



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



CRISTIANE SAMPAIO FAHNING

**INTERFERENTES ENDÓCRINOS EM ORGANISMOS DA BAÍA
DE TODOS OS SANTOS: DETERMINAÇÃO POR UFLC-DAD-FLD
APÓS EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS**

Salvador – BA
Junho/2016

CRISTIANE SAMPAIO FAHNING

**INTERFERENTES ENDÓCRINOS EM ORGANISMOS DA BAÍA DE TODOS
OS SANTOS: DETERMINAÇÃO POR UFLC-DAD-FLD APÓS EXTRAÇÃO
ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química – Área de Concentração: Química Analítica, Instituto de Química, da Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do grau de Doutora em Química.

Orientadora:

Profa. Dra. Gisele Olímpio da Rocha

Co-Orientadora:

Profa. Dra. Vanessa Hatje


Salvador – BA
Junho/2016

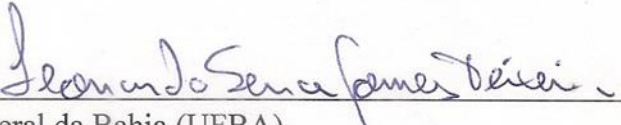
TERMO DE APROVAÇÃO

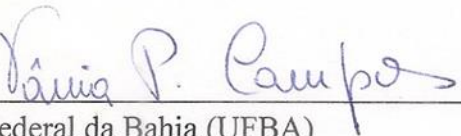
CRISTIANE SAMPAIO FAHNING

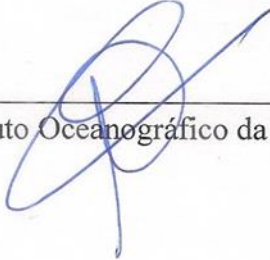
“INTERFERENTES ENDÓCRINOS EM ORGANISMOS DA BAÍA DE TODOS OS SANTOS: DETERMINAÇÃO POR UFLC-DAD-FLD APÓS EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS”

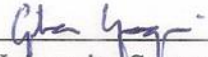
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Gisele Olímpio da Rocha 
Doutorado em Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Leonardo Sena Gomes Teixeira 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof.^a Dr.^a Vânia Palmeira Campos 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof.^a Dr.^a Ana Cecília Rizzatti de Albergaria Barbosa 
Doutorado em Oceanografia Química e Geológica, Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO-USP)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Gilvan Takeshi Yogui 
Doutorado em Oceanografia, Texas A&M University System (TAMUS)
Universidade Federal de Pernambuco

Salvador, 10 de junho de 2016.

Sistema de Bibliotecas – IQ/UFBA

Fahning, Cristiane Sampaio

Interferentes endócrinos em organismos da Baía de Todos os Santos:
determinação por UFLC-DAD-FLD após extração assistida por micro-ondas. /
Cristiane Sampaio Fahning. – 2016.

100 f. : il.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Gisele Olímpio da Rocha

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vanessa Hatje

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química,
Salvador, 2016

1. Poluição marinha - Todos os Santos, Baía de (BA). 2. Estuários. 3.
Interferentes endócrinos. 4. Organismos marinhos. 5. Pescados - Contaminação.
I. Rocha, Gisele Olímpio da. II. Hatje, Vanessa. III. Universidade Federal da
Bahia. Instituto de Química. IV. Título.

CDD – 628.16

CDU – 543.63:502.51(26)

Aos meus pais, Ailton e Nianza, por tornarem meus sonhos realidade e por toda liberdade que tive para tomar minhas decisões com o total apoio deles, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Tantas foram as pessoas que estiveram comigo ao longo da minha vida e principalmente durante esse período que não há como não externar meus sinceros agradecimentos.

A minha família agradeço por todo o apoio recebido e por compreender minhas ausências. Em especial minha avó Nena por ser um referencial em minha vida, e estar sempre presente em minha educação.

Aos meus pais pelo amor incondicional, pelos bons valores transmitidos e por me impulsionarem nos momentos de desânimo, fazendo-me sentir maior que os obstáculos da vida.

As minhas irmãs Acássia e Tássia, e as irmãs do coração, Rita e Jussi, por estarem sempre presente em todos os momentos da minha vida. Ao meu irmão Samuel (*In memoriam*) por todo amor recebido em sua curta passagem nesse mundo.

Aos meus amados sobrinhos Maria Clara e Rafael, por me fazer sorrir até nos momentos mais difíceis.

A Profa. Dra. Gisele Olímpio da Rocha pela orientação, confiança e por estar sempre disponível e presente no desenvolvimento do trabalho, e incentivar meu crescimento profissional.

A Profa. Dra. Vanessa Hatje por ter sido mais que uma co-orientadora, como também por sua confiança e apoio para que eu desenvolvesse esse trabalho.

A Gabriel, meu amigo querido e parceiro nessa jornada, pelo enorme apoio e colaboração no desenvolvimento do trabalho, além do consolo e força nos momentos mais difíceis do trabalho.

Aos colegas dos Laboratórios 07 e 08 – Cienam por toda ajuda recebida, convivência, reuniões e cafés científicos (LOQ FEST) durante esse período. Em especial a Rodrigo e Raíza pela amizade e boa vontade sempre, a Nete, Luíza, Gabriel e Gilmar pela ajuda fundamental na coletas das amostras.

A Amorim pelo auxílio e orientação na compra e identificação das espécies de peixes.

A Flávia e Lidiane, amigas que levarei sempre comigo, por estar presentes e dividindo comigo bons e maus momentos, e principalmente por nossas “saidinhas”. A Ivana e Luciana, pelos dos longos anos de amizade que não se perderam no tempo, e mesmo distante sempre se fazem presente.

A João, Georgia, Paula, Débora, Robson e Netto, grandes amigos que a Química me deu, pelo companheirismo, troca de conhecimentos e claro, pelos grandes momentos de alegria vividos.

A Mooana e Laura, convivência diária e amizade, principalmente, por suportar e respeitar meus momentos de estresse.

A Carlos, pessoa querida, por todo carinho, paciência e compreensão.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química pelos ensinamentos transmitidos.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Química e do também do Cienam.

As seguintes fontes de recurso por financiarem esse trabalho:

- Programa Baía de Todos os Santos (FAPESB CVN 0049/2008; PET0034/2012);
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em ambientes marinhos tropicais. (CNPq process 565054/2010-4);
- Projeto PRONEM FAPESB/CNPq: “Avaliação de Impactos Antrópicos no Entorno da Baía de Todos os Santos – Instituto Kirimurê” (Edital no. 028/2010, Pedido no. 1663/2011 e Termo de Outorga PNE0011/2011);
- Edital Universal Edital 14/2012: “Caracterização de contaminantes emergentes classificados como Disruptores Endócrinos na Baía de Todos os Santos” (Processo no. 472452/2012-6).

Agradeço à CAPES pela bolsa fornecida durante o período do doutorado.

Agradeço também ao PPGQ, CNPq, FAPESB e Petrobrás

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

“Somos seres desejan­tes des­tinados à incompletude,
e é isso que nos faz caminhar”.

Jacques Lacan

RESUMO

Dentre os compostos classificados como interferentes endócrinos (IE), estrogênicos, bisfenol A, alquilfenóis e ftalatos têm sido estudados devido a ocorrência em diversos compartimentos ambientais. Grande parte destes compostos têm como destino final ecossistemas aquáticos, onde poderão ser acumulados na biota e/ou ser biomagnificados, podendo provocar efeitos adversos. O presente estudo propõe uma metodologia de extração simples e rápida empregando a extração assistida por micro-ondas (MAE) para a determinação de 14 IE (estriol (E3), 17 β -estradiol (E2), 17 α -etinilestradiol (EE2), estrona (E1), bisfenol A (BPA), 4 t-octilfenol (4 t-OP), 4 n-octilfenol (4 n-OP), 4 n-nonilfenol (4 n-NP), Dimetilftalato (DMP), Dietilftalato (DEP), Benzilbutilftalato (BBP), Dibutilftalato (DBP), Di-n-octilftalato (Dn-OP) e Di-2-etilhexilftalato (DEHP)) em organismos marinhos. A separação e quantificação dos analitos foi realizada por cromatografia líquida ultra rápida acoplada aos detectores de arranjo de diodos e fluorescência (UFLC-DAD-FLD). A metodologia proposta foi validada e aplicado na determinação dos IE em ostra, sururu e chumbinho coletados em diferentes regiões da Baía de Todos os Santos. As recuperações (76% (EE2) – 98% (4n-NP)), os limites de detecção (0,41 ng g⁻¹ (4t-OP) – 63,2 ng g⁻¹ (BBP)) e de quantificação (1,37 ng g⁻¹ (4t-OP) – 211 ng g⁻¹ (BBP)) foram similares a valores reportados na literatura. Concentrações elevadas de DEP (<LD - 1167 ng g⁻¹), DEHP (<LD - 1952 ng g⁻¹) e DnOP (<LD - 1953 ng g⁻¹) foram encontradas nos tecidos dos organismos coletados na BTS, principalmente, próximos a áreas industrializadas. O fator de acumulação (<1) calculado para o 4 n-NP, o DMP, o DEP e o DEHP indicaram que não está ocorrendo bioacumulação destes compostos nos bivalves locais. Peixes e frutos do mar comercializados em Salvador – Bahia foram avaliados quanto a contaminação por IE. Foi observada a presença dos contaminantes E3, BPA, E2, EE2, E1, 4 n-OP, 4 n-NP, DMP, DEP, BBP, DEHP e DnOP em pelo menos uma das espécies dos peixes e mariscos analisados. A dose de ingestão diária indicou que os níveis de contaminação não oferecem risco ao consumo humano, conforme valores regulamentados por agências internacionais de saúde e segurança alimentar.

Palavras-chave: Interferente endócrino, organismos marinhos, contaminação, Baía de Todos os Santos

ABSTRACT

Among the compounds classified as endocrine disruptors (ED), estrogen, bisphenol A, alkylphenols and phthalates have been extensively studied due to the occurrence in several environmental compartments. Several compounds have as final destination aquatic systems can bioaccumulate in biota and / or biomagnificar and may cause adverse effects. This study proposes a simple and fast extraction methodology employing the microwave assisted extraction (MAE) for 14 ED determination (estriol (E3), 17 β -estradiol (E2), 17 α -ethynylestradiol (EE2), estrone (E1), bisphenol A (BPA), 4 t-octylphenol (4t-OP), 4 n-octylphenol (4n-OP), 4 n-nonylphenol (4n-NP), Dimethyl phtalate (DMP), Diethyl phthalate (DEP), Butylbenzyl phthalate (BBP), Di-n-buthyl phthalate (DBP), Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and Di-n-octhyl- phthalate (DnOP) in in marine organisms. The separation and quantification of analytes was performed by a ultra-fast liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors (UFLC-DAD-FLD). The proposed methodology has been validated and applied to determine the IE in oyster, mussels and clams collected in different regions from Todos os Santos Bay. The recoveries (76% (EE2) - 98% (4n-NP)), the detection limits (0,41 ng g⁻¹ (4 t-OP) - 63,2 ng g⁻¹ (BBP)) and quantification (1,37 ng g⁻¹ (4 t-OP) - 211 ng g⁻¹ (BBP))were similar to values reported in the literature. High concentrations of DEP (<LD - 1167 ng g⁻¹), DEHP (<LD - 1952 ng g⁻¹) and DNOP (<LD - 1953 ng g⁻¹) were found in tissues of organisms from the BTS, mainly near industrialized areas. Biota-sediment accumulation factor (< 1) was calculated for 4 n-NP, DMP, DEP and DEHP, indicated that is not occurring bioaccumulation of these compounds in bivalves. Fish and seafood sold in Salvador - Bahia were evaluated for IE contamination. It was observed the presence of contaminants E3, BPA, E2, EE2, E1, 4 n-OP, 4 n-NP, DMP, DEP, BBP, DEHP and DnOP at least one of the species of fish and shellfish analyzed. The dose of daily intake indicated that contamination levels offer no risk for human consumption, according to the amounts regulated by international agencies of health and food safety.

Keywords: Endocrine disruptors, marine organisms, contamination, Todos os Santos Bay

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciplopenta[α]fenantreno.....	25
Figura 2: Alquilfenóis.....	27
Figura 3: Biotransformação dos alquilfenóis polietoxilados em estações de tratamento de esgotos sob condições aeróbicas/anaeróbicas.....	27
Figura 4: Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil.....	42
Figura 5: Percentagem de recuperação dos 14 interferentes endócrinos em amostra de tecido de chumbinho fortificadas com solução padrão dos analitos em uma concentração final de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os alquilfenóis, BPA e hormônios, 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a estrona e 10 mg L^{-1} para os ftalatos com os solventes extratores estudados.....	50
Figura 6: Fluxograma da metodologia completa de extração dos 14 interferentes endócrinos em tecidos de bivalves.....	56
Figura 7: Concentração de hormônios e BPA (A), alquilfenóis (B) e ftalatos (C) em tecidos de bivalves coletados na Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil.....	63
Figura 8: Resultado da análise de componentes principais para as concentrações de IE e teor de lipídio (%) em amostras de tecido de bivalves coletados na Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil.....	67
Figura 9: Concentração de alquilfenóis e BPA (A) e ftalatos (B) em sedimentos coletados na Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil.....	70
Figura 10: Resultado da análise de componentes principais para as concentrações de IE, carbono orgânico e nitrogênio total em amostras de sedimentos coletados na Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físico-químicas de alguns hormônios esteroides.....	25
Tabela 2: Propriedades físico-químicas dos alquilfenóis e alquilfenóis etoxilados.....	28
Tabela 3: Propriedades físico-químicas dos ftalatos.....	30
Tabela 4: Comparação entre tipos de amostras, procedimentos de pré-tratamento, técnica analítica e limites de detecção de interferentes endócrinos.....	38
Tabela 5: Georefenciamento das estações de amostragem dos bivalves e sedimentos coletados na Baía de Todos os Santos, Bahia – Brasil.....	44
Tabela 6: Percentagem de recuperação dos 14 interferentes endócrinos em amostra de tecido de chumbinho fortificadas com solução padrão dos analitos em uma concentração final de 50 µg L ⁻¹ para os alquilfenóis, BPA e hormônios, 250 µg L ⁻¹ para a estrona e 10 mg L ⁻¹ para os ftalatos com os solventes extratores estudados.....	51
Tabela 7: Condições de tempo e temperatura de extração na extração dos IE em bivalves. Valores em % de recuperação das amostras fortificadas (n = 3) com padrões com concentração final de 25 µg L ⁻¹ (BPA, E2, E3, EE2, 4 t-OP, 4 n-OP, 4 n-NP) 75 µg L ⁻¹ (E1) e 500 µg L ⁻¹ (DMP, DEP, BBP, DBP DEHP, Dn-OP).....	55
Tabela 8: Percentual de recuperação em diferentes níveis de concentração, limites de detecção e limites de quantificação para os 14 interferentes endócrinos.....	58
Tabela 9: Percentual de recuperação (%) e limite de detecção (ng g ⁻¹) de interferentes endócrinos em amostras ambientais.....	59
Tabela 10: Concentrações (ng g ⁻¹) dos interferentes endócrinos em amostras de ostras e sururu.....	60
Tabela 11: Concentração dos interferentes endócrinos em tecidos de bivalve (ng g ⁻¹) coletados na Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil.....	62
Tabela 12: Coeficientes nas combinações lineares de variáveis que compõem os PC do PCA das amostras de bivalves.....	68
Tabela 13: Concentração de IE em sedimentos (ng g ⁻¹) coletados na Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil.....	71
Tabela 14: Coeficientes nas combinações lineares de variáveis que compõem os PC do PCA das amostras de sedimentos.....	73

Tabela 15: Fator de acumulação biota-sedimento calculados para bivalves coletados na Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil.....	74
Tabela 16: Níveis de concentração (ng g^{-1}) dos interferentes endócrinos estudados em amostras de peixe e mariscos comercializados na cidade de Salvador - Bahia, Brasil.....	77
Tabela 17: Valores de ingestão diária ($\text{mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) calculados para amostras de peixe e mariscos comercializados na cidade de Salvador - Bahia, Brasil.....	80

LISTA DE ABREVIACOES

4 n-NP – 4 n-nonilfenol

4 t-OP – 4 t-octilfenol

4n-OP – 4 n-octilftalato

ACN – Acetonitrila

AP – Alquilfenol

APE – Alquilfenol etoxilados

ASE – Extração acelerada por solvente

ASTM – Sociedade americana para testes e materiais

BBP – Benzilbitilftalato

BPA – Bisfnol A

BPC – Bifenila policlorada

BSA – N,O- bis(trimetilsilil)acetamida

BSAF – Fator de acumulação biota-sedimento

BSTFA – N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

BTS – Baía de Todos os Santos

C_{org} – Carbono orgânico

DAD – Detector de arranjo de diodos

DBP – Dibutilftalato

DCM – Diclorometano

DDT – Dicloro-difenil-tricloroetano

DEHP – Di-2-hetilexilftalato

DEP – Dietilftalato

DI – Dose diária

DLLME – Microextração líquido-líquido dispersiva

DMP – Dimetilftalato

DnOP – Di-n-octilftalato

E1 – Estrona

E2 – 17 β -estradiol

E3 – Estriol

ECD – Detector por captura de elétron

EE2 – 17 α -etinilestradiol

EFSA (*European Food Safety Authority*) – Autoridade Europeia de Segurança Alimentar

ETE - Estação de tratamento de esgoto

FLD – Detector de fluorescência

GC – Cromatografia gasosa

HCl – Ácido clorídrico

HMDS – Hexametilsililazano

HPA – Hidrocarboneto policíclico aromático

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IE – Interferente Endócrino

IPCS – Programa Internacional de Segurança Química

LC – Cromatografia líquida

LD – Limite de detecção

LPME – Microextração em fase líquida

LQ – Limite de quantificação

MAE – Extração assistida por microondas

MeOH – Metanol

MS – Espectrômetro de massa

MSTFA – N-metil-N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

NaOH – Hidróxido de sódio

NP – Nonilfenol

N_{tot} – Nitrogênio total

OP – Octilfenol

PCA – Análise de componentes principais

PLE – Extração líquido pressurizada

PTFE – Politetrafluoretileno

SBSE – Extração sortiva em barra magnética

SFE – Extração por fluido supercrítico

SPE – Extração em fase sólida

SPME – Microextração em fase sólida

TBT – Tributilestanho

TMCS – Trimetilclorosilano

TMSIM – N-trimetilsililimidazol

UAE – Extração assistida por ultrassom

UFLC – Cromatografia líquida ultra rápida

UFLC-FLD-DAD - Cromatografia líquida ultra rápida acoplada aos detectores de fluorescência e arranjo de diodos

UHPLC – Cromatografia líquida de ultra performance

USEPA – Agência de Proteção Ambiental Americana

VTG – Vitelogenina

WHO (*World Health Organization*) – Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	21
3. REVISÃO DELITERATURA	
3.1 Interferentes Endócrinos.....	22
3.2 Algumas das principais classes de Interferentes Endócrinos.....	24
3.3 Técnicas analíticas empregadas na determinação de IE em amostras sólidas....	30
3.4 Interferente Endócrino na biota.....	39
4. PARTE EXPERIMENTAL	
4.1 Área de estudo.....	42
4.2 Reagentes e soluções.....	43
4.3 Coletas das amostras.....	44
4.4 Preparo das amostras.....	45
4.5 Análises cromatográficas.....	47
4.6 Análises de Carbono e Nitrogênio em sedimento.....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1 Desenvolvimento da metodologia de extração de IE em organismos marinhos.....	49
5.2 Ocorrência de interferentes endócrinos em bivalves e sedimentos coletados na Baía de Todos os Santos.....	61
5.3 IE em peixes e mariscos comercializados na cidade de Salvador – Bahia.....	76
6. CONCLUSÕES.....	83
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	85
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

1. INTRODUÇÃO

Interferentes endócrinos (IE) compreendem um vasto grupo de compostos que podem causar distúrbios à saúde de organismos e/ou de seus descendentes, devido à sua atuação no sistema endócrino dos mesmos, ainda que presentes em concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ ou até mesmo ng L^{-1} . Dentre os IE estão incluídos uma ampla variedade de compostos que vão desde produtos químicos previamente utilizados na agricultura, como pesticidas organoclorados, como também produtos utilizados hoje na vida cotidiana e que estão associados à melhoria do bem-estar das pessoas, tais como plastificantes (bisfenol A e ftalatos), surfactantes (alquilfenóis), e produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais. Além das substâncias de origem sintética há também a contribuição de compostos naturais que são classificados como IE, como hormônios e esteroides que são excretados por seres humanos e animais, e chegam aos sistemas aquáticos através do esgoto doméstico (Fontenele et al., 2010; Porte et al., 2006).

