams. **Science of the Total Environment**, v. 470-471, n. 1, p. 669-676, 2014.

KÖPPEN, R.; RIEDEL, J.; PROSKE, M.; DRZYMALA, S.; RASENKO, T.; DURMAZ, V.; WEBER, M.; KOCH, M. Photochemical trans-/cis-isomerization and quantitation of zearalenone in edible oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 47, p. 11733-11740, 2012.

KWAŚNIEWSKA, K.; GADZAŁA-KOPCIUCH, R.; CENDROWSKI, K. Analytical procedure for the determination of zearalenone in environmental and biological samples. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 119-130, 2015.

LAGANA, A.; FAGO, G.; MARINO, A.; SANTARELLI, D. Development of an analytical system for the simultaneous determination of anabolic macrocyclic lactones in aquatic environmental samples. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 15, n. 4, p. 304-310, 2001.

LAGANA, A.; BACALONI, A.; DE LEVA, I.; FABERI, A.; FAGO, G.; MARINO, A. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 501, n. 1, p. 79-88, 2004.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Paulo: Acta, 1993. 254 p.

LE GUEVEL, R.; PAKDEL, F. Assessment of oestrogenic potency of chemicals used as growth promoter by in-vitro methods. **Human Reproduction**, v. 16, n. 5, p. 1030-1036, 2001.

LEIFER, A. **The kinetics of environmental aquatic photochemistry**: theory and practice. Washington, DC: American Chemical Society, 1988. 304 p.

LEONG, M.-I.; HUANG, S.-D. Determination of volatile organic compounds in water using ultrasound-assisted emulsification microextraction followed by gas chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 5/6, p. 688-694, 2012.

LEONG, M.-I.; HUANG, S.-D. Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1211, n. 1/2, p. 8-12, 2008.

LEONG, M.-I.; FUH, M.-R.; HUANG, S.-D. Beyond dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1335, p. 2-14, 2014.

LEONG, M.-I.; CHANG, C.-C.; FUH, M.-R.; HUANG, S.-D. Low toxic dispersive liquid-liquid microextraction using halosolvents for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 34, p. 5455-5461, 2010.

LI, S.; GAO, H.; ZHANG, J.; LI, Y.; PENG, B.; ZHOU, Z. Determination of insecticides in water using in situ halide exchange reaction-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 22, p. 3178-3185, 2011.

LI, T.; KIM, B. B.; HA, T. H.; SHIN, Y. B.; KIM, M. G. The effects of pH and surfactants on the absorption and fluorescence properties of ochratoxin A and zearalenone. **Luminescence**, v. 30, n. 7, p. 1106-1111, 2015.

LIN, A.; REINHARD, M. Photodegradation of common environmental pharmaceuticals and estrogens in river water. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 1303-1309, 2005.

LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A. Endocrine disruptors in the environment. **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n. 5, p. 631-681, 2003.

LIU, G. M.; ZHENG, S. R.; XING, X. L.; LI, Y. F.; YIN, D. Q.; DING, Y. S.; PANG, W. H. Fe(III)-oxalate complexes mediated photolysis of aqueous alkylphenol ethoxylates under simulated sunlight conditions. **Chemosphere**, v. 78, n. 4, p. 402-408, 2010.

LIU, X.; HU, J.; WANG, H.; WANG, X. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of triazophos and carbaryl pesticides in water and fruit juice samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, n. 2, p. 289-295, 2009.

LOPES, L. G.; MARCHI, R. R. M.; SOUZA, J. B. G.; E MOURA, J. A.; LORENZON, C. S.; CRUZ, C.; AMARAL, L. A. Estrogênios em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal – São Paulo. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 639-643, 2010.

LÓPEZ, R.; GOÑI, F.; ETXANDIA, A.; MILLÁN, E. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. **Journal of Chromatography B**, v. 846 n. 1/2, p. 298-305, 2007.

LÓPEZ-GARCÍA, I.; VICENTE-MARTÍNEZ, Y.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Determination of very low amounts of chromium(III) and (VI) using dispersive liquid-liquid microextraction by in situ formation of an ionic liquid followed by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 27, n. 5, p. 874-880, 2012.

LUNDGREN, M. S.; NOVAK, P. J. Quantification of phytoestrogens in industrial waste streams. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 11, p. 2318-2323, 2009.