A exposição dos seres humanos aos interferentes endócrinos nos últimos anos tem recebido maior atenção, especialmente devido ao consumo de organismos aquáticos (Tijani et al., 2013). Distúrbios como o aumento das taxas de câncer testicular e da tireoide, má qualidade do sêmen e diminuição da testosterona entre homens, são atribuídos à exposição aos IE (Wilson et al., 2016; Trivison et al., 2007; Andersson et al., 2007; Huyghe et al., 2003; Swan et al., 2000).

Devido a natureza lipofílica e persistência no meio ambiente, a maioria dos IE tendem a bioacumular e biomagnificar em diferentes compartimentos ambientais, incluindo a biota marinha (Xia et al., 2015). Bioacumulação é o termo geral que descreve um processo pelo qual substâncias são absorvidas pelos organismos. Esse processo pode ocorrer tanto de forma direta, quando as substâncias são absorvidas a partir do meio ambiente (água e sedimento, por exemplo), quanto de forma indireta por meio da ingestão de alimentos contaminados. A biomagnificação é um fenômeno que ocorre quando há acúmulo progressivo de um contaminante de um nível trófico para outro ao longo da cadeia alimentar (Du et al., 2014; Ghiselli e Jardim, 2007; Oost et al., 2003).

De uma certa forma, a biomagnificação é o resultado de uma sequência de etapas de bioacumulação que ocorrem ao longo da cadeia trófica. As substâncias bioacumuladas, geralmente, não são metabolizadas pelos organismos, de maneira que a sua taxa de absorção e armazenamento é maior do que a de excreção (Voutsas et al., 2002; Corl, 2001).

Considerando que a contaminação do ambiente aquático tem sido uma crescente preocupação, e que os organismos marinhos possuam a capacidade de absorver quantidades de contaminantes ao longo da vida, faz-se necessário o desenvolvimento de novos estudos que avaliem a concentração de IE na biota.

Ainda que se tenha avançado bastante no desenvolvimento de técnicas analíticas de separação, identificação e quantificação de uma longa série de substâncias de diferentes classes de compostos, a determinação de IE na biota ainda é um tarefa difícil em razão da complexidade desse tipo de matriz e os baixos níveis de concentração em que os analitos se encontrar (Ye et al., 2013a; David et al., 2009). Neste trabalho, foi desenvolvida uma metodologia para a extração de 14 compostos classificados como interferentes endócrinos em tecidos de organismos marinhos, como também foi avaliado o nível de contaminação em bivalves (ostras, sururu e chumbinho) e sedimentos coletados na Baía de Todos os Santos – BA, e em mariscos e peixes comercializados em mercados municipais na cidade de Salvador – BA.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo geral desenvolver e validar uma metodologia analítica para a extração de 14 interferentes endócrinos em organismos marinhos e determinar estes IE na biota e sedimentos coletados na Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil. De acordo com a revisão bibliográfica realizada neste estudo, foi observado que em função do potencial em ocasionar interferência no sistema endócrino de organismos marinhos associado a ampla utilização, algumas classes de contaminantes requerem atenção. Adicionalmente, alguns grupos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, pesticidas e bifenilas polibromadas, por exemplo, já vem sendo estudados, de modo que seus efeitos em organismos marinhos já são, de certa forma, mais conhecidos.

2.2 Objetivos Específicos

- i. Desenvolver e validar um método de extração de IE em amostras de bivalves provenientes de ambientes marinhos;
- ii. Avaliar a contaminação de bivalves (ostras, sururus e chumbinhos) coletados na Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil.
- iii. Avaliar a qualidade de peixes e mariscos comercializados na cidade de Salvador – Bahia, Brasil, bem como o risco de ingestão deste alimentos pela população.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Interferentes Endócrinos

Interferentes endócrinos são compostos orgânicos hormonalmente ativos que podem causar distúrbios no sistema endócrino de seres humanos e da biota, mesmo em baixas concentrações (Yang et al., 2015; Fontenele et al., 2010; Ghiselli e Jardim, 2007). Sob a categoria dos IE há uma ampla variedade de substâncias químicas naturais e sintéticas. Os compostos mais comumente reconhecidos ou classificados como IE são alquilfenóis (AP) e alquilfenóis polietoxilados (APE), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), bifenilas policloradas (BPC), ftalatos, retardantes de chama bromados, dioxinas, furanos, herbicidas, pesticidas, drogas farmacêuticas e hormônios esteroides (Locatelli et al., 2016; Thomaidis et al., 2012; Tan et al., 2007a; Toze, 2006; Xu et al., 2006).

A primeira hipótese sobre o efeito de IE foi levantada no início da década de 1980, com a observação de características femininas em machos de aves coloniais da região dos Grandes Lagos (América do Norte) expostos ao pesticida organoclorado Dicloro-Difenil-Tricloroetano, DDT (Fry e Toone, 1981). Esse mesmo fenômeno foi observado em jacarés no Lago Apopka, na Flórida (Guillette et al., 1996). Os jacarés que vivem no lago foram expostos ao DDT devido a um derramamento proveniente de uma indústria química. Cientistas posteriormente descobriram que os jacarés apresentaram problemas de reprodução, devido a alterações nos órgãos reprodutivos masculinos (SETAC, 2000). Na Europa, por volta da mesma época, pescadores britânicos relataram a ocorrência de características sexuais incomuns (intersex e/ou hermafroditismo) em peixes da espécie *Rutilus rutilus* que habitavam lagos à jusante do ponto de descarga de uma estação de tratamento de efluentes (Tyler e Routledge, 1998).

Moluscos que vivem no litoral brasileiro desenvolveram anomalias no sistema reprodutivo resultante da exposição ao TBT (tributilestanho) (Fernandez et al., 2002). Esses compostos orgânicos contendo estanho, oriundos da tinta dos cascos das embarcações, provocaram desregulação endócrina. Eles ocasionaram o surgimento de órgãos masculinos em fêmeas, fenômeno conhecido como impossex (imposição sexual) que é irreversível. Esse fenômeno provoca a esterilização dos organismos, podendo causar declínio considerável nas populações de espécies mais sensíveis. Essas substâncias interferem na síntese da testosterona (hormônio masculino) causando um aumento de sua produção nas fêmeas. Há, assim,

surgimento de estruturas sexuais masculinas não funcionais, mantendo-se, porém, a anatomia interna do organismo (Bila e Dezotti, 2007)

Outros estudos realizados no Brasil relatam os efeitos à exposição aos IE no meio ambiente. Torres et al., 2002 investigaram a concentração e o destino de pesticidas, bifenilas policloradas (PCB) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na bacia hidrográfica Paraíba do Sul/Guandu, a mais importante hidrovia no Estado do Rio de Janeiro, onde 90% da população depende dessa água para uso doméstico. Os resultados mostraram que os compostos organoclorados, inclusive os PCB, estavam presentes em quantidades muito reduzidas nas amostras. Entretanto, os HPA mostravam níveis elevados tanto nas amostras de água quanto em sedimentos marinhos. Sodré et al., 2010 investigaram a ocorrência de onze IE em água potável na Região de Campinas – SP. Seis compostos (estigmasterol, bisfenol A, colesterol, cafeína, estrona, e 17β -estradiol) estavam presentes nas amostras analisadas. O stigmasterol mostrou a maior concentração média ($0,34 \pm 0,13 \mu\text{g L}^{-1}$), seguido pelo colesterol ($0,27 \pm 0,07 \mu\text{g L}^{-1}$), cafeína ($0,22 \pm 0,06 \mu\text{g L}^{-1}$), e bisfenol A ($0,16 \pm 0,03 \mu\text{g L}^{-1}$). Locatelli et al., 2011 determinaram antibióticos (amoxicilina, ampicilina, cefalexina, ciprofloxacina, norfloxacina, sulfametoxazol, tetraciclina, sulfametoxazol) em amostras de água da Bacia do Rio Atibaia – SP, e os resultados mostraram a presença dos oito antibióticos investigados, em todas as amostras analisadas, sendo que as concentrações das amostras variaram de 29 ng L^{-1} para a cefalexina a $0,5 \text{ ng L}^{-1}$ para norfloxacina.

Melo e Brito, 2014 determinaram bisfenol A (BPA) e o 17β -etinilestradiol (EE2) em águas superficiais e de abastecimento na cidade de São Luís – MA. As amostras foram coletadas em oito pontos diferentes, apenas o BPA foi detectado acima do limite de detecção em duas amostras com concentrações de $1,11$ e $3,61 \mu\text{g L}^{-1}$. Um outro estudo desenvolvido em águas superficiais e tratadas foi realizado por Torres et al., 2015 no Rio Piracicaba em São Paulo. Os resultados mostraram que as amostras estavam contaminadas pelos hormônios estriol (90 ng L^{-1}), estrona (28 ng L^{-1}), progesterona (26 ng L^{-1}), 17β -estradiol (137 ng L^{-1}) e 17α -etinilestradiol (194 ng L^{-1}), podendo ser um indicativo de influxo de esgoto contendo esses hormônios em alguns pontos do Rio Piracicaba. Furtado e Mühlen, 2015 analisaram hormônios estrogênicos e alquilfenóis em amostras de filtros de água coletados na região da bacia do Rio dos Sinos. Foram analisadas quatro amostras de filtros residenciais provenientes de água tratada e água de poço artesiano, das cidades de Novo Hamburgo e São Leopoldo. Apenas os hormônios estrona e 17α -etinilestradiol foram encontrados em todas as amostras

analisadas com concentrações máximas de 2,28 e 2,68 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, o que indica a presença desses contaminantes na água de consumo humano.

Ainda existem poucos estudos relacionado aos IE em organismos marinho, em parte, devido a maior complexidade destas matrizes, o que acarreta a necessidade de métodos analíticos mais eficientes.

3.2 Algumas das Principais Classes de Interferentes Endócrinos

- *Hormônios Naturais e Artificiais*

Os estrogênios naturais fazem parte de um grupo de hormônios esteroides lipossolúveis derivados do colesterol. Eles são responsáveis pelas características secundárias femininas relacionadas ao crescimento, à reprodução, ao desenvolvimento e ao metabolismo, e também influenciam no desenvolvimento do sistema reprodutor feminino e masculino, nas funções das glândulas mamárias, do útero, do ovário, dos testículos, e da próstata. Além disso, os hormônios naturais desempenham um importante papel na manutenção do tecido ósseo, no sistema cardiovascular e no sistema nervoso central. São produzidos principalmente nos ovários e testículos, mas também em outras glândulas como as suprarrenais (Zou et al., 2012; Shimada et al., 2001).

Estruturalmente, os estrogênios esteroides consistem em um tetracíclico composto por um fenol, dois cicloexanos e um ciclopentano. São conhecidos também como esteroides C18. A diferença entre esses compostos está na localização dos grupos funcionais nas posições C16 e C17 (figura 1). A estrona, por exemplo, possui em sua estrutura um grupo carbonila enquanto que o estradiol apresenta um grupo hidroxila na posição C17. Já o estriol apresenta dois grupos hidroxilas um no C16 e outro no C17. A hidroxila do C17 do estradiol pode estar direcionada para baixo em relação ao plano molecular, formando o 17α -estradiol, ou para cima, formando o composto 17β -estradiol (Limpiyakorn et al., 2009). As estruturas e propriedades físico-químicas dos hormônios estão apresentas na Tabela 1.

Além dos hormônios naturais, muitos fármacos possuem em sua formulação, esteroides produzidos artificialmente. Os principais hormônios sintéticos incluem o 17α -etinilestradiol (EE2) e os derivados do norgestrel. Estes compostos sintéticos são empregados como contraceptivos e como agentes terapêuticos de reposição hormonal (Sornalingam et al., 2016; Säfholm et al., 2015; Martínez et al., 2012; Markey et al., 2001).

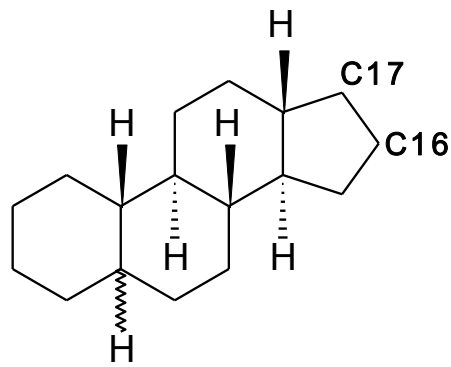


Figura 1: Ciclopenta [α] fenantreno.

Os esteroides naturais, estrona, 17β-estradiol e estriol assim como o hormônio sintético 17α-etinilestradiol supostamente contribuem para a atividade estrogênica de efluentes domésticos e de estações de tratamento de água e esgoto (Burkina et al., 2015; Tan et al., 2007b; Tan et al., 2007c). Esses compostos são introduzidos no ambiente de forma ampla e contínua, devido ao uso generalizado de contraceptivos e/ou medicamentos utilizados para distúrbios da menopausa formulados com estes estrogênios (González et al., 2015).

Tabela 1: Propriedades físico-químicas de alguns hormônios esteroides

Nome	Abreviatura	Estrutura química	Massa molecular	pKa	K _{ow}
Estrona	E1		270,37	10,25	3,624
17 β-estradiol	E2		272,38	10,27	4,146
Estriol	E3		288,38	10,25	2,527
17 α-etinilestradiol	EE2		296,40	10,24	4,106

Dos vários grupos de substâncias com atividades estrogênicas relatados, os hormônios sexuais femininos e os esteroides sintéticos são considerados os mais ativos. Eles podem

causar efeitos prejudiciais sobre os organismos, mesmos em concentrações tão baixas quanto $5 \mu\text{g L}^{-1}$. Isto pode resultar em uma reversão total do sexo masculino para feminino em espécies de peixe como, por exemplo, o medaka (*Oryzias latipes*) (Hirai et al., 2006).

Um dos primeiros estudos correlacionando a ocorrência de estrogênios naturalmente excretados por humanos e efeitos ecotoxicológicos foi realizado na Inglaterra. Os peixes machos, à jusante de pontos de lançamento de estações de tratamento de esgoto, produziam a proteína vitelogenina (VTG), normalmente produzida por fêmeas sob a influência do hormônio estrogênico 17β -estradiol. (Sumpter, 1998) (Lopes et al., 2010) O aumento na produção da VTG, dentre outros efeitos biológicos, também foi observado em peixes expostos a efluentes de estações de tratamento de esgotos a um certo período de tempo. (Liu et al., 2012) Além da feminilização de peixes machos, a exposição prolongada aos estrogênios também tem sido associada com o aumento da incidência de câncer de testículos e da infertilidade masculina. (Rodríguez-Mozaz et al., 2004)

- *Alquilfenóis e Bisfenol A*

Os alquilfenóis (AP) são substâncias formadas por um grupamento fenólico ligado a uma cadeia alquílica e são utilizados principalmente na produção dos alquilfenóis etoxilatos (APE). São compostos de origem antrópica e ubíquas no meio ambiente. Podem ser comumente encontrados na água como contaminantes, devido ao lançamento de efluentes industriais e águas residuais de estações de tratamento de efluentes (líquido e lodo), como também devido à aplicação de pesticidas (Quednow e Püttmann, 2008; Silva et al., 2007).

AP e APE são amplamente utilizados nas mais diversas atividades industriais. Suas principais aplicações estão na produção de detergentes e tintas, como dispersantes em pesticidas e como emulsificantes em produtos de cuidados pessoais. Em menor proporção, são empregados como plastificantes, na produção de filme plástico transparente para envolver alimentos (Hotta et al., 2010; Vitali et al., 2004).

Dentre os alquilfenóis, o 4 n-octilfenol (OP) (Fig. 2a) e o 4 n-nonilfenol (NP) (Fig. 2b) são os compostos de maior importância ambiental devido à escala em que são produzidos e liberados no ambiente (Ghiselli e Jardim, 2007). Estes são insumos industriais para a produção de detergentes não-iônicos industriais e de uso doméstico, são usados como plastificantes e elastômeros, como facilitadores do processo de polimerização do acrílico e do acetato de vinila e como estabilizantes do látex, além de utilização na indústria têxtil e como propelentes de pesticidas (Markey et al., 2001).

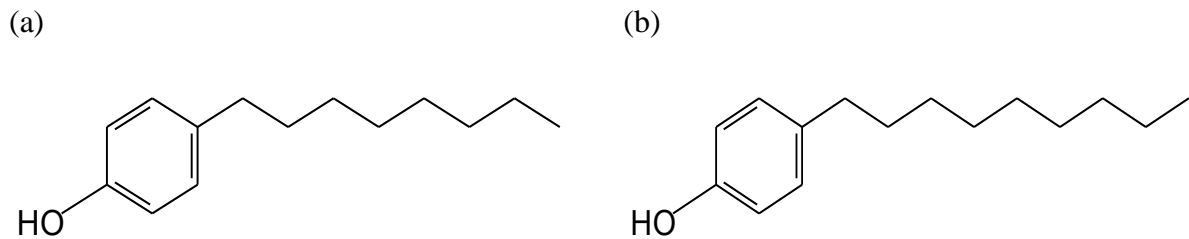


Figura 2: Alquilfenóis: (a) 4 n- octilfenol (OP); (b) 4 n- nonilfenol (NP)

Em estações de tratamento de esgoto (ETE), os processos de biodegradação dos alquilfenóis etoxilados são bastante complexos. Várias transformações sob condições aeróbicas e anaeróbicas têm sido propostas, levando à biotransformação principal dos produtos representada na figura 3 (Jahnke et al., 2004). A biodegradação dos compostos geralmente é iniciada com um encurtamento da cadeia etoxilada, levando a formação de APE de cadeia curta contendo uma ou duas unidades de óxido de etileno. A deetoxilação completa tem sido observada apenas sob condições anaeróbicas (Ying et al., 2002).