MACHINSKI JÚNIOR, M.; SOARES, L. M. V.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J. L.; BORTOLLETO, N. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Brazilian corn cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 10, p. 1001-1007, 2001.

MAJIDI, B.; SHEMIRANI, F. In situ solvent formation microextraction in the presence of ionic liquid for preconcentration and speciation of arsenic in saline samples and total arsenic in biological samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Biological Trace Element Research**, v. 143, n. 1, p. 579-590, 2011.

MALLAH, M. H.; SHEMIRANI, F.; MARAGHEH, M. G. Ionic liquids for simultaneous preconcentration of some lanthanoids using dispersive liquid-liquid microextraction technique in uranium dioxide powder. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 6, p. 1947-1951, 2009.

MARAGOS, C. M. Zearalenone occurrence and human exposure. **World Mycotoxin Journal**, v. 3, n. 4, p. 369-383, 2010.

MARAGOS, C. M. Zearalenone occurrence in surface waters in central Illinois, USA. **Food Additives & Contaminants: Part B Surveillance**, v. 5, n. 1, p. 55-64, 2012.

MASSART, F.; SAGGESE, G. Oestrogenic mycotoxin exposures and precocious pubertal development. **International Journal of Andrology**, v. 33, n. 2, p. 369-376, 2010.

MATTHEWS, J.; CELIUS, T.; HALGREN, R.; ZACHAREWSKI, T. Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 74, n. 4, p. 223-234, 2000.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 89-99, 2010.

MELWANKI, M. B.; FUH, M.-R. Partitioned dispersive liquid-liquid microextraction: an approach for polar organic compounds extraction from aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1207, n. 1/2, p. 24-28, 2008.

MINERVINI, F.; GIANNOCARO, A.; CAVALLINI, A.; VISCONTI, A. Investigations on cellular proliferation induced by zearalenone and its derivatives in relation to the estrogenic parameters. **Toxicology Letters**, v. 159, n. 3, p. 272-283, 2005.

MORTENSEN, G. K.; STROBEL, B. W.; HANSEN, H. C. B. Degradation of zearalenone and ochratoxin A in three danish agricultural soils. **Chemosphere**, v. 62, n. 10, p. 1673-1680, 2006.

NEAMTU, M.; FRIMMEL, F. H. Photodegradation of endocrine disrupting chemical nonylphenol by simulated solar UV-irradiation. **Science of the Total Environment**, v. 369, n. 1/3, p. 295-306, 2006.

NECHAR, M.; MOLINA, M. F. M.; RODRIGUEZ, L. C.; SENDRA, J. M. B. The application of Doehlert designs in the optimization of experimental variables in solid phase spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 316, n. 2, p. 185-193, 1995.

OJEDA, C. B.; ROJAS, F. S. Separation and preconcentration by dispersive liquid-liquid microextraction procedure: recent applications. **Chromatographia**, v. 74, p. 651-679, 2011.

PALLARONI, L.; VON HOLST, C. Determination of zearalenone from wheat and corn by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 993, n. 1/2, p. 39-45, 2003.

PAWLOWSKI, S.; TERNES, T. A.; BONERZ, M.; RASTALL, A. C.; ERDINGER, L.; BRAUNBECK, T. Estrogenicity of solid phase-extracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 1, p. 129-138, 2004.

PEREIRA, L. C. G. **Levantamento das áreas de preservação permanente de nascentes na microbacia do Córrego do Jaboticabal**. 2010. 84 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

PESSOA, G. P.; SANTOS, A. B.; SOUZA, N. C.; ALVES, J. A. C.; NASCIMENTO, R. F. Desenvolvimento de metodologia para avaliar remoção de estrogênios em estações de tratamento de esgotos. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 968-973, 2012.

PISSARRA, T. C. T. **Análise da bacia hidrográfica do Córrego Rico na sub-região de Jaboticabal, SP**: comparação entre imagens TM-Landsat e fotografias aéreas verticais. 2002. 132 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

PISTOL, G. C.; GRAS, M. A.; MARIN, D. E.; ISRAEL-ROMING, F.; STANCU, M.; TARANU, I. Natural feed contaminant zearalenone decreases the expressions of important pro-and anti-inflammatory mediators and mitogen-activated protein kinase/NF-kB signalling molecules in pigs. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 3, p. 452-464, 2014.