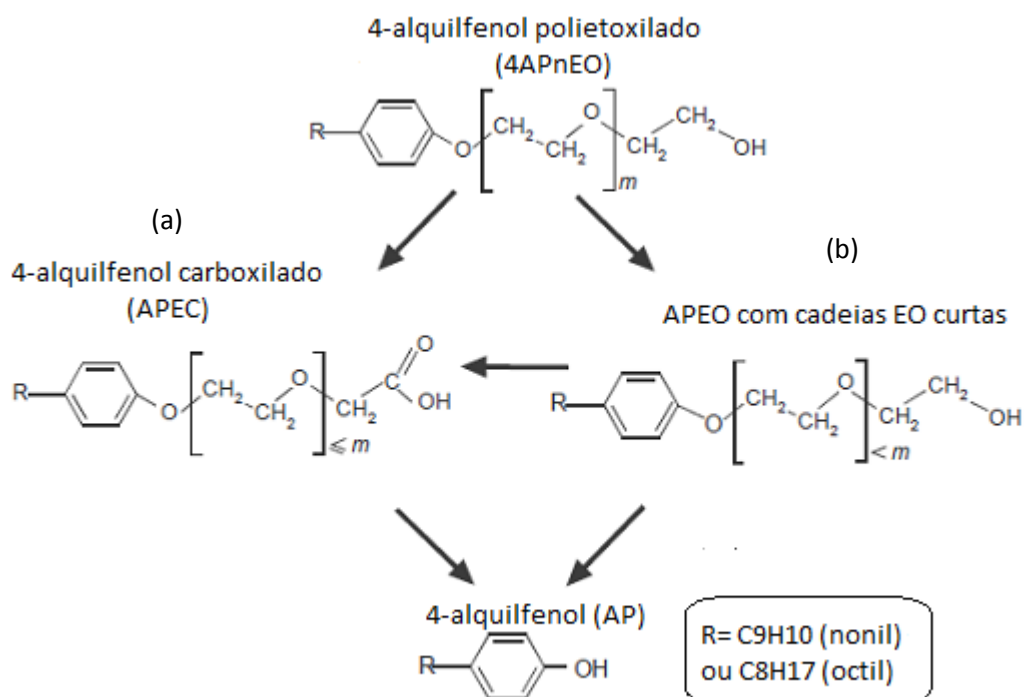


Figura 3: Biotransformação dos alquilfenóis polietoxilados em estações de tratamento de esgotos sob condições aeróbicas (a) anaeróbicas (b) (Jahnke et al., 2004).

Os produtos de degradação (OP e NP) possuem um caráter altamente lipofílico permitindo uma elevada afinidade com as partículas presentes no meio ambiente, sejam elas, sólidos em suspensão, sedimentos e/ou lodos de esgoto. Estes produtos possuem a capacidade de mimetizar hormônios naturais, interagindo com os receptores de estrogênio nos organismos superiores (Soto et al., 1991). Eles também podem se acumular no tecido adiposo dos organismos marinhos como o mexilhão e camarão, bem como em peixes de água doce. O NP e o OP tem uma menor solubilidade em água do que os alquilfenóis polietoxilados que os originam, (Smith and Coffey, 2001) e tendem a ser adsorvidos por partículas por causa de sua grande hidrofobicidade (Wang et al., 2009). A Tabela 2 mostra as propriedades físico-químicas dos alquilfenóis.

Tabela 2: Propriedades físico-químicas dos alquilfenóis e alquilfenóis polietoxilados

Substancia	Massa Molecular	Solubilidade em água (mg L ⁻¹ a 20°C)	Log K _{OW} ^a	K _{OC} ^b (1/Kg)	Meia-vida ^c (dias)
n-Nonilfenol (nNP)	220,0	5,43	4,48	245,47	30
Nonilfenol monoetoxilado (NPE1)	264,0	3,02	4,17	288,40	
Nonilfenol dietoxilado (NPE2)	308,0	3,38	4,21	151,36	
Nonilfenol trietoxilado (NPE3)	352,0	5,88	4,20	74,131	
Nonilfenol tetraetoxilado (NPE4)	396,0	7,65	4,30		
n-Octilfenol (OP)	206,0	12,6	4,12	151,36	8,1-51
Octilfenol monoetoxilado (OPE1)	250,0	8,00	4,10		
Octilfenol dietoxilado (OPE2)	294,0	13,2	4,00		
Octilfenol trietoxilado (OPE3)	338,0	18,4	3,90		
Octilfenol tetraetoxilado (OPE4)	384,0	24,5	3,90		
Bisfenol A (BPA)	228,3	120	3.30		

Fonte: Ying et.al. (2002)

a- coeficiente de partição octanol/água; b- constante sorção de carbono orgânico; c- meia vida em água de rio

O bisfenol A, BPA, pertencente ao grupo dos bis(hidroxifenil) metanos. Ele é um dos compostos químicos mais importantes produzidos no mundo (Rippen, 1998). Sua produção comercial teve início na década de 1950, e desde então tem apresentado um crescimento

contínuo em todo o mundo (Guo et al., 2015). Os Estados Unidos, Taiwan e Japão se destacam como os maiores produtores de BPA, com 22,9%, 13,1 % e 13% da produção mundial, respectivamente (Ozaki et al., 2004). A maior parte do BPA produzido mundialmente (74 %) é utilizado na produção de policarbonatos e em menor quantidade (20%) como resinas epóxi, (Genuis et al., 2012) tais como mamadeiras, selantes em odontologia, brinquedos infantis, materiais de construção e dispositivos médicos (Yi et al., 2010; Troiano e Goodman, 2009; Kang et al., 2006).

Por muitos anos o BPA foi tratado como uma substância neutra para a saúde humana. Apenas em 1996, o BPA foi classificado pela Comissão Europeia como uma substância exógena, com efeito nocivo à saúde humana. Estudos toxicológicos e bioquímicos confirmaram que o BPA tem propriedades estrogênicas e um efeito agonístico sobre o receptor estrogênico (Ballesteros-Gómez e Rubio, 2011; Vitali et al., 2004).

No ambiente, o BPA é considerado um contaminante pseudo-persistente, mesmo apresentando um curto tempo de meia-vida, e ubíquo devido à libertação contínua, principalmente por efluentes industriais (Oehlmann et al., 2009).

Devido às propriedades físico-químicas como elevado ponto de fusão e solubilidade moderada em água, o BPA pode ser considerado um composto pouco hidrofóbico e com uma moderada capacidade de bioacumulação. Sendo assim, é esperado a presença de BPA em compartimentos ambientais abióticos associados a água e sólidos em suspensão (~53%), no solo (~25%), ou sedimentos (~23%) (Cousins et al., 2002; Staples et al., 1998).

- *Ftalatos*

Ftalatos, ou ésteres do ácido ftálico, são um grupo de compostos industriais com estruturas químicas semelhantes – ésteres dialquil ou alquil/aryl derivados do ácido 1,2-benzenodicarboxílico. As propriedades químicas e físicas dos ftalatos (Tabela 3) dependem da natureza da cadeia lateral alquil ou aril.(Kato et al., 2005) (Latini et al., 2009)

Os ftalatos são amplamente utilizados como aditivos para polímeros na fabricação de plásticos, borracha, materiais de construção, equipamentos médicos, brinquedos para crianças com o objetivo de melhorar a sua flexibilidade (Liu et al., 2015; J. Li et al., 2008; Sumpter, 1998).

Os ftalatos são produzidos em grande escala e possuem uma ampla aplicação, resultando em uma extensa exposição aos seres humanos e também à biota (Meng et al., 2014; Magdoui et al., 2013; Cheng et al., 2013). Apesar do forte impacto ambiental, o di-(2-etilhexil)-ftalato (DEHP) é o mais utilizado dos ftalatos, devido à sua estabilidade, fluidez e baixa volatilidade (Aparicio et al., 2007). Outros ftalatos bastante utilizados são o dimetilftalato (DMP), dietilftalato (DEP), di-n-butilftalato (DnBP), e o di-n-octil-ftalato (DnOP).

Ftalatos geralmente são liberados para o meio ambiente durante o processo de fabricação e são frequentemente encontrados nos efluentes de águas residuais, lodos, solos, sedimentos e águas superficiais (Prokkola et al., 2016; Bergé et al., 2013).

Nos seres humanos, a exposição aos ftalatos pode estar associada a efeitos de saúde adversos como problemas neurológicos (Whyatt et al., 2012), baixa qualidade do sémen, (Huang et al., 2011) abortos espontâneos (Toft et al., 2012), asma e alergias (Hsu et al., 2012), câncer de mama (Hsieh et al., 2012) e obesidade (Hatch et al., 2011).

Tabela 3: Propriedades físico-químicas dos ftalatos

Composto	Massa molar (g mol ⁻¹)	Pressão de vapor (Pa)	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	Log K _{ow}
dimetilftalato (DMP)	194	2,58 x 10 ⁻¹	7,27	1,4
dietilftalato (DEP)	222	1,33 x 10 ⁻¹	1,10 x 10 ³	2,4
dibutilftalato (DBP)	278	3,60 x 10 ⁻³	1,12 x 10 ¹	4,5
butilbenzilftalato (BBP)	312	6,67 x 10 ⁻⁴	2,70	4,6
di-(2-etilhexil)-ftalato (DEHP)	391	1,33 x 10 ⁻⁵	3,00 x 10 ⁻³	7,5

Fonte: Tan et al. (2007b)

3.3 Técnicas Analíticas Empregadas na Determinação de IE em Amostras Sólidas

- *Procedimentos de Pré-tratamento e Extração de Amostras*

Amostras de matrizes ambientais, de um modo geral, são complexas com grandes quantidades de potenciais interferentes. Embora tenha havido avanços significativos no que se refere à instrumentação e aos métodos analíticos nos últimos anos, os procedimentos de pré-tratamento de amostras devem ainda ser considerados antes da determinação instrumental dos IE. O desenvolvimento de métodos de preparo de amostras visa encontrar procedimentos em que são priorizados a mínima manipulação das amostras, o uso de mínimas quantidades de

solventes, de energia e de baixo custo, além da miniaturização, simplificação, automação e economia, de acordo com as prerrogativas da Química Verde (Yan e Wang, 2013; Farré et al., 2010).

O preparo da amostra para a determinação e quantificação de compostos orgânicos é baseado em três etapas principais: extração, *clean up* e pré-concentração. A etapa de extração consiste em um procedimento realizado para separar os analitos da matriz da amostra. Na etapa de *clean up* os possíveis interferentes na análise, os quais dificultam a identificação e quantificação dos compostos de interesse, são removidos. Como, em amostras ambientais, os IE geralmente encontram-se em concentrações abaixo dos limites de detecção das técnicas analíticas, é necessário pré-concentrar o analito de interesse antes da etapa da determinação.

As técnicas de preparo de amostras ambientais podem ser classificadas de acordo com o tipo de matriz a ser analisada. As estratégias analíticas podem ser agrupadas para amostras sólidas (material particulado em suspensão, sedimento e biota, por exemplo) e amostras líquidas (água de rio e lagos, águas estuarinas, águas marinhas e águas subterrâneas). Por sua vez, as técnicas de extração de IE em amostras de água são: extração em fase sólida (SPE), microextração em fase sólida (SPME), microextração em fase líquida (LPME), microextração em barra sortiva (SBSE) e microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) (Richardson e Ternes, 2014; Montesdeoca-Esponda et al., 2013; Tadeo et al., 2012; Wu et al., 2010) (Gallart-Ayala et al., 2010)Farré et al., 2012 Farré et al., 2010; Gentili et al., 2008). A extração de amostras sólidas, convencionalmente, é executada por meio da técnica de extração de Soxhlet a qual pode oferecer altos rendimentos de extração (Meng et al., 2014). Apesar disso, a extração por Soxhlet apresenta alguns inconvenientes: longo tempo para extração (tipicamente 4-24 h por amostra), o uso de grande quantidade de solventes (200 – 500 mL), gerando assim grande quantidade de resíduos, e a dificuldade de automação e miniaturização. Estas desvantagens mostram gradual substituição dessa técnica por métodos de extração mais eficientes. Essas técnicas de extração também têm sido desenvolvidas com o objetivo de não apenas reduzir os tempos de extração e grandes quantidade de solventes utilizados, como também para melhorar a precisão, taxas de recuperação e limites de detecção e quantificação da extração (Samaras et al., 2011; Parera et al., 2004). Essas técnicas incluem a extração assistida por ultrassom (UAE), extração assistida por micro-ondas (MAE), extração com fluido supercrítico (SFE) e extração por líquido pressurizado (PLE) (Tabela 4). Abaixo segue as discussões sobre essas técnicas.

Extração assistida por ultrassom: A UAE é realizada aplicando uma determinada frequência sonora num banho ultrassônico ou com outros dispositivos, tais como sondas, sonoreator ou microplacas (Santos e Capelo, 2007). A energia ultrassônica provoca um efeito conhecido como cavitação, que gera a produção de numerosas pequenas bolhas em meio líquido e a erosão mecânica em sólidos, incluindo a ruptura das partículas (Capelo e Mota, 2005). As bolhas de cavitação geradas durante a extração podem alcançar temperaturas e pressões internas elevadas. Quando as bolhas colapsam ocorre a propagação do solvente através da matriz da amostra em considerável velocidade, promovendo a extração do analito. Este processo promove a fragmentação da matriz da amostra em partículas menores disponibilizando áreas superficiais maiores à ação do solvente (Zuloaga et al., 2012; Bossio et al., 2008).

Extração assistida por micro-ondas: A MAE utiliza micro-ondas para promover o movimento molecular e de rotação do líquido com dipolo permanente, levando a um rápido aquecimento do solvente e da amostra, a fim de que ocorra a partição dos analitos de interesse da matriz da amostra para o solvente (Wang et al., 2007; Camel, 2000). A MAE possibilita que várias amostras sejam extraídas, com pequenos volumes de solvente (i.e., 10 a 30 mL), simultaneamente (Kinsella et al., 2009), em um tempo de extração relativamente curto (20 – 40 min). Em procedimentos envolvendo a MAE são utilizados recipientes fechados de PTFE, que são resistentes a pressão, onde são adicionados o solvente e a amostra. A pressão, aliada à ação das micro-ondas, provoca a extração dos analitos da matriz das amostras. Entre outras vantagens, o emprego de fornos de micro-ondas com cavidade reduz risco de perdas de analitos por volatilização e minimiza o risco de contaminações devido ao ambiente de trabalho. A MAE apresenta ainda outras vantagens tais como degradação mínima de compostos termolábeis sob condições otimizadas de operação, baixo consumo de solventes, baixo tempo de extração e alto rendimento das amostras quando são usados sistemas modernos. No sentido de eliminar o uso de solventes orgânicos, a MAE também é compatível com água pura ou ultrapura como solvente extrator para recuperar uma ampla variedade de compostos de polaridade intermediária (Teo et al., 2013).

Extração com fluido supercrítico: A SFE consiste em uma técnica analítica que emprega como solvente extrator um fluido no estado supercrítico (Lanças, 2002). Por fluido no estado supercrítico entende-se um estado de gás denso em que o fluido combina as propriedades desejáveis de um líquido e de um gás, tais como alta difusividade, baixa viscosidade e alta solubilidade permitindo assim o fluido permear através da matriz sólida da

amostra, favorecendo a extração dos analitos. A SFE apresenta a vantagem de não utilizar solventes orgânicos, logo não há gasto de tempo com remoção de solvente, que em sua maioria são tóxicos. Por outro lado, possui custo elevado e o analito deve ser solúvel no fluido supercrítico. Muitos fluidos supercríticos vem sendo investigados, sendo que o mais utilizado é o dióxido de carbono (CO₂). O CO₂ chega ao estado supercrítico em condições de pressão e temperatura relativamente baixas (i.e., 7 MPa e 31,3°C). Adicionalmente, é quimicamente inerte, não inflamável e não corrosivo (Fidalgo-Used et al., 2007). Uma limitação no uso do CO₂ no estado supercrítico é a sua baixa polaridade, o que pode acarretar às extrações baixas recuperações. No entanto, isso pode ser melhorado com o emprego de solventes auxiliares (co-solventes) que aumentam a polaridade do fluido. Nesse processo, pequenas quantidades de um solvente (por exemplo, metanol, acetonitrila, e hexano) são adicionadas ao fluido antes da extração. Essa estratégia aumenta a polaridade do fluido extrator (CO₂/co-solvente) e permite adequar as condições de extração às necessidades dos analitos a serem extraídos (Herrero et al., 2010; Lanças, 2002) apesar do CO₂ perder algumas de suas propriedades (Farré et al., 2010).

Extração por líquido pressurizado: A extração acelerada por solventes (ASE) ou extração por líquido pressurizado (PLE) utiliza solventes que são levados próximos à região supercrítica de pressão e temperatura, onde estes demonstram melhores propriedades de extração. O uso combinado de altas pressões (500 a 3000 Pa) e elevadas temperaturas (50 a 200 °C) possibilitam um processo de extração rápido (5 a 10 min), com menor quantidade de solvente em comparação à extração por Soxhlet (Carabias-Martínez et al., 2005) e aproxima-se das condições de extração da SFE. Em altas temperaturas, os percentuais de recuperação dos analitos aumentam, uma vez que a viscosidade e a tensão superficial diminuem permitindo uma maior difusão do solvente na amostra e maior solubilidade dos analitos (Carabias-Martínez et al., 2005; Richter et al., 1996).

Embora a extração com Soxhlet seja reconhecida como um método tradicional para amostras sólidas, este é um procedimento de trabalho intensivo e moroso, requer grandes quantidades de solvente, e suscetível a contaminação da amostra. Neste contexto, essas novas técnicas surgem como alternativas limpas uma vez que, essas técnicas diminuem o tempo de extração e manuseio da amostra. Elas também reduzem o consumo de solvente quando comparado à extração por Soxhlet. Além disso a UAE e a MAE, são técnicas simples de fácil implementação, não requerem instrumentação sofisticada e a possibilidade de extração simultânea de diferentes amostras, sem interferências. No entanto quando comparada a UAE,

a MAE possui um custo mais elevado. Outra técnica que se apresenta simples, rápida e de fácil automação é a ASE, porém demanda uso de equipamentos mais caros. A SFE é uma técnica ainda pouco comum e não possui uma grande aplicabilidade, no entanto possui uma grande vantagem de não necessitar da etapa de *clean up*. Quanto aos limites de detecção e percentuais de recuperações apresentados na literatura para as MAE, PLE, UAE e SFE são variáveis em função das diferentes massas de amostra, volumes de solventes e equipamentos de determinação utilizados.

- *Técnicas de Determinação de IE em Amostras Ambientais*

Os IE são analisados, em sua grande maioria, através da cromatografia líquida com detectores de ultravioleta, fluorescência, e/ou espectrômetro de massas ou por cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas (Selvaraj et al., 2014; Zhang et al., 2014; Melo e Brito, 2013; Villar-Navarro et al., 2013; Lisboa et al., 2013; Ribeiro et al., 2009; Bossio et al., 2008; Ebinghaus e Xie, 2007; Fatoki e Noma, 2001; Khim et al., 1999). O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (informação estrutural e grande seletividade) (Vekey, 2001). Na Tabela 4 encontram-se uma série de estudos em que são empregados diferentes detectores aliados a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida (LC) para a determinação de IE em matrizes ambientais.