QU, S.; KOLODZIEJ, E. P.; CWIERTNY, D. M. Phototransformation rates and mechanisms for synthetic hormone growth promoters used in animal agriculture. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 24, p. 13202-13211, 2012.

- REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2342-2357, 2010.
- REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M.-R. M.; AGHAEE, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1/2, p. 1-9, 2006.
- RIBEIRO, R. L. V.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H. Reevaluation of ethanol as organic modifier for use in HPLC-RP mobile phases. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 300-306, 2004.
- RUSSELL, R.; PATERSON, M. Zearalenone production and growth in drinking water inoculated with *Fusarium graminearum*. **Mycological Progress**, v. 6, n. 2, p. 109-113, 2007.
- RYU, D.; HANNA, M. A.; ESKRIDGE, K. M.; BULLERMAN, L. B. Heat stability of zearalenone in an aqueous buffered model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 6, p. 1746-1748, 2003.
- SAFE, S. H. Endocrine disruptors and human health is there a problem? An update. **Environmental Health Perspective**, v. 108, n. 6, p. 487-493, 2000.
- SALGUEIRO-GONZÁLEZ, N.; CONCHA-GRAÑA, E.; TURNES-CAROU, I.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for compliance with environmental quality standards (Directive 2008/105/EC). **Journal of Chromatography A**, v. 1223, p. 1-8, 2012.
- SANTIN E.; MAIORKA, A.; ZANELLA, I.; MAGON, L.; Micotoxinas do *Fusarium* spp na avicultura comercial. **Ciência Rural**, v. 31, n. 1, p. 185-190, 2001.
- SANTOS, D. M.; ARAÚJO, I. P.; MACHADO, E. C.; CARVALHO FILHO, M. A. S.; FERNANDEZ, M. A.; MARCHI, M. R. R.; GODOI, A. F. L. Organotin compounds in the Paranaguá Estuarine Complex, Paraná, Brazil: evaluation of biological effects, surface sediment, and suspended particulate matter. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 12, p. 1926-1931, 2009.
- SANTOS, M. C.; SOUSA, R. B.; OLIVEIRA, S. E. M.; LIMA, K. S. C.; LIMA, A. L. S. Micotoxinas e seu potencial como agentes de guerra. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 3, p. 761-778, 2014.
- SCHENZEL, J.; SCHWARZENBACH, R. P.; BUCHELI, T. D. Multi-residue screening method to quantify mycotoxins in aqueous environmental samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 21, p. 11207-11217, 2010.
- SCHOLLENBERGER, M.; MULLER, H. M.; RUFLE, M.; SUCHY, S.; PLANCK, S.; DROCHNER, W. Natural occurrence of 16 fusarium toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany. **Mycopathologia**, v. 161, n. 1, p. 43-52, 2006.

SCHWARTZ, P.; THORPE, K. L.; BUCHELI, T. D.; WETTSTEIN, F. E.; BURKHARDT-HOLM, P. Short-term exposure to the environmentally relevant estrogenic mycotoxin zearalenone impairs reproduction in fish. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 2, p. 326-333, 2010.

SHAABAN, H.; ZGÓRECKI, T. Current trends in green liquid chromatography for the analysis of pharmaceutically active compounds in the environmental water compartments. **Talanta**, v. 132, p. 739-752, 2015.

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

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. 765 p.

SOCAS-RODRÍGUEZ, B.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; ASENSIO-RAMOS, M.; HERRERA-HERRERA, A. V.; PALENZUELA, J. A.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A. Determination of estrogens in environmental water samples using 1,3-dipentylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid as extraction solvent in dispersive liquid-liquid microextraction. **Electrophoresis**, v. 35, n. 17, p. 2479-2487, 2014.

STALIKAS, C.; FIAMEGOS, Y.; SAKKAS, V.; ALBANIS, T. Developments on chemometric approaches to optimize and evaluate microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 2, p. 175-189, 2009.

SUN, J.-N.; SHI, Y.-P.; CHEN, J. Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography for sensitive determination of trace celastrol in urine. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 30, p. 3429-3433, 2011.

TEOFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

TIEMANN, U.; DÄNICKE, S. In vivo and in vitro effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs: a review. **Food Additives and Contaminants**, v. 24, n. 3, p. 306-314, 2007.

TINYIRO, S. E.; WOKADALA, C.; XU, D.; YAO, W. Adsorption and degradation of zearalenone by bacillus strains. **Folia Microbiologica**, v. 56, n. 4, p. 321-327, 2011.

TRUJILLO-RODRÍGUEZ, M. J.; ROCÍO-BAUTISTA, P.; PINO, V.; AFONSO, A. M. Ionic liquids in dispersive liquid-liquid microextraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 51, p. 87-106, 2013.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, n. 2, p. 168-180, 2009.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Risk Assessment Forum. **Special report on environtal endocrine disruption**: an effects assessment and analysis. Washington, DC, 1997. EPA/630/R-96/012. Disponível em: <<http://infohouse.p2ric.org/ref/07/06070.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Estação Agroclimatológica. **Dados estação convencional**. Jaboticabal. Disponível em: <www.fcav.unesp.br/#!/estacao-agroclimatologica/dados/estacao-convencional>. Acesso em: 01 fev. 2016.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Instituto de Química. **Gerenciamento de resíduos químicos normas gerais – revisão 2002**. Versão 2002. Araraquara, 2002. Disponível em: <<http://www.iq.unesp.br/Home/normas-residuos.pdf>>. Acesso em: 17 mar. 2016.

URRACA, J. L.; MARAZUELA, M. D.; MORENO-BONDI, M. C. Analysis for zearalenone and α -zearalenol in cereals and swine feed using accelerated solvent extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 524, n. 1/2, p. 175-183, 2004.

URRY, W. H.; WEHRMEISTER, H. L.; HODGE, E. B.; HIDY, P. H. The structure of zearalenone. **Tetrahedron Letters**, v. 7, n. 27, p. 3109-3114, 1966.

VÁZQUEZ, M. M.; VÁZQUEZ, P. P.; GALERA, M. M.; GARCÍA, M. D. Determination of eight fluoroquinolones in groundwater samples with ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction prior to high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 748, p. 20-27, 2012.

WANG, L.; LUAN, C.; CHEN, F.; WANG, R.; SHAO, L. Determination of zearalenone in maize products by vortex-assisted ionic-liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction with high-performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 12, p. 2126-2131, 2015.

WAŚKIEWICZ, A.; GROMADZKA, K.; BOCIANOWSKI, J.; PLUTA, P.; GOLIŃSKI, P. Zearalenone contamination of the aquatic environment as a result of its presence in crops. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 63, n. 4, p. 429-435, 2012.

XIAO-HUAN, Z.; QIU-HUA, W.; MEI-YUE, Z.; GUO-HONG, X.; ZHI, W. Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 161-168, 2009.

YAN, H.; WANG, H. Recent development and applications of dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1295, p. 1-15, 2013.

YIANTZI, E.; PSILLAKIS, E.; TYROVOLA, K.; KALOGERAKIS, N. Vortex-assisted liquid-liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A. **Talanta**, v. 80, n. 5, p. 2057-2062, 2010.

YU, C.; ZHANG, S.; ZHANG, J.; LI, S.; ZHOU, W.; GAO, H.; LU, R. An in situ ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction method for the detection of pyrethroids by LC-UV in environmental water samples. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 6, p. 1034-1040, 2013.

ZANINI, H. L. H. T. **Caracterização limnológica e microbiológica do córrego rico que abastece Jaboticabal – SP**. 2009. 125 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

ZANINI, H. L. H. T.; AMARAL, L. A.; ZANINI, J. R.; TAVARES, L. H. S. Caracterização da água da microbacia do córrego rico avaliada pelo índice de qualidade de água e de estado trófico. **Engenharia Agrícola**, v. 30, n. 4, p. 732-741, 2010.

ZHAN, M. Determination of photochemically-generated reactive oxygen species in natural water. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, n. 3, p. 303-306, 2009.

ZHANG, H.-F.; SHI, Y.-P. Temperature-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography for the determination of anthraquinones in radix et rhizoma rhei samples. **Talanta**, v. 82, n. 3, p. 1010-1016, 2010.

ZHANG, Y.; LEE, H. K. Determination of ultraviolet filters in water samples by vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1249, p. 25-31, 2012.