A cromatografia a gás é uma técnica relativamente barata, rápida e reproduzível para um grande número de compostos em amostras ambientais. Além disso, a GC é uma técnica apropriada pela sua alta resolução e a capacidade de ser acoplada a detectores seletivos e sensíveis, tais como espectrômetro de massas (MS) e detector por captura de elétrons (ECD), dentre outras possibilidades. Entretanto a GC é uma técnica que requer que os analitos sejam voláteis ou semi-voláteis, estáveis termicamente e apolares para favorecer um número máximo de interações sucessivas entre os analitos e a fase estacionária, diminuindo a altura e aumentando o número de pratos teóricos. Para a determinação de maioria dos IE, por cromatografia a gás é imprescindível a utilização de procedimentos de derivatização (Farajzadeh et al., 2014; Wu et al., 2010).

A derivatização é necessária devido à presença de grupos hidroxilas, carboxilas e/ou aminas na estrutura de compostos o que lhes conferem certa polaridade. Esta acarreta na baixa

simetria dos picos cromatográficos, co-eluições entre as substâncias estudadas e o “sangramento” das colunas mais comuns de GC, tais como as do tipo DB-1 ou DB-5 (Farajzadeh et al., 2014). O procedimento de derivatização visa: (i) substituir o hidrogênio ácido proveniente de hidroxilas, carboxilas e/ou amina por outros radicais (i.e. acila, metila e silila), conferindo menor polaridade aos derivados, tornando-os mais adequados para a determinação em colunas apolares (ex: DB-1 ou DB-5), e (ii) obter derivados com maior volatilidade e estabilidade térmica (Zuo et al., 2007).

Os agentes derivatizantes rotineiramente empregados são o trimetilclorosilano (TMCS), o N,O- bis(trimetilsilil)acetamida (BSA), N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), N-trimetilsililimidazol (TMSIM), hexametilsililazano (HMDS) e N-metil-N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA), além de mistura entre eles. (Halket et al., 1993) O BSTFA é o reagente mais utilizado para derivatizar os IE. (Arditsoglou e Voutsas, 2008; Zuo et al., 2006; Xie et al., 2006; Basheer et al., 2004). Ele possui baixa degradação térmica e boa solubilidade em solventes orgânicos, além disso, reage rapidamente com os compostos que contém grupos hidroxila, resultando na não co-eluição dos primeiros picos eluídos (Hernando et al., 2004). Entretanto, existem alguns inconvenientes importantes quanto ao uso de derivatizantes para análise cromatográfica. As desvantagens da derivatização são a adição de mais etapas e reagentes durante o preparo da amostra, o que pode levar a incertezas na quantificação. Ainda, a exposição do analista aos reagentes derivatizantes é indesejável do ponto de vista ocupacional, além do uso de excesso de reagente derivatizante para garantir o rendimento da reação e da possibilidade de reações secundárias, o que levará a presença de produtos de reações indesejáveis que podem potencialmente se tornarem interferentes na análise (Farajzadeh et al., 2014).

Apesar dos inconvenientes associados à etapa de derivatização dos analitos e a posterior análise de IE por GC, essa técnica é muito robusta e, quando associada a espectrometria de massas, se torna uma ferramenta analítica poderosa, pois fornece informações da estrutura molecular do composto além de ser altamente seletiva e sensível (Hernández et al., 2012; Wu et al., 2010). Além disso, o propósito da derivatização também é a melhoria dos limites de detecção (LD), seletividade ou ambos (Farajzadeh et al., 2014).

Por outro lado, um número crescente de trabalhos vem utilizando a cromatografia líquida (com detectores de arranjo de díodos, fluorescência e/ou de massas) como técnica de análise dos IE em amostras ambientais (Lisboa et al., 2013; Jardim et al., 2012; Zhang et al., 2012; Matějčíček, 2011; Montagner and Jardim, 2011; Campíns-Falcó et al., 2010; Puy-

Azurmendi et al., 2010; Senthil Kumar et al., 2008; Nieto et al., 2008; Schlenk et al., 2005; Labadie and Budzinski, 2005; Jonkers et al., 2003; Ferguson et al., 2000). Os detectores que trabalham na região do ultravioleta como, por exemplo, arranjo de diodos (DAD) e fluorescência (FLD), têm sido empregados para análise de traços de IE. Devido à sua facilidade de uso e aplicabilidade para compostos com grupos cromóforos, o DAD tem sido bastante utilizado em métodos baseados em HPLC. Além de simplicidade e baixo custo, o DAD têm demonstrado a capacidade de fornecer os limites de detecção numa concentração igual ou inferior a $1\mu\text{g L}^{-1}$ para compostos classificados como IE (Montagner and Jardim, 2011). Detectores de fluorescência são específicos para espécies que apresentam grupos fluóforos, tais como anéis aromáticos e/ou dupla ligações conjugadas. Quando comparado ao DAD, o FLD é mais sensível do que detectores de absorvância na região do UV-VIS. Como vantagem, na cromatografia líquida, a etapa de derivatização torna-se desnecessária. Elimina-se assim, procedimentos relativamente complicados de derivatização que podem levar a uma subestimação dos níveis ambientais ou mesmo contaminar as amostras durante suas etapas de preparo. Outras vantagens interessantes da LC é que a mesma é adequada para a determinação de poluentes orgânicos polares, de substâncias termolábeis e/ou que se decompõem facilmente (e que não seriam adequadamente analisadas por GC).

Com os recentes avanços da cromatografia líquida tais como sistemas cromatográficos que trabalham a elevadas pressões (*ultra high pressure liquid chromatography, UHPLC*) e/ou de análise ultra-rápida (*ultra fast liquid chromatography, UFLC*), aliados às colunas mais eficazes (i.e. com menores diâmetros (1 ou 2 mm) e de tamanho de partículas reduzidos (tipicamente $1,7\ \mu\text{m}$) e detectores mais eficientes, tem tornado esta uma alternativa atraente para a determinação de IE em amostras ambientais (Lisboa et al., 2013; Ye et al., 2013b). Implicações dessas configurações de LC são o uso de elevadas pressões reduzindo significativamente o tempo total da corrida cromatográfica (10 minutos ou menos). Ao diminuir o tamanho das partículas que compõem as colunas de LC, é reduzida também a altura equivalente a um prato teórico, conseguindo picos cromatográficos mais estreitos e melhorando a seletividade da separação. Desse modo, é possível também diminuir o comprimento das colunas sem sacrificar o poder de separação. Conseqüentemente, o método é mais rápido, sem perder a qualidade da separação (Richardson and Ternes, 2014; Richardson, 2012; Hernández et al., 2012; Farré et al., 2010).

Há também a possibilidade de variar a temperatura da fase móvel (geralmente 25-65 °C), o que ocasiona uma redução na viscosidade dos solventes e um aumento da difusividade

dos analitos, necessitando de uma quantidade menor de solvente e menor tempo para realizar a separação (Farré et al., 2010). As colunas de LC mais comuns e amplamente utilizadas são de fase reversa do tipo C8, C18 e/ou fenil, apesar de colunas de fase normal também serem usadas (Lisboa et al., 2013; Gallart-Ayala et al., 2013).

Com os avanços recentes em LC, GC, tipos de colunas, detectores, o acoplamento com a espectrometria de massas e a velocidade de aquisição de dados vem proporcionando melhorias significativas na separação de amostras complexas em análises curtas, com pouco uso de solventes, melhor seletividade e sensibilidade. Com isso, a tendência atual e futura é detectar os IE em níveis de concentração cada vez mais baixos, em um número cada vez maior de lugares do mundo e em matrizes ambientais mais variadas.

Tabela 4: Comparação entre tipos de amostras, procedimentos de pré-tratamento, técnica analítica e limites de detecção de interferentes endócrinos

Compostos	Tipo de amostra	Preparo de Amostra	Derivatização	Técnica de análise	Limite de detecção	Referência
E1; E2; EE2; OP; NP	Sedimento	ASE	MTSFA	GC-MS	0,03-1,27 ng g ⁻¹	(Zhang et al., 2009)
DEHP	Lodo de esgoto	SFE	Não	GC-EID	1,74 mg Kg ⁻¹	(Cheng et al., 2008)
E1; E2; E3	Solo	ASE	MSTFA	GC-MS	1,0-5,0 ng mL ⁻¹	(Beck et al., 2008)
BPA; BBP;DBP;DEHP	Sedimento Água	Soxhlet SPE	Sylon BTZ	GC-MS/MS	0,02-0,05 µg Kg ⁻¹ 0,02-0,03 µg L ⁻¹	(Fromme et al., 2002)
Ftalatos	Solos	ASE	Não	GC-MS	0,02-0,29 mg Kg ⁻¹	(Ma et al., 2013)
E1; E2; E3; EE2; BPA	Sedimento Lodo de esgoto	UAE	Cloreto de dansilo	UHPLC-MS/MS	0,1-3,0 ng g ⁻¹ 0,02-0,5 ng g ⁻¹	(Yu et al., 2011)
E1; E2; E3; EE2	Sedimento	UAE	Não	LC-MS/MS	0,03-0,3 ng g ⁻¹	(Isobe et al., 2006)
NP; OP	Mexilhão e chumbinho	SPME	Não	GC-MS	0,05-35,0 µg Kg ⁻¹	(Bouzas et al., 2011)
NP	Sedimento Mexilhão e ostra	Digestão ácida Soxhlet	BSTFA	GC-MS	3,0 ng g ⁻¹ 0,4 ng g ⁻¹	(Wang et al., 2010)
E1; E2; E3; EE2; mestranol (MES), dietilestilbestrol (DES), BPA; NP	Água Sedimento Biota	SPE UAE UAE	Não	HPLC-ESI-MS	0,1-2,9 ng mL ⁻¹ 0,2-5 µg Kg ⁻¹ 0,3-5 µg Kg ⁻¹	(Pojana et al., 2007)
E1; E2; EE2	Sedimento	MAE	Não	HPLC- iontrap MS	90-250 ng g ⁻¹	(Matějčíček, 2011)
E1; E2; EE2	Sedimento	MAE	Não	LC-TOF-MS	15-49 pg g ⁻¹	(Labadie and Hill, 2007)

3.4 Interferentes Endócrinos na Biota

Apesar da alta complexidade das amostras, a determinação e quantificação de IE na biota tem se tornando uma questão muito importante. Além de refletir a contaminação dos organismos, ela pode também revelar a transferência de um contaminante através da cadeia alimentar e fornecer dados para entender e quantificar danos nos organismos e em suas comunidades (Picó and Barceló, 2012).

Mesmo não havendo muito conhecimento sobre a fisiologia endócrina de muitos grupos de invertebrados que compõem os ecossistemas marinhos, alguns estudos relatam danos causados à biota exposta à contaminação por IE. Duft et al., 2003 relataram um aumento na produção de embriões de caracóis após a exposição de 8 semanas a sedimentos contaminados com 10 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de NP. Czech et al., 2001 relataram uma diminuição da produção de ovos após uma semana de exposição de 12 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de NP em caracóis da espécie *Lymnaea stagnalis*. Na espécie *Potamopyrgus antipodarum*, sedimentos contaminados com 30 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de EE2 causaram um aumento da produção de embriões (Duft et al., 2003). Para as mesmas espécies, expostas a concentrações de 25 e 100 ng L^{-1} de EE2, foi observado um aumento significativo na produção de novos embriões (Jobling et al., 2003). Segner et al. 2003 relataram um aumento da produção de ovos e uma incubação retardada de *Lymnaea stagnalis* expostas a 500 ng L^{-1} de EE2. Em *Marisa cornuarietis* expostas ao EE2 na concentração de 500 ng L^{-1} não foi percebido nenhuma alteração na produção de ovos, mas houve uma indução na ocorrência de impossex dependente ao tempo de exposição (Tillmann et al., 2001). Peixes (*Carassius auratus*) expostos a uma concentração de 100 ng g^{-1} de EE2, por meio da alimentação, por um período de 72 horas apresentaram concentração média de EE2 de 17,7 ng g^{-1} (Al-Ansari et al., 2011).

Isobe et al., 2007 mediram as concentrações de OP e NP em mexilhões de diversos países ao longo das costas do Sul e do Sudeste Asiático. O NP quantificado nos mexilhões variou de 18 ng g^{-1} na Malásia até 1347 ng g^{-1} na Baía de Tóquio. As concentrações de OP foram mais baixas, com um valor mínimo de 0,73 ng g^{-1} e o máximo de 54,4 ng g^{-1} . Concentrações de NP e OP semelhantes foram encontradas também em mexilhões coletados na Lagoa de Veneza (Pojana et al., 2007), no Mar Adriático (Ferrara et al., 2001) e na Baía Masan (Li et al., 2008a) os níveis encontrados variaram de 51-290 ng g^{-1} (NP) e de 2,7 para 4,9 ng g^{-1} (OP). As maiores concentrações de alquilfenóis em bivalves foram detectadas em ostras cultivadas em Taiwan (Cheng et al., 2006). O NP estava presente até 5190 ng g^{-1} e OP até 1.460 ng g^{-1} . Concentrações elevadas de NP também foram encontrados em camarão no

mar Tirreno (Ferrara et al., 2008), com um valor máximo de 1220 ng g⁻¹. Para o OP a concentração foi de 1370 ng g⁻¹ em caramujos coletados na costa de Taiwan (Cheng et al., 2006). Em cefalópodes do Mar Adriático (Ferrara et al., 2001), as concentrações de NP variam entre 67-696 ng g⁻¹ e de OP foram de 3,6 a 11,5 ng g⁻¹.

Existem poucos estudos que descrevem a presença de BPA em organismos marinhos. Um estudo com mexilhões relatou concentrações de BPA variando entre 0,54 ng g⁻¹ e 213,1 ng g⁻¹ (Isobe et al., 2007). Salgueiro-González et al., 2015 determinaram BPA e alquilfenóis em moluscos da espécie *Corbicula flumínea* no estuário do Rio Minho, localizado na Península Ibérica e encontraram concentrações de até 412 ng g⁻¹ (BPA), 1756 ng g⁻¹ (NP) e 39,7 ng g⁻¹ (t-OP). Em um outro estudo, também realizado na Península Ibérica, no Rio Segre, gastrópodes (*Ancylus fluviatilis*) apresentaram menores concentrações de BPA (8,7 ng g⁻¹) e NP (130 ng g⁻¹). No entanto, foi detectada a presença da estrona (17,6 ng g⁻¹) nestes organismos. Gu et al., 2014 determinaram 15 IE em frutos do mar, dentre eles cinco ftalatos (DMP, DEP, DBP, DnOP e DEHP), quatro alquilfenóis (NP, OP e t-OP) e BPA. Foi observada a presença de todos os compostos nos peixes, moluscos e camarão analisados. Os ftalatos foram encontrados em maiores concentrações (219 ng g⁻¹), seguido dos alquilfenóis (62 ng g⁻¹) e do BPA (8,6 ng g⁻¹). De um modo geral, as concentrações encontradas de alquilfenóis e bisfenol A em mariscos são mais elevadas do que os valores obtidos para peixes, uma vez que aqueles animais, geralmente, são filtradores e tendem a acumular uma maior quantidade de contaminantes (Basheer et al., 2004).

A contaminação de ambientes aquáticos pode ser monitorada através de espécies biomonitoras. Bivalves são organismos abundantes em ecossistemas aquáticos. Eles apresentam alta tolerância a uma variedade de contaminantes, podendo bioacumular e transferir, ao longo da cadeia trófica, compostos antropogênicos oriundos de diversas fontes (Huerta et al., 2015). Estes invertebrados respondem sensivelmente aos estímulos ambientais e, por isto, são amplamente utilizados como organismos monitores de variações no ambiente aquático, pois podem refletir os níveis de contaminantes presentes *in loco* (Casatta et al., 2015; Pérez et al., 2004).

Mexilhões são um exemplo de bivalve, bastante utilizado como biomonitor de contaminação ambiental. Estes organismos possuem a capacidade de filtrar grandes volumes de água do mar, porém não são capazes de metabolizar os poluentes. Portanto, tendem a acumular uma diversidade de compostos tóxicos presentes na água (Staniszewska et al., 2014). Um outro exemplo de organismos que podem ser utilizados no monitoramento de

contaminação do ambiente são os peixes. Estes podem concentrar contaminantes em seus tecidos não apenas da água, mas também por meio de hábitos alimentares, permitindo assim a avaliação da transferência de contaminantes através da cadeia trófica (Zhou et al., 2007). O impacto da exposição dos organismos aos contaminantes pode ser avaliado por meio da bioacumulação dos compostos nos organismos, e também através dos possíveis efeitos toxicológicos (Huerta et al., 2012).

O nível trófico desempenha um papel importante no perfil dos contaminantes observados em organismos marinhos pois a biotransformação desses contaminantes pode ocorrer em organismos de níveis tróficos superiores (Baumard et al., 1998; Leonards et al., 1997; Broman et al., 1990). Além disso, a posição do organismo na cadeia alimentar, influencia bastante na quantidade absorvida ou eliminada de um contaminante pelos organismos. Este processo é denominado biomagnificação, onde a concentração do composto aumenta ao longo da cadeia alimentar. A biomagnificação ocorre quando as concentrações de um composto nos tecidos de um organismo são mais elevadas do que as concentrações no nível trófico inferior (D'Amato et al., 2002).

A presença e o efeito de IE na biota marinha tem despertado muito interesse da comunidade científica, no entanto ainda há pouco conhecimento sobre este assunto ao redor de todo mundo. No Brasil, ainda não há estudos que relatam a ocorrência de algumas das classes de IE (ex: hormônios estrogênicos, alquilfenóis, bisfenol A e ftalatos) em organismos marinhos.

A Baía de Todos os Santos se destaca como uma das maiores baía do Brasil e compreende em seu entorno importantes atividades industriais, portuárias e antrópicas que podem se caracterizar como importantes fontes de IE para o ambiente. Ainda assim, até o presente momento não há trabalhos publicados envolvendo a determinação e/ou ocorrência de IE na biota da Baía de Todos os Santos. Apenas dois estudos envolvendo água (Lisboa et al., 2013) e sedimento (Beretta et al., 2014) foram encontrados disponíveis na literatura.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Área de Estudo

A Baía de Todos os Santos (BTS) (Figura 4) é a segunda maior baía do Brasil (1233 km²), banhando uma área com cerca de 3 milhões de habitantes e um importante complexo portuário e industrial (petroquímico, químico, têxtil, fertilizantes, alimentício, celulose, etc) (Hatje e de Andrade, 2009). A BTS tem largura máxima de 50 km e nas regiões mais profundas atinge 100 m de profundidade.¹⁸⁰ De uma bacia de drenagem total de 60.000 km², 59.150 km² são drenados por três tributários (rios Paraguaçu, Jaguaripe e Subaé) (Cirano e Lessa, 2007). O rio Paraguaçu é o principal tributário da baía, é responsável por 74% da descarga fluvial total e vazão média anual de 64,3 m³.s⁻¹. A pequena descarga fluvial para a BTS explica as características essencialmente marinhas observadas na maior parte da baía (Dantas et al., 2012).

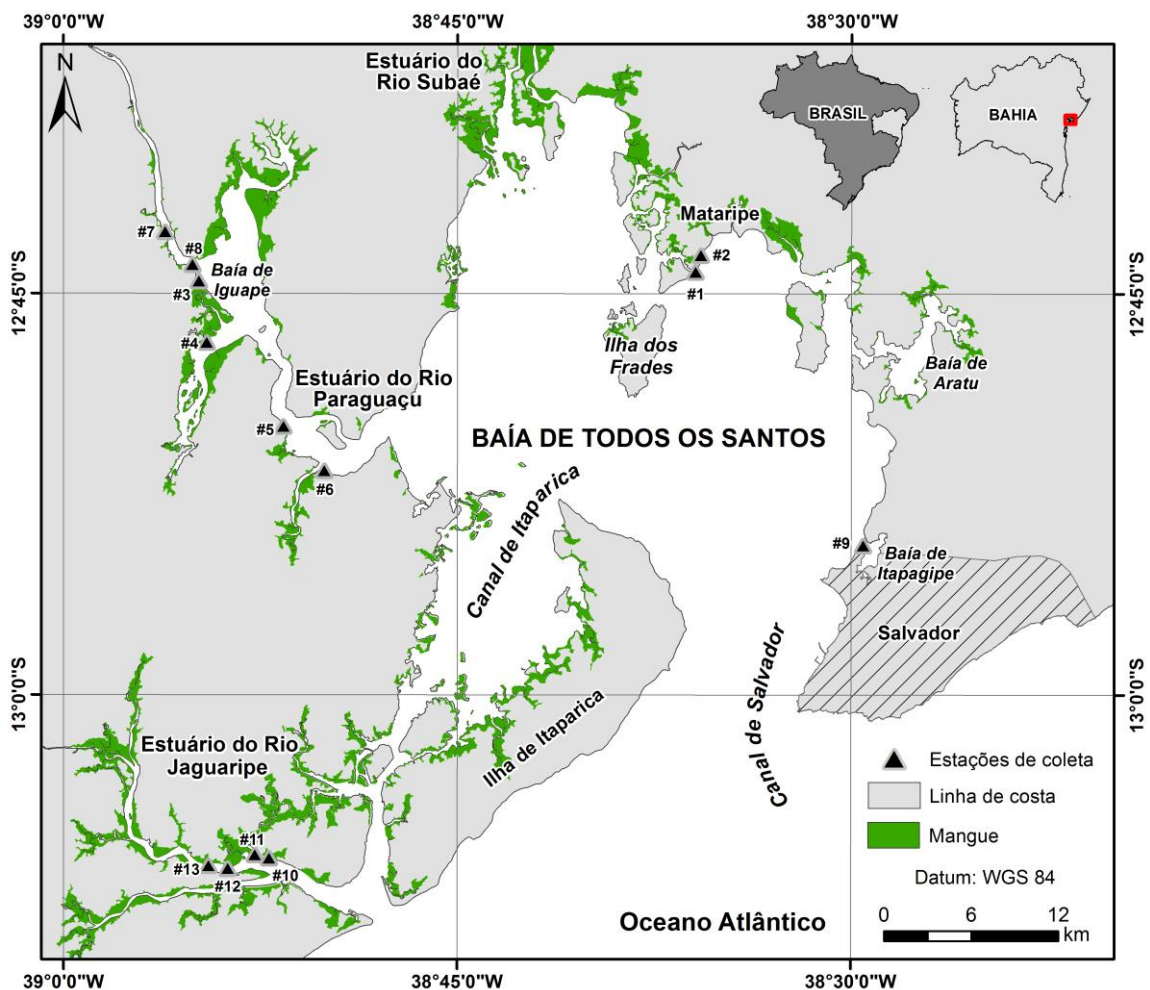


Figura 4: Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil.

Inserida em uma região bastante industrializada e povoada da Bahia, a BTS recebe um grande volume de dejetos residenciais e industriais da Região Metropolitana de Salvador, do Centro Industrial de Aratu, das indústrias na bacia do rio Subaé e do Complexo Petroquímico de Camaçari, além de unidades da Petrobras em seu entorno, como a Refinaria Landulpho Alves.

Atividades econômicas e urbanas desenvolvidas na região da bacia do rio Paraguaçu, juntamente com outras regiões da BTS (ex: os rios Subaé e São Paulo), compõem as principais fontes de impactos ambientais, uma vez que grande parte das cidades banhadas pela bacia não dispõem de qualquer serviço de coleta e tratamento de esgoto sanitário. Na bacia do rio Jaguaripe, a atividade predominante é a agricultura e os principais impactos ambientais são o aterro de manguezais, a disposição inadequada de esgotos sanitários e resíduos sólidos, o uso indiscriminado de pesticidas e corretivos (CRA, 2004). Essas atividades podem causar problemas de contaminação diversos, inclusive por IE.

4.2 Reagentes e Soluções

As soluções, soluções-padrões e eluentes usados nesse trabalho foram preparados utilizando água ultra-pura com resistividade maior que $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ (Milli-Q-Plus, Millipore, USA). Os solventes orgânicos utilizados (acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e diclorometano (DCM)) foram todos de grau HPLC e/ou espectroscópico (J. T. Baker, USA). Utilizou-se também ácido clorídrico 37 % (P.A. Merck, Alemanha) e ácido acético glacial, 99,9 % (J.T. Baker, USA).

Padrões de BPA (99% de pureza, Sigma-Aldrich, USA), 4-n-NP (99% de pureza, Sigma-Aldrich, USA), 4-n-OP (99% grau HPLC, Sigma-Aldrich, USA), 4-t-OP (99% de pureza, Sigma-Aldrich, USA), E1 (99% de pureza, Sigma-Aldrich, USA), E2 (99 % de pureza, Sigma-Aldrich, USA), EE2 (99% grau HPLC, Sigma-Aldrich, USA), E3 (98% de pureza, Sigma-Aldrich, USA), DMP (99 % de pureza, SAFC Supply Solutions, USA), DEP (99% de pureza, SAFC Supply Solutions, USA), BBP (98 % de pureza, Sigma-Aldrich, USA), DBP (99 % de pureza, Sigma-Aldrich, USA), DEHP (99% de pureza, Sigma-Aldrich, USA) e DnOP (98% de pureza, Sigma-Aldrich, USA) foram usados. Soluções estoques de 1000 mg L^{-1} de cada analito foram preparadas em metanol e armazenadas no escuro, a 4°C , por no máximo 3 meses. A confecção dos padrões de menores concentrações foi feita por meio de diluições sucessivas.

4.3 Coleta das Amostras

Todo material de coleta e de laboratório para as análises de IE foi lavado e sonificado por 20 minutos com solução de Extran 10 % (Merck, Alemanha). Os materiais foram então enxaguados com água ultrapura e após secagem, foi feita a descontaminação com diclorometano. Folhas e embalagens de alumínio foram calcinadas a 450 °C por 4 horas e após esfriar, foram também descontaminadas com diclorometano.

- *Bivalves*

Os bivalves – ostra (*Crassostrea rhizophorae*), sururu (*Mytella guyanensis*) e chumbinho (*Anomalocardia brasiliiana*) – foram coletadas manualmente em 13 estações de amostragem no entorno da Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil nas regiões do Rio Paraguaçu, Rio Jaguaripe, Praia da Ribeira e Madre de Deus (Figura 4), georeferenciados na Tabela 5. As amostras foram refrigeradas até a chegada ao laboratório. No laboratório, os bivalves foram lavados com água ultrapura, abertos e os tecidos removidos com o auxílio de uma pinça metálica. Após a lavagem com água ultrapura, o tecido foi congelado.

Tabela 5: Georeferenciamento das estações de amostragem dos bivalves e sedimentos coletados na Baía de Todos os Santos, Bahia –Brasil.

Estações de Amostragem	Local	Latitude	Longitude	Organismo Coletado
#1	Madre de Deus	12° 44' 12,83" S	38° 35' 55,79" W	Ostra/Sururu/Chumbinho
#2	Madre de Deus	12° 43' 35,31" S	38° 35' 43,75" W	Ostra/Chumbinho
#3	Rio Paraguaçu	12° 44' 33,14" S	38° 54' 50,35" W	Ostra/Chumbinho
#4	Rio Paraguaçu	12° 46' 50,91" S	38° 54' 32,52" W	Ostra/Sururu
#5	Rio Paraguaçu	12° 49' 59,19" S	38° 51' 37,06" W	Ostra/Sururu
#6	Rio Paraguaçu	12° 51' 38,42" S	38° 50' 03,70" W	Ostra
#7	Rio Paraguaçu	12° 42' 42,81" S	38° 56' 07,55" W	Ostra/Sururu
#8	Rio Paraguaçu	12° 43' 56,62" S	38° 55' 04,72" W	Ostra/Sururu
#9	Ribeira	12° 54' 26,10" S	38° 29' 32,16" W	Chumbinho
#10	Rio Jaguaripe	13° 06' 7,32" S	38° 52' 09,72" W	Ostra/Sururu/Chumbinho
#11	Rio Jaguaripe	13° 06' 0,30" S	38° 52' 42,36" W	Ostra/Sururu
#12	Rio Jaguaripe	13° 06' 30,84" S	38° 53' 43,98" W	Ostra
#13	Rio Jaguaripe	13° 06' 24,18" S	38° 54' 27,96" W	Ostra

- *Sedimento*

O sedimento superficial referente ao local de coleta dos bivalves foi coletado utilizando-se colheres metálicas, cobertas com folha de alumínio, previamente descontaminadas. O sedimento foi recolhido em um recipiente de vidro âmbar previamente descontaminado. A amostra foi refrigerada e transportada para o laboratório onde foram mantidas congeladas até o momento da análise.

- *Peixes e frutos do mar*

Peixes e mariscos foram comprados em mercados populares da cidade de Salvador – Bahia. Foram adquiridas 10 espécies diferentes de peixe: Raia (*Dasyatis angricana*), Vermelho (*Lutjanus synagris*), Sororoca (*Scomberomorus brasiliensis*), Guaiuba (*Ocyurus crysurus*), Sardinha (*Opisthonema oglinum*), Corvina (*Micropogonis furnieri*), Chumbrega (*Carnx crysus*), Pititinga (*Anchoa lyolepis*), Olho de Boi (*Seriola dumerilli*), Atum (*Thunnus atlanticus*), Pescada Branca (*Cynoscion leiarchus*), Badejo (*Mycteroperca bonaci*) e Dourado (*Salminus maxillosus*), sendo três indivíduos de cada espécie. . No laboratório, foi retirada uma fração do musculo da região abdominal de cada indivíduo, lavada com água ultrapura e congelada. Adicionalmente, foram também adquiridas 6 espécies de frutos do mar: sururu (*Mytella guyanensis*), ostra (*Crassostrea rhizophorae*), chumbinho (*Anomalocardia brasiliana*), caranguejo (*Ucides cordatus*), camarão (*Penaeus subtilis*) e siri (*Callinectes sapidus*). Os tecidos foram removidos e produzidas amostras compostas (~20 vinte indivíduos), as quais foram lavadas e congeladas.

4.4 Preparo das Amostras

Antes das análises as amostras (bivalves, peixes e sedimentos) foram liofilizadas em um liofilizador Alpha 1-4 LDplus (Christ, Alemanha), moídas em um moinho de bolas (8000 D, SPex sample prep., USA) e armazenadas em um dessecador protegidas da luz.

- *Bivalves*

Foram testados dois métodos para extração dos IE nas amostras de bivalves baseados em extração assistida por ultrassom (UAE) e extração assistida por micro-ondas (MAE). Em ambos os casos, testou-se, em triplicata, 5 soluções extratoras: DCM (100%); ACN/DCM 1:1 (v/v); ACN/DCM 1:2 (v/v); ACN/DCM 1:3 (v/v) e DCM/HEXANO 1:1 (v/v).

Uma massa de 0,5 g de amostra foi pesada nos tubos de teflon (MAE) e em tubos de vidro (UAE). Adicionou-se 1 mL de solução de hidróxido de sódio 1,5 mol L⁻¹ e 1 mL de água ultrapura, minimizando as interferências devido ao teor de lipídios presentes nas amostras. A solução foi então agitada, manualmente, por cerca de 60 segundos e em seguida adicionado o solvente extrator, realizando o procedimento de extração. Tanto para a MAE quanto para a UAE, 8 mL de cada solvente extrator foi utilizado, os ensaios foram feitos empregando as duas técnicas, nas seguintes programações:

✓ Extração assistida por microondas (MAE)

Para a realização dos testes foi utilizado um forno de micro-ondas (Multiwave Pro, Anton Paar, USA). Os testes foram realizados com aquecimento desde temperatura ambiente até 115 °C por 5 minutos, permanecendo em 115 °C por 15 min e resfriando até a temperatura ambiente.

✓ Extração assistida por ultrassom

No banho de ultrassom (T760DH, Elma, Alemanha), cada solução foi testada em um tempo de extração de 15 minutos na potência de 120 W e temperatura de 80 °C, limites máximo do aparelho.

Após as extrações, afim de separar as fases aquosa e orgânica, o material foi centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm e a fase orgânica coletada. O *clean up* do extrato foi realizado com cartuchos para SPE – SAMPLIQ SILICA (Agilent Technologies - 1000 mg, 6 mL) previamente condicionados com 2 mL de metanol por duas vezes a um fluxo de 1 ml min⁻¹. O extrato foi filtrado com filtros de seringa de celulose regenerada, seco sob fluxo de nitrogênio, reconstituído em 250 µL de metanol e injetado no sistema de cromatografia líquida.

• *Sedimento*

Um grama de sedimento foi extraído com 7 mL da mistura de solventes ACN/DCM 3:1 (v/v) por sonicação por 10 minutos na potência máxima do aparelho (120 W).

Após a extração, o extrato foi centrifugado à 2500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante recolhido. O *clean up* do extrato foi realizado utilizando cartuchos de florisil (Agilent Technologies, USA - 500 mg, 3 mL), previamente condicionados com 2 mL de MeOH, por duas vezes a um fluxo de 1 mL min⁻¹. Em seguida, os extratos foram filtrados

com filtros de seringa de celulose regenerada, secos sob fluxo de nitrogênio, reconstituídos em 500 µL de metanol e injetado no sistema de cromatografia líquida.

- *Peixes e mariscos*

Para as amostras de peixes e mariscos foi utilizado o método que apresentou melhor resultado para os bivalves. Uma massa de 0,5 g de amostra foi pesada e adicionado, 1 mL de solução de hidróxido de sódio 1,5 mol L⁻¹ e 1 mL de água ultrapura. A solução foi agitada por 30 segundos e levada ao forno de micro-ondas por 15 minutos a uma temperatura de 115°C.

Após a extração o material foi centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm e a fase orgânica coletada. O *clean up* do extrato foi realizado com cartuchos para SPE – SAMPLIQ SILICA (Agilent Technologies - 1000 mg, 6 mL) previamente condicionados com 2 mL de metanol por duas vezes a um fluxo de 1 ml min⁻¹. O extrato foi filtrado com filtros de seringa de celulose regenerada, seco sob fluxo de nitrogênio, reconstituído em 250 µL de metanol e injetado no sistema de cromatografia líquida.

4.5 Análise Cromatográfica

Os métodos cromatográficos utilizados foram baseados nos métodos desenvolvidos por Cotrim, 2015. Foi utilizado um cromatógrafo líquido ultra rápido (LC-20AD_{XR} Prominence, Shimadzu, Japão) equipado com duas bombas de alta pressão (LC-20AD_{XR}, Shimadzu, Japão), degaseificador (DGU-20A3, Prominence, Shimadzu, Japão), autoamostrador (SIL-20A_{XR}, Prominence, Shimadzu, Japão), forno (CTO-20A, Prominence, Shimadzu, Japão), detector de arranjos de fotodiodos (SPD-M20A, Prominence, Shimadzu, Japão) e detector de fluorescência (RF-20A, Prominence, Shimadzu, Japão) ligados em série. A separação foi feita usando uma coluna Shim-pack XR-ODS (150 x 2 mm, 2,2 µm de tamanho de partícula e 8 nm de tamanho de poro). Resumidamente, os IE foram determinados por cromatografia líquida através de um sistema UFLC-DAD-FLD. Como fase móvel foram utilizados água acidificada a 2% (v/v) com ácido acético (solvente A) e acetonitrila (solvente B).

Foram desenvolvidas duas corridas cromatográficas simultâneas utilizando os detectores FLD e DAD em série. Para as espécies 4 t-OP, 4 n-OP e 4 n-NP, foi desenvolvido um método com gradiente de eluição: 0,0-5,2 min, 62% B; 5,2-6,0 min, 62-74% de B; 6,0-9,0 min, 74% de B; 9,0-10,5 min, 100% de B; em 0,5 min 62% B num tempo total de 11 minutos

de corrida, utilizando o detector de FLD ($\lambda_{\text{excitação}}$ 280 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 306 nm). Para as espécies DMP, DEP, BBP, DBP, DEHP e Dn-OP foi utilizado o detector DAD (λ 245 nm). Por último, para as espécies BPA, E1, E2, EE2 e E3, foi usado um método isocrático com 39% de acetonitrila, em um tempo total de corrida de 6,5 minutos, com o detector FLD ($\lambda_{\text{excitação}}$ 280 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 306 nm).

As quantificações foram feitas pelo método da calibração externa, com curvas de calibração com 10 níveis de concentrações. As concentrações variaram de 1,0 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o bisfenol A, alquilfenóis e hormônios; de 5,0 a 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a estrona, e de 200 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os ftalatos.

4.6 Análise de Carbono e Nitrogênio em sedimentos

Para as análises de carbono orgânico (C_{org}) e nitrogênio total (N_{tot}), as vidrarias foram descontaminadas em Extran 10 %, seguido de enxague com ácido clorídrico 6 mol L^{-1} e água ultra pura. Em seguida, foram secos a temperatura ambiente e armazenados em local livre de poeira e contaminação.

Inicialmente, as amostras de sedimento foram descarboxatadas utilizando-se 10 mL de HCl 1 mol L^{-1} para cada 2 g de amostra. Amostras com ácido foram aquecidas a 80 °C em chapa aquecedora. Após a evaporação do ácido, foram realizados três ciclos de lavagem dos sedimentos com 10 mL de água ultrapura. Após a secagem, as amostras foram mantidas em dessecador. A determinação de carbono orgânico e nitrogênio total foi realizada em um analisador elementar (CNS-TruSpec Macro, LECO, USA). Todas as determinações foram feitas em triplicatas. Brancos e materiais de referência certificados de solo (*Soil Calibration Material*, Leco, MI, USA) e sedimentos marinhos (PACS-2, NRC-CNR, Ontário, Canadá) foram utilizados para avaliar a precisão e exatidão da análise. As recuperações obtidas para C_{org} e N_{tot} variaram entre 98 e 101%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento da metodologia de extração de IE em organismos marinhos

- *Seleção do métodos de extração*

Inicialmente foram testados dois métodos de extração para a determinação de IE em organismos marinhos: a extração assistida por micro-ondas (MAE) e a extração assistida por ultrassom (UAE). Para a seleção da metodologia a ser aplicada na extração dos IE, foram realizados ensaios de recuperação em triplicata com amostras de tecido de chumbinho fortificadas e uma amostra como branco. Uma massa de 0,500 g amostra foi fortificada com 100 µL de solução padrão contendo os 14 analitos estudados para concentrações finais de 25 ng g⁻¹ para os alquilfenóis, BPA e hormônios, 125 ng g⁻¹ para a estrona e 5,0 µg g⁻¹ para os ftalatos.

É sabido que amostras biológicas, como os tecidos de bivalves, são altamente complexas devido ao alto teor de gorduras e também de compostos interferentes presentes na matriz. Sendo assim, foi realizado inicialmente a eliminação da gordura presente nas amostras de tecidos dos organismos estudados empregando a reação de saponificação utilizando NaOH. Alguns estudos (Fajar et al., 2008; Navarro et al., 2006; Leonards et al., 1997) apresentam a reação de saponificação como um método alternativo para a extração e limpeza de analitos orgânicos em amostras biológicas.