ZHAO, Q.; ANDERSON, J. L. Task-specific microextractions using ionic liquids. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 6, p. 1613-1618, 2011.

ZHOU, C.; CHEN, J.; XIE, Q.; WEI, X.; ZHANG, Y.-N.; FU, Z. Photolysis of three antiviral drugs acyclovir, zidovudine and lamivudine in surface freshwater and seawater. **Chemosphere**, v. 138, p. 792-797, 2015.

ZHOU, D.; WU, F.; DENG, N. Fe(III)-oxalate complexes induced photooxidation of diethylstilbestrol in water. **Chemosphere**, v. 57, n. 4, p. 283-291, 2004.

ZHOU, Q.; PANG, L.; XIAO, J. Ultratrace determination of carbamate pesticides in water samples by temperature controlled ionic liquid dispersive liquid phase microextraction combined with high performance liquid phase chromatography. **Microchimica Acta**, v. 173, n. 3, p. 477-483, 2011.

ZINEDINE, A.; SORIANO, J. M.; MOLTO, J. C.; MANES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 1-18, 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Resultados de parâmetros físico-químicos e microbiológicas nas coletas efetuadas em 2014 e 2015, na microbacia hidrográfica do Córrego Rico, em Jaboticabal e Monte Alto

Período de Coleta (meses)	Local	Variáveis ambientais											
		Escherichia Coli (UFC 100 mL ⁻¹)	Carbono Orgânico Total (mg L ⁻¹)	DQO (mg L ⁻¹)	DBO (mg L ⁻¹)	Fósforo total (mg L ⁻¹)	Nitrato (mg L ⁻¹)	Nitrito (mg L ⁻¹)	Nitrogênio total (mg L ⁻¹)	Nitrogênio Amoniacal total (mg L ⁻¹)	Sólidos dissolvidos totais (mg L ⁻¹)	Potássio (mg L ⁻¹)	Turbidez (UT)
Out/2014	P1	850	10,0	24	5	0,098	1,0	<0,011	46,0	0,30	112	<1,109	11,1
	P2	65	72,0	180	81*	1,820*	3,4	0,621	46,0	42*	343	<1,109	15,7
	P3	22	16,0	40	15*	0,230*	<1,0	<0,011	0,51	0,51	132	<1,109	7,3
	P4	40	20,8	52	30*	0,176*	5,5	0,040	6,05	0,50	159	<1,109	10,4
Nov/2014	P1	<1,0	9,0	23	5	0,123*	6,3	<0,011	6,51	0,21	210	6,162	13
	P2	500	16	40	<5	0,420*	7,2	<0,011	10,1	2,90	184	5,217	12
	P3	<1,0	22	55	<5	0,120*	5,7	<0,011	5,91	0,20	168	6,801	12
	P4	70	8	20	<5	0,181*	6,2	<0,011	6,45	0,25	198	5,209	13
Dez/2014	P1	2300*	5	12,5	<5	0,055	0,329	0,024	0,51	0,16	48	2,482	13,9
	P2	2200*	5	12,5	<5	0,707*	0,78	1,301*	2,35	0,26	83	4,091	15,5
	P3	3300*	6	16,6	<5	0,059	0,75	0,032	0,91	0,13	48	2,719	15,2
	P4	3900*	2	4,1	<5	0,072	2,56	0,026	2,70	0,11	47	3,073	14,6
Jan/2015	P1	600	14,0	37	15*	<0,029	<1,0	0,020	0,42	0,12	94	1,593	3,6
	P2	20000*	72,0	187	93,6*	1,157*	1,1	0,355	6,42	<0,05	111	3,892	6,7
	P3	5000*	16,0	41	21,2*	<0,029	<1,0	0,036	0,32	<0,05	138	1,946	46
	P4	6000*	11,0	29	12,8*	<0,029	1,6	0,032	2,32	0,25	132	2,034	58