A eficiência de cada um dos solventes extratores e do método de extração utilizados foi avaliada através de testes de recuperação tendo em vista que este é um parâmetro fundamental quando um método de extração é desenvolvido e validado. Os resultados para esses testes são mostrados na Figura 5. De uma maneira geral, as taxas de recuperação obtidas com a MAE foram superiores as recuperações da UAE (Tabela 6).

Apesar da extração utilizando sistema de ultrassom parecer, à princípio, simples e possivelmente eficiente para a extração de analitos de matrizes sólidas já que a cavitação favoreceria a retirada de moléculas dos analitos de regiões mais internas da matriz da amostra, os melhores resultados foram encontrados utilizando o sistema de micro-ondas. Na MAE, as micro-ondas provocam a excitação das moléculas do solvente o que resulta em seu aquecimento e, conseqüentemente, na extração do analito da matriz.

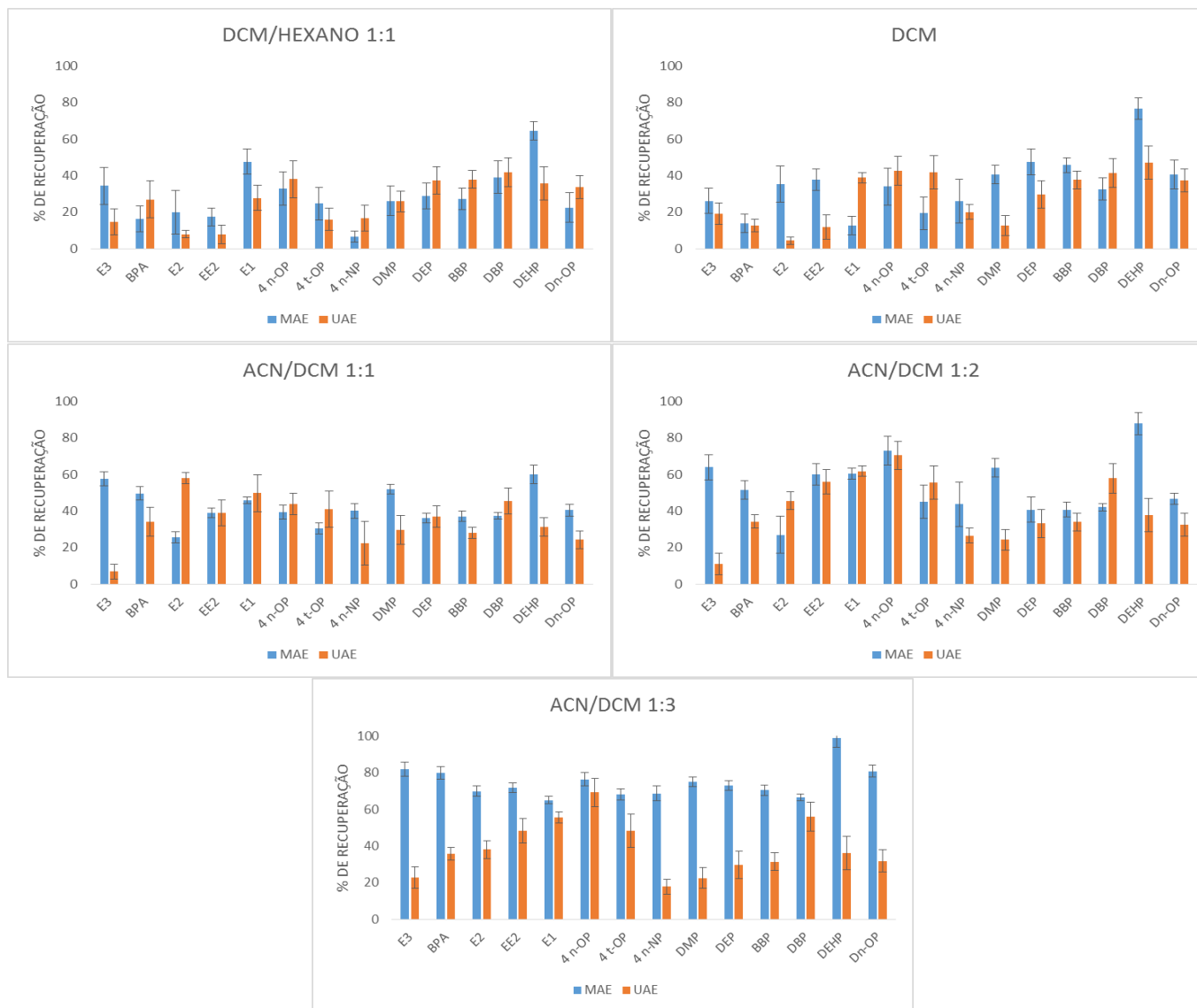


Figura 5: Percentagem de recuperação dos 14 interferentes endócrinos em amostra de tecido de chumbinho fortificadas com solução padrão dos analitos em uma concentração final de 25 ng g⁻¹ para os alquilfenóis, BPA e hormônios, 125 ng g⁻¹ para a estrona e 5,0 µg g⁻¹ para os ftalatos com os solventes extratores estudados.

Tabela 6: Percentagem de recuperação dos 14 interferentes endócrinos extraídos em amostra de tecido de chumbinho fortificadas com solução padrão dos analitos em uma concentração final de 25 ng g⁻¹ para os alquilfenóis, BPA e hormônios, 125 ng g⁻¹ para a estrona e 5,0 µg g⁻¹ para os ftalatos com os solventes extratores estudados.

Solvente extrator Técnica	ACN/DCM 1:1		ACN/DCM 1:2		ACN/DCM 1:3		DCM		DCM/Hexano 1:1	
	MAE	UAE	MAE	UAE	MAE	UAE	MAE	UAE	MAE	UAE
E3	58 ± 4	7,0 ± 4	64 ± 7	11 ± 6	81 ± 4	22 ± 6	26 ± 7	19 ± 6	34 ± 10	15 ± 7
BPA	50 ± 4	34 ± 8	52 ± 5	34 ± 4	80 ± 4	35 ± 4	14 ± 5	13 ± 4	16 ± 7	27 ± 10
E2	26 ± 3	58 ± 3	27 ± 10	46 ± 5	70 ± 3	38 ± 5	35 ± 10	4,0 ± 2	20 ± 12	8,0 ± 2
EE2	39 ± 3	39 ± 7	60 ± 6	56 ± 7	72 ± 3	48 ± 7	38 ± 6	12 ± 7	17 ± 5	8,0 ± 5
E1	46 ± 2	50 ± 10	60 ± 3	62 ± 3	65 ± 2	55 ± 3	13 ± 5	39 ± 3	48 ± 7	28 ± 7
4 n-OP	39 ± 4	44 ± 6	73 ± 8	70 ± 8	75 ± 4	69 ± 8	34 ± 10	43 ± 8	33 ± 9	38 ± 10
4 t-OP	30 ± 3	41 ± 10	45 ± 9	56 ± 9	67 ± 3	48 ± 9	19 ± 9	42 ± 9	25 ± 9	16 ± 6
4 n-NP	40 ± 4	22 ± 12	44 ± 15	67 ± 4	68 ± 4	18 ± 4	26 ± 12	20 ± 4	6,0 ± 3	17 ± 7
DMP	52 ± 3	30 ± 8	64 ± 5	24 ± 6	75 ± 3	22 ± 6	41 ± 5	13 ± 6	29 ± 7	26 ± 6
DEP	36 ± 3	37 ± 6	41 ± 7	33 ± 8	72 ± 3	30 ± 8	48 ± 7	30 ± 8	26 ± 8	37 ± 8
BBP	37 ± 3	28 ± 3	41 ± 4	34 ± 5	70 ± 3	31 ± 5	46 ± 4	38 ± 5	27 ± 6	38 ± 5
DBP	37 ± 2	46 ± 7	42 ± 2	58 ± 8	67 ± 2	55 ± 8	33 ± 6	41 ± 8	39 ± 9	42 ± 8
DEHP	60 ± 5	31 ± 5	88 ± 6	38 ± 9	99 ± 5	36 ± 9	77 ± 6	47 ± 9	64 ± 5	36 ± 9
Dn-OP	41 ± 3	24 ± 5	47 ± 3	32 ± 6	81 ± 3	31 ± 6	41 ± 8	37 ± 6	23 ± 8	34 ± 6

Por meio da interação entre as micro-ondas e as moléculas do solvente, estas são rotacionadas ao passo que se alinham ao campo elétrico gerados pelas micro-ondas. Essa rotação do dipolo encontra resistência e resulta em dissipação de energia sob a forma de calor e promovendo assim o aumento da temperatura (Sanchez-Prado et al., 2010).

No micro-ondas, ao contrário do sistema do UAE, o processo de extração dos analitos da matriz foi realizado em um sistema fechado e pressurizado, o que limita o contato da amostra com a atmosfera, minimiza as perdas por volatilização e promove uma melhor eficiência na extração. Provavelmente, esses foram os fatores que contribuíram para que os níveis de recuperação dos IE por MAE tenham sido superiores aos do UAE (que foi usado um sistema aberto e não-pressurizado).

Entre os solventes extratores avaliados o diclorometano e a mistura DCM/Hexano 1:1 apresentaram recuperações inferiores à 50%, com exceção do DEHP com recuperação de 77% (DCM) e 65% (DCM/Hexano 1:1). Entre as misturas ACN/DCM foi observado que a medida que a proporção de DCM na mistura era aumentada as taxas de recuperações também cresciam. Isso pode ser observado com os compostos 4 t-OP e E3, que com a mistura ACN/DCM 1:1 as recuperações foram de 30 e 58%, respectivamente. Para esses mesmos compostos, utilizando a mistura ACN/DCM 1:2 as recuperações aumentaram para 45 e 64%, respectivamente, enquanto que com a mistura ACN/DCM 1:3 as recuperações aumentaram para 68 e 82%, respectivamente. Isto pode ser explicado devido a menor polaridade do diclorometano quando comparado à acetonitrila. Nesse caso, observa-se que a menores polaridades da mistura extratora, melhores foram as taxas de recuperação dos IE. Estes são espécies de polaridade relativamente baixa (como, por exemplo, os alquilfenóis e ftalatos) a não-polaridade (como, por exemplo, o bisfenol A).

Entretanto, a polaridade da mistura extratora não parece ser o único fator que explica as melhores taxas de extração encontradas nesse estudo, pois então teria-se que a mistura DCM/hexano ou DCM 100 %, que são apolares, apresentariam os melhores resultados do que a mistura ACN/DCM 1:3. Contudo, substâncias apolares absorvem fracamente micro-ondas e, associada a essa limitação, tanto o DCM quanto a mistura DCM/hexano, são altamente voláteis e podem ocasionar perda da mistura extratora-analitos por volatilidade (principalmente para o sistema UAE mas também para MAE, apesar de ser um sistema fechado). A quantidade de ACN na mistura ACN/DCM 1:3 apresentou a polaridade ideal para extrair os 14 IE estudados, que, apesar das moléculas dos mesmos terem grandes porções apolares, apresentam um ou mais átomos de oxigênio que lhes conferem uma certa polaridade.

Essa polaridade relativamente baixa das moléculas dos IE estudados é conferida pela presença de átomos de oxigênio em determinadas posições, os quais apresentam melhor afinidade com a mistura ACN:DCM 1:3 (baixa polaridade) do que com solventes extratores completamente apolares tais como DCM 100 % ou DCM/hexano 1:1. Ainda, a quantidade de ACN na mistura ACN/DCM 1:3 contribuiu com a diminuição da volatilidade da mistura extratora (devido a alta volatilidade do DCM), diminuindo as perdas e também melhorando as taxas de recuperação das misturas que continham ACN daquelas que não continham (DCM, DCM/hexano 1:1).

Assim, a mistura ACN/DCM 1:3 promoveu uma melhor eficiência de extração em virtude do menor caráter relativamente polar, o qual é semelhante à maioria dos analitos estudados. As taxas de recuperação para esta mistura variaram de 65% (para a E1) a 99 % (para o DEHP). Portanto, a partir desse ponto, a mistura ACN:DCM 1:3 e a MAE foram empregados nos testes subsequentes.

- *Otimização da MAE*

Além do solvente extrator, a temperatura e o tempo de extração são parâmetros que influenciam diretamente a eficiência da MAE e precisam ser cuidadosamente avaliados antes da validação de método de preparo de amostras. O tempo e a temperatura da extração foram estudados de forma univariada por meio de testes de recuperações com amostras de chumbinho fortificadas com solução padrão dos 14 analitos nas concentrações finais de 25 ng g⁻¹ para os alquilfenóis, BPA e hormônios, 125 ng g⁻¹ para a estrona e 5,0 µg g⁻¹ para os ftalatos. As extrações foram feitas em triplicatas em tempos distintos (5, 15 e 25 minutos) e em três diferentes temperaturas de extração (80, 115 e 130°C). Os respectivos resultados podem ser encontrados na Tabela 7.

Conforme os dados da Tabela 7, as recuperações acima de 60% para os 14 IE estudados foram conseguidas em maiores temperaturas e com um tempo de extração superior a 5 minutos. Geralmente, temperaturas mais elevadas resultam em uma melhor eficiência no processo de extração devido ao aumento da difusividade do solvente extrator no interior da matriz (Sanchez-Prado et al., 2010). Entretanto, em altas temperaturas e em um tempo maior de extração, é provável que outros compostos presentes concomitantemente na matriz sejam também extraídos resultando em co-eluições dos mesmos com os picos dos analitos, ocasionando, desse modo, em um maior nível de interferências na determinação do analito.

Isto pode explicar as recuperações mais elevadas para o estriol e o 4 n-octilfenol em maiores temperaturas.

Levando em consideração que as taxas das recuperações dos analitos nas temperaturas de 115°C e 130°C não variaram substancialmente e o mesmo foi percebido com o aumento tempo de 15 para 25 minutos, foi selecionado para este estudo um tempo de 15 minutos e a temperatura de 115°C como melhores condições de extração dos IE. Nessas condições, as recuperações se encontram acima de 76% para todos os analitos, com exceção do DBP que apresentou recuperação de 67%, mas ainda assim, em nível aceitável, que a depender da complexidade da matriz esse valor pode ser de 50-120 % (Ribani et al., 2004). A Figura 6, resume o procedimento desenvolvido para a extração dos IE em amostras de bivalves.

Tabela 7: Condições de tempo e temperatura de extração na extração dos interferentes endócrinos em bivalves. Valores em % de recuperação das amostras fortificadas (n = 3) com padrões com concentração final de 25 ng g⁻¹ (BPA, E2, E3, EE2, 4 t-OP, 4 n-OP, 4 n-NP) 125 ng g⁻¹ (E1) e 5,0 µg g⁻¹ (DMP, DEP, BBP, DBP DEHP, Dn-OP).

Analitos	80°C			115°C			130°C		
	5 min	15 min	25 min	5 min	15 min	25 min	5 min	15 min	25 min
E3	62,3 ± 2	62,0 ± 3	66,0 ± 3	77,1 ± 0,9	92,4 ± 1	89,1 ± 2	71,4 ± 0,8	104 ± 0,5	132 ± 4
BPA	52,1 ± 4	60,7 ± 1	75,5 ± 1	71,5 ± 0,9	90,6 ± 1	92,3 ± 3	70,3 ± 0,9	88,2 ± 3	85,2 ± 0,7
E2	27,0 ± 1	35,9 ± 1	63,3 ± 5	62,0 ± 1	78,0 ± 1	74,3 ± 2	63,0 ± 1	80,3 ± 2	87,0 ± 3
EE2	40,6 ± 2	52,2 ± 1	69,7 ± 1	52,2 ± 1	76,1 ± 3	78,0 ± 3	68,0 ± 1	74,0 ± 1	71,1 ± 1
E1	47,0 ± 1	62,3 ± 1	72,0 ± 3	62,2 ± 1	77,1 ± 1	72,8 ± 4	73,5 ± 1	84,5 ± 0,6	85,1 ± 2
4-t-OP	46,5 ± 1	46,0 ± 2	54,8 ± 2	65,8 ± 1	76,0 ± 1	71,2 ± 2	68,0 ± 0,9	77,6 ± 0,7	79,0 ± 3
4-n-OP	29,3 ± 2	41,0 ± 2	57,0 ± 1	56,6 ± 2	84,3 ± 3	86,4 ± 2	70,2 ± 1	112 ± 3	145 ± 5
4-n-NP	54,3 ± 1	63,4 ± 2	64,0 ± 1	80,9 ± 0,8	93,6 ± 2	95,0 ± 2	71,2 ± 1	87,3 ± 4	60,9 ± 4
DMP	48,0 ± 0,8	45,3 ± 0,8	50,5 ± 0,7	59,0 ± 0,8	76,5 ± 0,6	75,8 ± 0,7	67,8 ± 3	83,2 ± 3	80,3 ± 0,7
DEP	34,0 ± 0,6	41,6 ± 0,5	49,1 ± 0,7	65,3 ± 0,7	78,0 ± 0,6	80,5 ± 0,6	67,1 ± 0,6	84,6 ± 0,6	93,5 ± 0,4
BBP	41,8 ± 0,6	50,5 ± 0,3	60,7 ± 0,6	56,2 ± 0,8	77,9 ± 0,5	75,5 ± 0,5	65,5 ± 0,6	80,2 ± 0,4	77,5 ± 0,5
DBP	43,7 ± 0,7	57,5 ± 0,4	70,0 ± 0,5	62,0 ± 0,7	67,7 ± 0,7	68,7 ± 0,7	58,7 ± 0,8	76,0 ± 0,5	73,3 ± 0,5
DEHP	59,6 ± 0,5	54,0 ± 0,5	67,2 ± 0,6	75,4 ± 0,5	90,2 ± 0,3	86,2 ± 0,4	73,0 ± 0,6	78,4 ± 0,6	75,4 ± 0,6
DnOP	63,7 ± 0,4	81,2 ± 0,4	64,2 ± 0,5	76,5 ± 0,6	93,0 ± 0,3	93,0 ± 0,2	80,4 ± 0,7	93,6 ± 0,4	92,0 ± 0,4

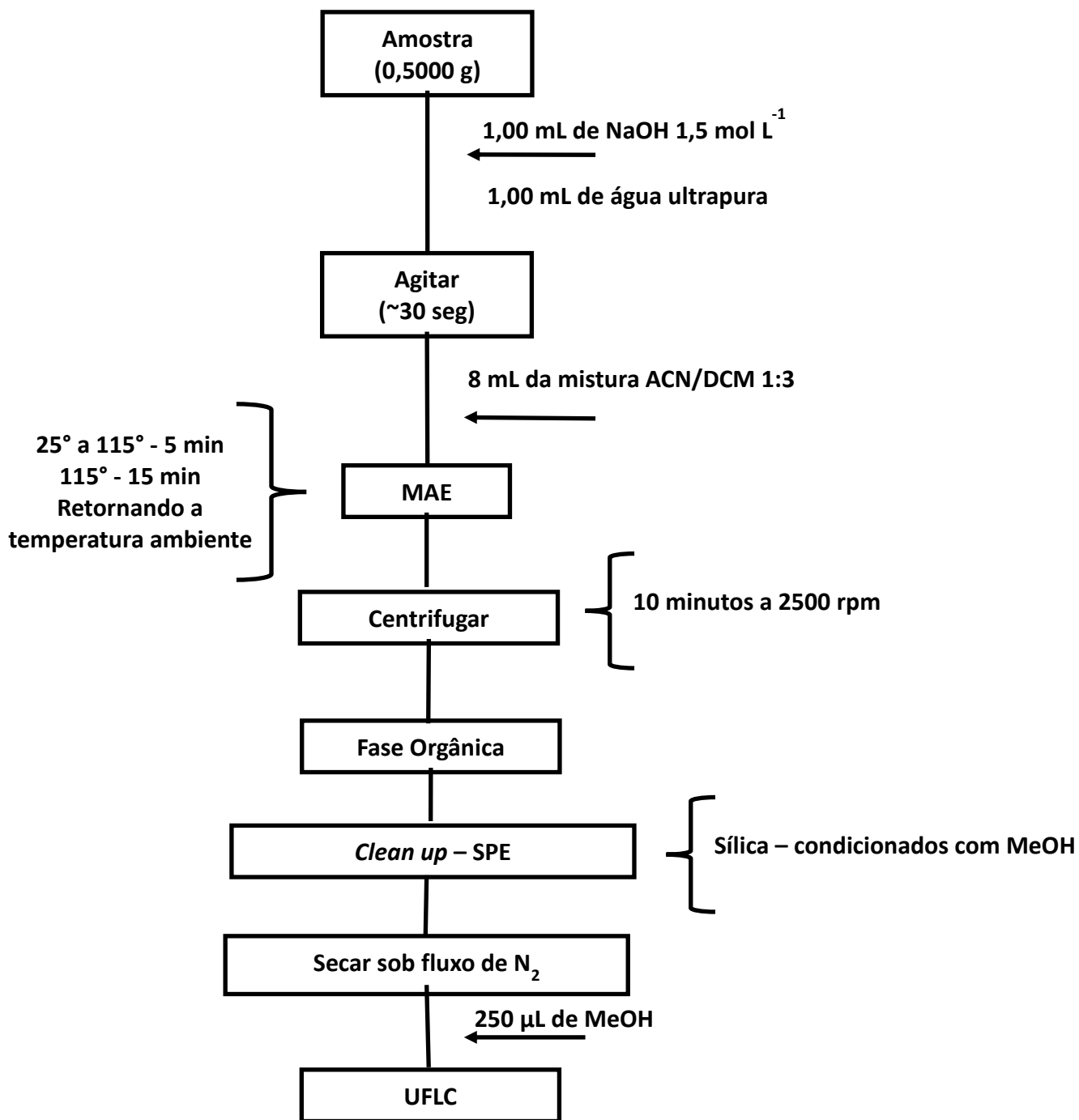


Figura 6: Fluxograma da metodologia completa de extração dos 14 interferentes endócrinos em tecidos de bivalves

- *Validação da MAE*

Com objetivo de avaliar a exatidão do método desenvolvido, foram realizados testes de recuperação, uma vez que não há material de referência certificado disponíveis para as classes de IE avaliados neste estudo para amostras de bivalves marinhos. Os ensaios foram realizados com amostras de mexilhões fortificadas com a solução padrão contendo os 14 IE estudados em três níveis de concentração. No extrato final as concentrações dos IE foram de: i. 2,5 ng g⁻¹ (alquilfenóis, BPA e hormônios), 12,5 ng g⁻¹ estrona e 1,0 µg g⁻¹ ftalatos; ii. 12,5 ng g⁻¹ (alquilfenóis, BPA e hormônios), 62,5 ng g⁻¹ estrona e 2,5 µg g⁻¹ ftalatos; iii. 25 ng g⁻¹ (alquilfenóis, BPA e hormônios), 125 ng g⁻¹ estrona e 5,0 µg g⁻¹ ftalatos. As recuperações estão apresentados na Tabela 7. As recuperações dos analitos variaram de 51 - 98% nos diferentes níveis de concentração estudados. Para o 4 n-NP, o DEHP e o DnOP as recuperações foram superiores a 80% nos três níveis de adição.

Através dos dados obtidos com a curva analítica, os limites de detecção e quantificação foram calculados para o método de extração proposto (Tabela 8). Os limites foram encontrados na ordem de ng g⁻¹ com LD entre 0,41 ng g⁻¹ para o 4t-octilfenol e 63,2 ng g⁻¹ para o dilbutilftalato e os LQ se encontram na mesma ordem de grandeza sendo de 1,37 ng g⁻¹ e 211 ng g⁻¹ para o 4 t-octilfenol e o dilbutilftalato respectivamente.

Os limites de detecção e quantificação e as recuperações do método proposto são considerados adequados, visto que são comparáveis a valores reportados na literatura (Tabela 9). Alguns destes estudos obtiveram valores de LD inferiores aos níveis encontrados neste estudo, mas ainda assim, todos eles se encontram na mesma ordem de grandeza (ng g⁻¹). Essas diferenças podem ser atribuídas às condições de extração, tipo de clean up, bem como o método de quantificação empregados. Esses estudos utilizaram como técnica de detecção, principalmente, a espectrometria de massas seja em GC ou LC. O espectrômetro de massas (MS) apresenta vantagens de ser operado de diversos modos, dentre eles o modo de íons seletivos (SIM) em que são escolhidas as relações adequadas de m/z para os compostos-alvo, aumentam a seletividade e a sensibilidade da análise (Hernández et al., 2012; Zedda e Zwiener, 2012; Wu et al., 2010; Gallart-Ayala et al., 2010). Um outro fator que também deve ser levado em consideração é a etapa de derivatização, que geralmente é requerida para determinação destes analitos em matrizes ambientais e biológicas por CG, que apesar de ser laboriosa e suscetível a perda dos analitos e/ou contaminação da amostra, gera uma melhoria

na resolução e reprodutibilidade dos picos e como consequência uma melhoria dos limites de detecção e seletividade ou ambos (Farajzadeh et al., 2014).

Tabela 8: Percentual de recuperação em diferentes níveis de concentração, LD e LQ para os 14 interferentes endócrinos após a extração assistida por micro-ondas.

Analitos	Recuperação (%)			LD (ng g ⁻¹)	LQ (ng g ⁻¹)
	A	B	C		
E3	91,5	96,3	92,5	0,68	2,26
BPA	77,0	80,9	90,4	0,76	2,53
E2	75,5	74,2	78,2	0,82	2,72
EE2	72,4	78,0	76,1	0,65	2,17
E1	73,0	74,0	77,0	3,99	13,3
4 n-OP	51,4	65,5	76,5	0,41	1,37
4 t-OP	76,2	76,1	84,0	0,65	2,16
4 n-NP	93,1	94,0	98,3	0,50	1,68
DMP	63,0	60,3	76,0	40,8	136
DEP	78,8	74,1	78,1	45,2	151
BBP	74,5	76,0	77,4	58,4	195
DBP	65,3	65,7	67,3	63,2	211
DEHP	84,0	88,3	90,5	35,0	117
Dn-OP	91,1	91,7	93,2	32,0	107

A: 2,5 ng g⁻¹ alquilfenóis, BPA e hormônios, 12,5 ng g⁻¹ estrona e 1,0 µg g⁻¹ ftalatos;

B: 12,5 ng g⁻¹ alquilfenóis, BPA e hormônios, 62,5 ng g⁻¹ estrona e 2,5 µg g⁻¹ ftalatos;

C: 25 ng g⁻¹ alquilfenóis, BPA e hormônios, 125 ng g⁻¹ estrona e 5,0 µg g⁻¹ ftalatos.

O método desenvolvido neste estudo apresenta como vantagens o uso de um sistema fechado/pressurizado, havendo com isso uma redução da contaminação do extrato pelo contato com a atmosfera, utiliza pequeno volume de solvente e energia (temperatura e tempo relativamente baixos) seguindo as prerrogativas da Química Verde e, relativa automatização (comparado com a SPE) associado a altas taxas de extração e boa repetibilidade e ainda é capaz de quantificar IE em níveis de concentrações encontrados na literatura. Portanto, os resultados mostram que o método desenvolvido é adequado para a determinação dos IE em amostras de bivalves.

Tabela 9: Taxas de recuperação (%) e limites de detecção (ng g⁻¹) de IE em amostras ambientais.

Matriz	Técnica	E3		BPA		E2		EE2		E1		4 t-OP		4 n-OP		4 n-NP		DMP		DEP		BBP		DBP		DEHP		DnOP		REF
		% REC	LD	% REC	LD	% REC	LD	% REC	LD	% REC	LD	% REC	LD	% REC	LD	% REC	LD	% REC	LD	% REC	LD	% REC	LD	% REC	LD	% REC	LD	% REC	LD	
Bivalve	MAE	92	0,68	90	0,76	78	0,82	76	0,65	77	3,99	76	0,41	84	0,65	98	0,5	76	40,8	78	45,2	77	58,4	67	63,2	90	35	93	32	Presente Estudo
Peixe	MAE			79	50							78	50																(Pedersen e Lindholst, 1999)	
Bivalve	MAE			98	1,35							96	0,15	n c	0,2	109	0,17												(Basheer et al., 2004)	
Sedimento	MAE			95	0,8							86	0,2			60	0,2												(Stuart et al., 2005)	
Mexilhão	MAE					81	0,07			87	0,16																		(Dévier et al., 2010)	
Peixe	MAE	100	0,4	60	0,7	92	0,6	89	0,5	83	0,7	56	0,3			51	0,4												(Liu et al., 2012)	
Ostra	MAE					21				30				26	3	31	3												(Cathum e Sabik, 2001)	
Mexilhão	UAE	56		75		52		48		44						40													(Pojana et al., 2007)	
Bivalve	Sohxlet															97	3												(Wang et al., 2010)	
Peixe	ASE													77	38	92	16												(Schmitz-Afonso et al., 2003)	
Peixe	ASE	74	3	71	0,01	47	3,09			57	0,35																		(Jakimska et al., 2013)	
Sedimento	MAE																	100	10	100	10	100	10			95	10	100	10	(Cortazar et al., 2005)
Sedimento	MAE																	100	5	100	12	100	1	99	4	95	22	100	0,5	(Bartolomé et al., 2005)
Sedimento	MAE																					15				84			(Liang et al., 2010)	
Mexilhão	UAE													119	26	91	83	81	10	103	4	91	18			115	16		(Sánchez-Avila et al., 2011)	

- *Testes Em Amostras Reais*

Com o objetivo de demonstrar a aplicabilidade do método de extração proposto, amostras de ostras e sururu foram analisadas (Tabela 10). Os compostos 4 t-OP, 4 n-NP, DMP e DnOP foram encontrados em todas as amostras analisadas. As concentrações variaram de 20 – 37 ng g⁻¹ para o 4 t-OP, 17 – 27 ng g⁻¹ para o 4 n-NP, 124 – 839 ng g⁻¹ para o DMP e 4200 – 7400 ng g⁻¹ para o DnOP. Não foi observada uma variação substancial entre as amostras em diferentes localidades para o BPA (3-5 ng g⁻¹), EE2 (13-21 ng g⁻¹) e DEHP (1991-2622 ng g⁻¹). Já o E1 e o BBP foram encontrados apenas em duas das amostras analisadas com concentrações de 17 e 36 ng g⁻¹ e de 9441 e 8522 ng g⁻¹, respectivamente. Os compostos E3, E2, 4 n-OP, DEP e DBP estavam abaixo do LD do método aplicado. No meio aquático, hormônios podem sofrer uma série de processos, tais como diluição, fotólise, biodegradação e sorção em sedimento e em partículas orgânicas, os quais podem contribuir para a sua remoção do meio ambiente.(Clara et al., 2004)

Conforme os resultados apresentados pode-se concluir que o método desenvolvido e validado neste estudo se mostrou capaz de detectar e quantificar os compostos estudados em bivalves.

Tabela 10: Concentração (ng g⁻¹) dos IE em ostras e sururu

Analitos	Amostra A (Ostra)	Amostra B (Ostra)	Amostra C (Ostra)	Amostra D (Sururu)	Amostra E (Sururu)	Amostra F (Sururu)
BPA	<LD	14,00	<LD	21,08	16,15	13,30
EE2	<LD	3,320	<LD	5,094	4,209	3,158
E1	<LD	<LD	<LD	<LD	36,21	17,06
4-t-OP	34,05	27,05	26,41	33,20	37,07	20,00
4-n-NP	20,10	25,43	17,18	27,18	23,34	23,08
DMP	839,0	416,1	144,2	506,0	762,2	226,1
BBP	9441	<LD	8522	<LD	<LD	<LD
DEHP	1991	2512	<LD	<LD	2166	2622
DnOP	4520	7400	6503	4701	4200	4958

LD dos compostos (ng g⁻¹) BPA: 0,76; EE2: 0,65; E1: 3,99; BBP: 58,4; DEHP: 35,0

5.2 Ocorrência de Interferentes Endócrinos em Bivalves e Sedimentos Coletados na Baía de Todos os Santos

- *Interferentes Endócrinos em Bivalves*

Com o objetivo de verificar os níveis de concentração dos IE em bivalves da Baía de Todos os Santos, Bahia foram realizadas determinações desses contaminantes em ostras, chumbinho e sururu coletados nas localidades de Madre de Deus, praia da Ribeira (Salvador) e nos estuários dos rios Paraguaçu e Jaguaripe (Tabela 11).

As concentrações dos IE nos tecidos dos bivalves variaram bastante entre as espécies estudadas e os pontos amostrados. O composto presente em menor concentração foi o BPA (1 ng g^{-1} , #8) enquanto que o DEHP apresentou a concentração mais elevada (1594 ng g^{-1} , #9) (Figura 7). Nenhum dos 14 IE estudados foram detectados nas amostras de bivalves e de sedimentos coletados ao longo do estuário do Rio Jaguaripe.

O Rio Jaguaripe apresenta uma área relativamente preservada e com pouca atividade antrópica, o que podem ser observado a partir de estudos que descrevem a contaminação de metais em sedimentos e material particulado em suspensão nesta região (Hatje and Barros, 2012; Da Rocha et al., 2012; Hatje et al., 2010). A bacia do Rio Jaguaripe pode ser, potencialmente, utilizada como área controle para alguns contaminantes (Hatje and de Andrade, 2009).

Dentre os hormônios, o EE2 foi encontrado apenas em chumbinho coletado em Madre de Deus (#1), com concentração de 5 ng g^{-1} . O hormônio E3 apresentou-se sempre abaixo do LD em ostras, entretanto foi detectado tanto em chumbinho (#1 e #9), quanto em sururu (#7), em concentrações de 3 ng g^{-1} , 23 ng g^{-1} e 17 ng g^{-1} , respectivamente. A E1 foi o único hormônio detectado nas três espécies estudadas. Em ostra as concentrações foram de 43 ng g^{-1} em Madre de Deus (#1) e de 10 ng g^{-1} , no sururu foi de 14 ng g^{-1} (Paraguaçu (#7)) e no chumbinho foi de 80 ng g^{-1} (Madre de Deus (#1)). Estudos sobre a presença de hormônios estrogênicos na biota provenientes de ambientes marinhos relatam concentrações relativamente baixas ou até inferiores aos limites de detecção, como provável reflexo das concentrações no ambiente. Pojana et al (2007) analisaram os hormônios E1, E2, E3 e EE2, destes apenas o EE2 foi encontrado em amostras de mexilhões com concentrações acima do limite de detecção (17 ng g^{-1}). Em outros estudos, os hormônios E1 e E2 também não foram detectados em tecidos de bivalves (Dévier et al., 2010; Cathum e Sabik, 2001).

Tabela 11: Concentração dos interferentes endócrinos em tecido de bivalves (ng g⁻¹) coletados na Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil.

Estação	#1			#2		#3		#4		#5		#6	#7	#8	#9
Organismo	C	O	S	C	O	C	O	O	S	O	S	O	S	O	C
E3	3,097	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	17,10	<LD	23,08
BPA	3,995	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	4,150	1,503	<LD	<LD	1,409	20,02
E2	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
EE2	5,279	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
E1	80,06	43,09	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	14,00	<LD	<LD
4 n-OP	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
4 t-OP	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
4 n-NP	24,43	24,27	14,81	34,30	26,17	18,09	<LD	<LD	16,26	32,29	<LD	25,79	<LD	12,37	19,09
DMP	290,2	115,5	607,0	266,2	120,5	304,3	230,0	431,2	356,3	114,4	530,1	58,07	<LD	<LD	264,2
DEP	<LD	146,8	580,4	267,0	491,0	429,1	580,0	399,0	351,1	<LD	1167	331,2	<LD	<LD	202,7
BBP	<LD	<LD	203,0	<LD	421,2	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	140,6	<LD	<LD	299,0
DBP	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
DEHP	1296	876,3	467,0	1584	535,5	1952	<LD	1565	<LD	1826	1337	<LD	<LD	<LD	1594
DnOP	521,0	<LD	<LD	810,4	<LD	1390	<LD	<LD	<LD	<LD	329,0	<LD	<LD	<LD	1953

C = Chumbinho; O = Ostra; S = Sururu; LD = Limite de Detecção. (LD em ng g⁻¹: E3 = 0,6; BPA = 0,7; E2 = 0,8; EE2 = 0,6; E1 = 3,9; 4 n-OP = 0,4; 4 t-OP = 0,6; 4 n-NP = 0,5; DMP = 40; DEP = 45; BBP = 55; DBP = 60; DEHP = 30; DnOP = 30)