Período de Coleta (meses)	Local	Variáveis ambientais											
		Escherichia Coli (UFC 100 mL ⁻¹)	Carbono Orgânico Total (mg L ⁻¹)	DQO (mg L ⁻¹)	DBO (mg L ⁻¹)	Fósforo total (mg L ⁻¹)	Nitrato (mg L ⁻¹)	Nitrito (mg L ⁻¹)	Nitrogênio total (mg L ⁻¹)	Nitrogênio Amoniacal total (mg L ⁻¹)	Sólidos dissolvidos totais (mg L ⁻¹)	Potássio (mg L ⁻¹)	Turbidez (UT)
Fev/2015	P1	95	<0,4	18,4	<5	<0,029	<1,0	0,013	0,16	<0,05	53	7,53	11,7
	P2	48	<0,4	18,4	<5	<0,029	<1,0	0,118	0,48	0,06	92	11,07	18,8
	P3	165	<0,4	22,1	<5	<0,029	<1,0	0,029	0,16	<0,05	54	7,699	13,7
	P4	1100*	<0,4	11,0	<5	<0,029	3,8	0,071	4,0	0,14	54	9,994	14,7
Mar/2015	P1	61	8	19,2	<5	<0,029	<1,0	0,068	0,42	0,15	44	3,237	9,5
	P2	620	22	54	<5	0,196*	<1,0	0,143	0,61	0,24	62	4,396	11,2
	P3	380	5	11,5	<5	<0,029	<1,0	0,069	0,65	0,36	40	3,886	56
	P4	3100*	5	11,5	<5	0,037	1,3	0,100	1,96	0,34	40	3,611	37
Abril/2015	P1	140	<0,4	<4	<5	<0,029	1,0	<0,011	1,94	0,54	50	2,165	10,4
	P2	510	22	54	<5	0,237*	11,7*	0,108	14,22	1,82	90	4,569	10,0
	P3	1100*	19	46	<5	<0,029	2,3	0,036	2,80	0,29	50	2,286	92
	P4	900	35	84,5	<5	<0,029	4,0	0,016	4,51	0,15	46	2,796	74,0
Maio/2015	P1	410	69	185,8	<5	<0,029	0,31	0,015	0,74	0,33	88,91	2,420	8,9
	P2	2000*	136	367,2	<5	<0,029	8,98	0,019	10,06	0,44	152,4	3,23	11,1
	P3	4300*	2	4,32	<5	<0,029	0,70	0,014	1,32	0,40	84	2,119	21,0
	P4	1200*	40	108	<5	<0,029	2,31	0,011	2,46	0,09	84,06	2,276	19,3

Período de Coleta (meses)	Local	Variáveis ambientais											
		Escherichia Coli (UFC 100 mL ⁻¹)	Carbono Orgânico Total (mg L ⁻¹)	DQO (mg L ⁻¹)	DBO (mg L ⁻¹)	Fósforo total (mg L ⁻¹)	Nitrato (mg L ⁻¹)	Nitrito (mg L ⁻¹)	Nitrogênio total (mg L ⁻¹)	Nitrogênio Amoniacal total (mg L ⁻¹)	Sólidos dissolvidos totais (mg L ⁻¹)	Potássio (mg L ⁻¹)	Turbidez (UT)
Jun/2015	P1	1600*	16	40	<5	<0,029	1,0	0,015	1,20	0,16	47	1,79	7,7
	P2	420	35	88	<5	<0,029	1,5	0,232	2,37	0,64	96	3,991	14,0
	P3	5000*	22	56	<5	<0,029	0,8	0,020	0,89	0,07	42	1,892	13,5
	P4	960	21	52	<5	<0,029	3,4	0,047	3,45	<0,05	42	2,232	13,1
Jul/2015	P1	200	42	86	<5	<0,029	0,74	<0,011	0,74	<0,05	65	2,196	5,3
	P2	3600*	57	93	<5	1,649*	2,03	0,374	2,40	<0,05	106	3,671	9,7
	P3	2700*	9	33	<5	<0,029	0,87	<0,011	0,87	<0,05	89	2,536	12,2
	P4	5200*	12	29	<5	0,033	4,55	0,044	4,59	<0,05	76	2,474	9,26

* Acima do valor máximo permitido pela Resolução CONAMA 357/2005 – Águas Doces de Classe 2;
 UFC: Unidade Formadora de Colônia
 UT: Unidade de Turbidez.

APÊNDICE B - Espectro de irradiância da lâmpada Xenon 1500 W (Solarbox 1500, Co.fo.me.gra, Itália). O espectro se refere a irradiância total de 550 W m^{-2} entre 290-800 nm (condições utilizadas durante as experiências de irradiação)