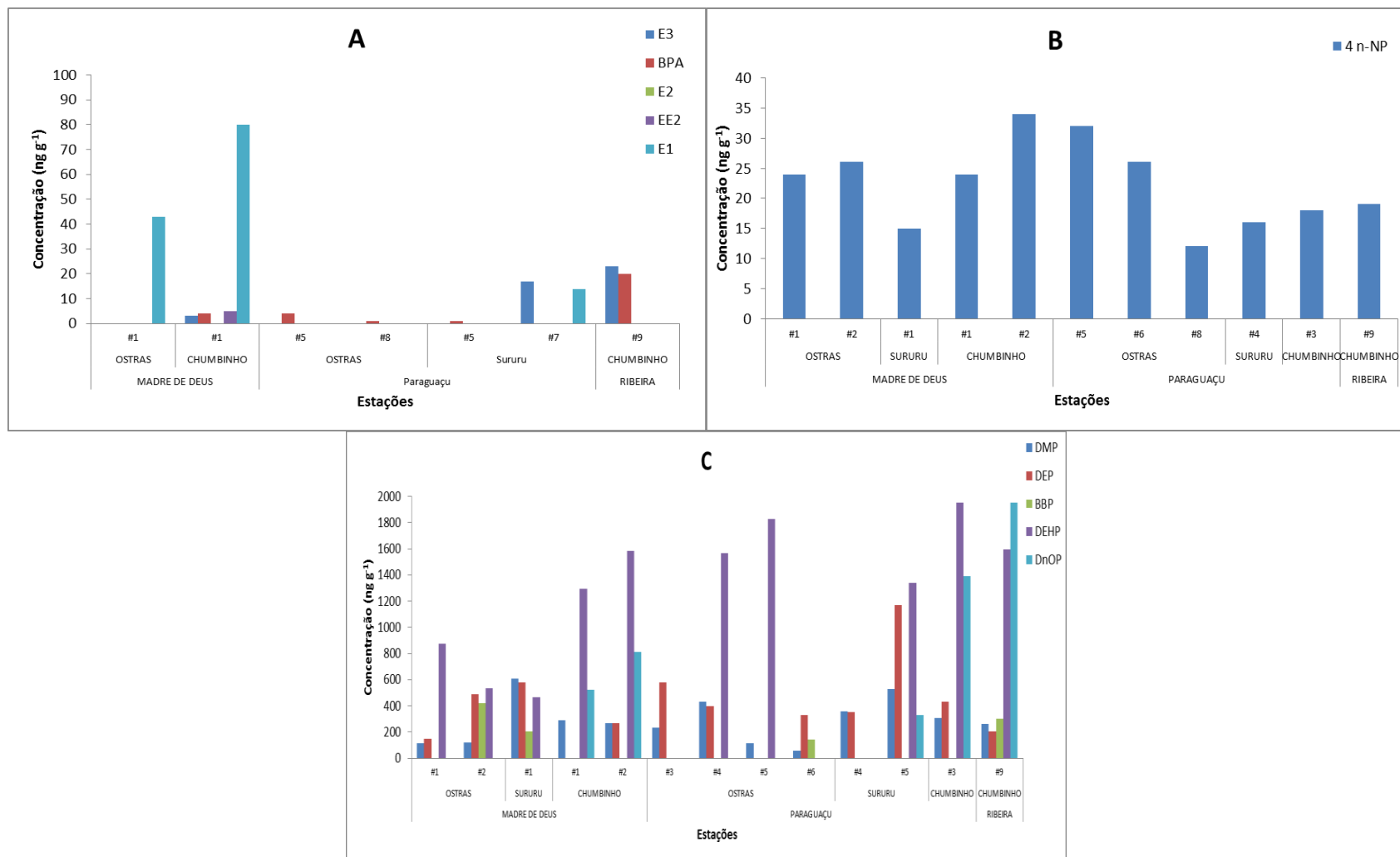


Figura 7 : Concentração de hormônios e BPA (A), alquilfenóis (B) e ftalatos (C) em tecidos de bivalves coletados na Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil

O 17 β -estradiol é um hormônio produzido e excretado pelo organismo humano sendo assim, pode haver uma alta liberação para o meio ambiente através de descargas de esgotos. Contudo, não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas. Isso pode ser atribuído a processos de degradação sofridos pelo 17 β -estradiol, como por exemplo a sua transformação em estrona na presença de micro-organismos como também degradação anaeróbica ou aeróbica em sedimentos (Yin et al., 2002). Em ambientes aquáticos, o 17 β -estradiol apresenta um curto tempo de meia vida, variando de 0,2 a 9 dias, em função da sua transformação na estrona (Jurgens et al., 2002). De um modo geral, a ausência ou baixo valor dos hormônios nos locais estudados pode ter ocorrido, principalmente, devido ao fato dos hormônios serem biodegradados e/ou fotodegradados próximo aos pontos de lançamento e não alcançaram o ambiente onde residiam os organismos avaliados. Enquanto que a presença da estrona, em concentrações mais elevadas do que os outros hormônios estudados, pode ser originada de processos de degradação dos demais hormônios (Zuo et al., 2006).

A ocorrência de hormônios nos tecidos dos organismos avaliados neste estudo pode estar relacionada ao lançamentos de esgotos domésticos, levando em consideração que os bivalves foram coletados em estações próximas às áreas residenciais (Madre de Deus, Ribeira e #7, localizada próxima ao distrito de Coqueiros, no rio Paraguaçu).

A concentração de BPA nas amostras variou entre 0,7 ng g⁻¹ e 20 ng g⁻¹, sendo detectado nas três espécies estudadas, e a maior concentração ocorreu na praia da Ribeira, possivelmente oriundo de esgotos domésticos e industriais. Isobe et al (2007) desenvolveram um estudo no sul e sudeste da Ásia com uma espécie de sururu (*Perna viridis*) e verificaram a ocorrência de BPA em 16 das 31 amostras analisadas, com concentração máxima de 13,7 ng g⁻¹. O rápido crescimento populacional, industrial e urbanização do Sul e Sudeste Asiático contribui com a aumento da poluição nos ambientes costeiros nessa região.

Pojana et al (2007) encontraram também em mexilhões concentrações de BPA de 25 ng g⁻¹ a 118 ng g⁻¹. A região da Lagoa da Veneza, na Itália, durante o século passado, passou por um processo de desenvolvimento urbano, industrial e agrícola intenso que reflete hoje na contaminação dos ecossistemas. Efluentes de esgotos domésticos e industriais e escoamentos agrícolas são as principais fontes de contaminação desta região assim como na BTS, no entanto os níveis de BPA da BTS foram inferiores.

Gu et al (2014) e Huerta et al (2015) determinaram concentrações de BPA em frutos do mar de 8,6 ng g⁻¹ e em gastrópodes de 8,7 ng g⁻¹, respectivamente. Salgueiro-González et

al (2015) encontraram BPA numa concentração de 412 ng g⁻¹ em espécies invasoras de moluscos.

Para os alquilfenóis, tanto o 4 t-OP quanto o 4 n-OP não foram encontrados em concentrações acima do LD (0,65 ng g⁻¹ e 0,41 ng g⁻¹, respectivamente) em nenhuma das amostras analisadas. O 4 n-NP foi encontrado em uma grande parte, com concentrações variando de 11 ng g⁻¹ a 34 ng g⁻¹. Quando comparadas a outras localidades do mundo, como o Mar Adriático, por exemplo, as concentrações do nonilfenol encontradas nos bivalves da BTS estavam mais elevadas (4,4 – 4,9 ng g⁻¹) (Ferrara et al., 2001). Em contrapartida, as concentrações de nonilfenol deste estudo, estão em níveis inferiores a diversas localidades ao redor do mundo que também são impactadas por atividades industriais e portuárias além do desenvolvimento urbano, como por exemplo: o Golfo de Thermaikos na Grécia (79,4 ng g⁻¹) (Arditsoglou e Voutsas, 2012); a costa Leste do Mediterrâneo na Espanha (120 ng g⁻¹) (Bouzas et al., 2011); o Estuário de Savannah nos Estados Unidos (20 ng g⁻¹) (Senthil Kumar et al., 2008); a Baía de Masan na Coreia (290 ng g⁻¹) (Li et al., 2008); em Veneza na Itália (240 ng g⁻¹) (Pojana et al., 2007).

As concentrações mais elevadas de NP neste estudos, foram encontradas nas estações próximas a áreas industrializadas (#1, #2, #5 e #6). Atividades petrolíferas em Madre de Deus e a construção de um estaleiro no Rio Paraguaçu são importantes fontes emissoras de efluentes industriais, além dos esgotos domésticos nessas regiões. NP e OP no ambiente são derivados da degradação de alquilfenóis polietoxilados oriundos de descargas industriais. Apesar de estudos indicarem que o nonilfenol é mais eficazmente removido em estações de tratamento de esgotos do que o octilfenol, a ausência do octilfenol observado neste estudo pode ser explicada devido a hidrofobicidade dos dois compostos, onde o log K_{ow} do NP é de 4,5 enquanto que do OP é 4,1 (Isobe et al., 2007). Além do que, alquilfenóis comerciais formados por nonilfenol polietoxilados são mais utilizados do que o octilfenol polietoxilados, indicando uma tendência de encontrar uma quantidade maior de nonilfenol em relação ao octilfenol e, provavelmente, maior taxa de bioacumulação de nonilfenol nos tecidos dos bivalves (Bouzas et al., 2011).

A mesma tendência na concentração do NP relatada neste estudo foi observada em um outro trabalho desenvolvido na BTS, no estuário do rio Subaé (Cotrim, 2015). As concentrações do NP tanto na água como no MPS foram detectadas com maior frequência e quase sempre superiores ao OP. A produção e o uso do nonilfenol etoxilado comparado ao octilfenol etoxilado pode ter ocasionado o aumento da concentração do NP na água. Já no

MPS, mesmo que elevadas, as concentrações do NP ainda assim foram inferiores a outros estudos. Por outro lado, no sedimento, as concentrações do OP foram superiores ao NP, porém nenhuma explicação foi encontrada para esse comportamento.

Dentre os ftalatos, o DMP foi o único composto detectado em todas as amostras, com concentração variando de 58 ng g⁻¹ a 567 ng g⁻¹. Os demais ftalatos apareceram em concentrações entre 58 ng g⁻¹ (DMP, #6) e 1953 ng g⁻¹ (DnOP, #9). Concentrações de ftalatos nas áreas amostradas é oriunda de atividades industriais desenvolvidas no entorno da BTS. Concentrações dos ftalatos comparáveis ao presente estudo, foram encontradas em bivalves coletados ao longo do Mar da Virgínia, variando entre 210 ng g⁻¹ (DEP) até 2500 ng g⁻¹ (DEHP) para ostras e de 500 ng g⁻¹ (DEHP) a 2000 ng g⁻¹ (DBP) para chumbinho (Munshi et al., 2013). Alguns estudos apresentam concentrações inferiores para os ftalatos, Mackintosh et al (2004) encontraram DMP e DEHP em mexilhões nas concentrações de 1,36 ng g⁻¹ e 3,15 ng g⁻¹, respectivamente; em ostras as concentrações foram de 1,38 ng g⁻¹ (DMP) e 3,49 ng g⁻¹ (DEHP); e de 1,89 ng g⁻¹ (DMP) e 3,82 ng g⁻¹ (DEHP) em chumbinho. Sanchez-Ávila et al (2011), também em mexilhões, determinaram DMP e DnOP, respectivamente, nas concentrações de 3,9 ng g⁻¹ e 58 ng g⁻¹.

Altos níveis de ftalatos na biota podem ser afetados pelas propriedades físico-químicas destes contaminantes. DEHP, por exemplo, possui baixa solubilidade em água e apresenta uma elevada tendência para formar dispersões. Assim, esses organismos se tornam susceptíveis a contaminação por exposição aos ftalatos através da coluna de água, sedimento ou por meio da sua própria alimentação (Munshi et al., 2013).

Comparado aos demais IE, os ftalatos apresentam menor potência interferente (Tan et al., 2007a). No entanto, a depender da taxa, tipo e tempo de exposição, os ftalatos podem gerar alterações significativas na biota. Por exemplo, população de salmão do atlântico (*Salmo salar*), quando exposto à alimentação com DEHP, aumentou a proporção de indivíduos fêmeas (Norrgrén et al., 1999).

A análise das componentes principais (PCA) das concentrações dos IE e do teor de lipídio é apresentada na figura 8. As duas primeiras componentes (PC1 (70,7%) e PC2 (16,4%)) do PCA juntas explicaram 87,1 % da variabilidade dos dados. Foi possível observar uma disposição da maior parte das amostras de ostra, chumbinho e sururu na região central da PCA.

As amostras de chumbinho coletadas nas estações #3 e #9 ficaram alocadas na região positiva da PC1, se distanciando das demais por apresentarem as maiores concentrações do DnOP. Foi observado, também, uma leve separação das amostras de ostras coletadas nas estações 4 e 5 pelo PC2, devido, principalmente, ao DEHP (Tabela 12). A PCA sem um padrão de separação sugere fontes dispersas dos contaminantes na região coletada.

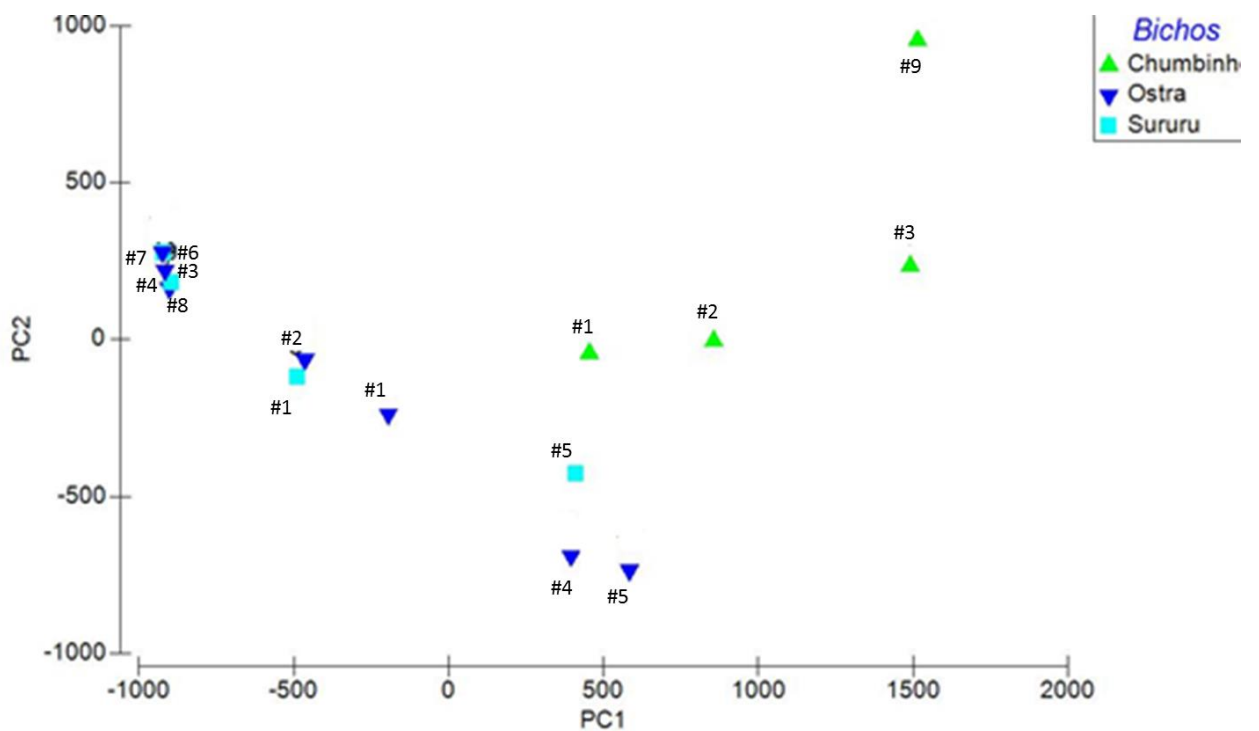


Figura 8: Resultados da análise das componentes principais para as concentrações de IE, e teor de lipídios (%) em amostras de tecidos de bivalves coletados na Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil.

Tabela 12: Coeficientes nas combinações lineares de variáveis que compõem os PC do PCA das amostras de bivalves.

Variáveis	PC1 (70,7%)	PC 2 (16,4%)	PC3 (10,3%)	PC4 (1,4%)	PC5 (1,2%)
E3	0,002	0,011	0,004	0,008	-0,005
BPA	0,003	0,006	0,002	0,010	-0,007
EE2	0,000	0,000	0,001	-0,002	-0,004
E1	0,001	-0,004	0,026	-0,027	-0,047
4 n-NP	0,004	0,000	0,015	0,028	0,000
DMP	0,066	-0,115	-0,390	-0,209	-0,886
DEP	0,012	-0,152	-0,898	0,017	0,410
BBP	0,015	0,094	-0,089	0,970	-0,202
DEHP	0,822	-0,547	0,132	0,065	0,059
DnOP	0,566	0,809	-0,125	-0,095	0,015
% lipídio	0,056	0,007	-0,002	0,051	-0,010

- *Interferentes Endócrinos em Sedimentos*

As concentrações dos IE nos sedimentos coletados na Baía de Todos os Santos foram bastante variáveis (Figura 9). Uma grande parte dos compostos estudados (E3, E2, EE2, E1, 4 n-OP e DnOP) não foi detectada nas amostras. A ausência de estrogênios nas amostras pode ter ocorrido devido ao fato destes compostos se degradarem antes que ocorram processos de sorção, floculação e/ou deposição no sedimento. Os níveis de concentração dos IE encontrados nos sedimentos da BTS (Tabela 13) variaram de 1 ng g⁻¹ (BPA, #8) a 1139 ng g⁻¹ (BBP, #4).

As concentrações de BPA variaram de 1 ng g⁻¹ (#8) a 12 ng g⁻¹ (#5), sendo a maior concentração encontrada em uma das estações próxima ao Estaleiro Enseada do Paraguaçu, possivelmente oriundo de resíduos de atividades desenvolvidas nessa localidade. Zonas costeiras pouco industrializada como a Baía de Biscay (Puy-Azurmendi et al., 2010) e o Estuário de Urdaibai (Salgueiro-González et al., 2014) considerado como uma área, relativamente não poluída, declarada como reserva da Biosfera pela UNESCO, em 1984 as concentrações de BPA foram acima das registradas na BTS.

Os alquilfenóis em sedimentos foram detectados em pequeno número das amostras analisadas, com concentrações máximas de 90 ng g⁻¹ (#9) para o 4 t-octilfenol e de 2 ng g⁻¹ (#1) para o 4 n-nonilfenol. O 4 n-NP apareceu na BTS em concentrações inferiores a diferentes regiões sob forte influência de efluentes de estações de tratamento de esgotos como a Baía de Masan na Coreia do Sul (Li et al., 2008b); a Baía de Tóquio no Japão (Isobe et al., 2001) e a Baía da Jamaica nos Estados Unidos (Ferguson et al., 2001) e em níveis similares para octilfenol. Elevadas concentrações de alquilfenóis no ambiente está associada ao desenvolvimento das áreas urbanas e industrializadas. Neste estudo, como também em um outro estudo desenvolvido no estuário do rio Subaé, também localizado na Baía de Todos os Santos (Cotrim, 2015), as concentrações de 4-t-OP no sedimento foram mais elevadas do que o 4-n-NP, diferentemente do padrão encontrado ao redor do mundo. Nenhuma explicação para essa tendência foi encontrada, tornando necessários estudos específicos para avaliar essa tendência.

Para a classe dos ftalatos, apenas o DnOP não foi detectado nos sedimentos. O DMP foi encontrado em todas as amostras com concentrações variando entre 77 ng g⁻¹ (#4) e 907 ng g⁻¹ (#7). Para os demais ftalatos, as concentrações oscilaram entre 110 ng g⁻¹ para o DEHP (#8) e 1139 ng g⁻¹ (#4). Essas concentrações foram inferiores a níveis de ftalatos encontrados na Baía Santander (Norte da Península Ibérica), uma área que possui um sistema de saneamento integrado de coleta de esgotos e tratamento biológicos dos efluentes das estações de tratamentos (DEP - 7670 ng g⁻¹, DBP - 1040 ng g⁻¹ e DEHP - 15190 ng g⁻¹) (de los Ríos et al., 2012). Em outros estudos, Sánchez-Ávila et al (2011) determinaram concentrações de DEP e BBP de 4317 ng g⁻¹ e 3297 ng g⁻¹, respectivamente; e Puy-Azurmendi et al (2013) encontraram valores máximos de 6218 ng g⁻¹ (DEP) e 2529 ng g⁻¹ (DEHP).

Ftalatos possuem elevados coeficientes de partição octanol/água, especialmente para aqueles de maior massa molar, e como consequência apresentam uma forte tendência a se adsorverem em sedimentos e partículas em suspensão. Devido à baixa solubilidade em água, esses compostos tendem a se acumular nos sedimentos e nas partículas em suspensão e são poucos removidos por atividades biológicas quando comparados com a sua presença na água (Zheng et al., 2014).

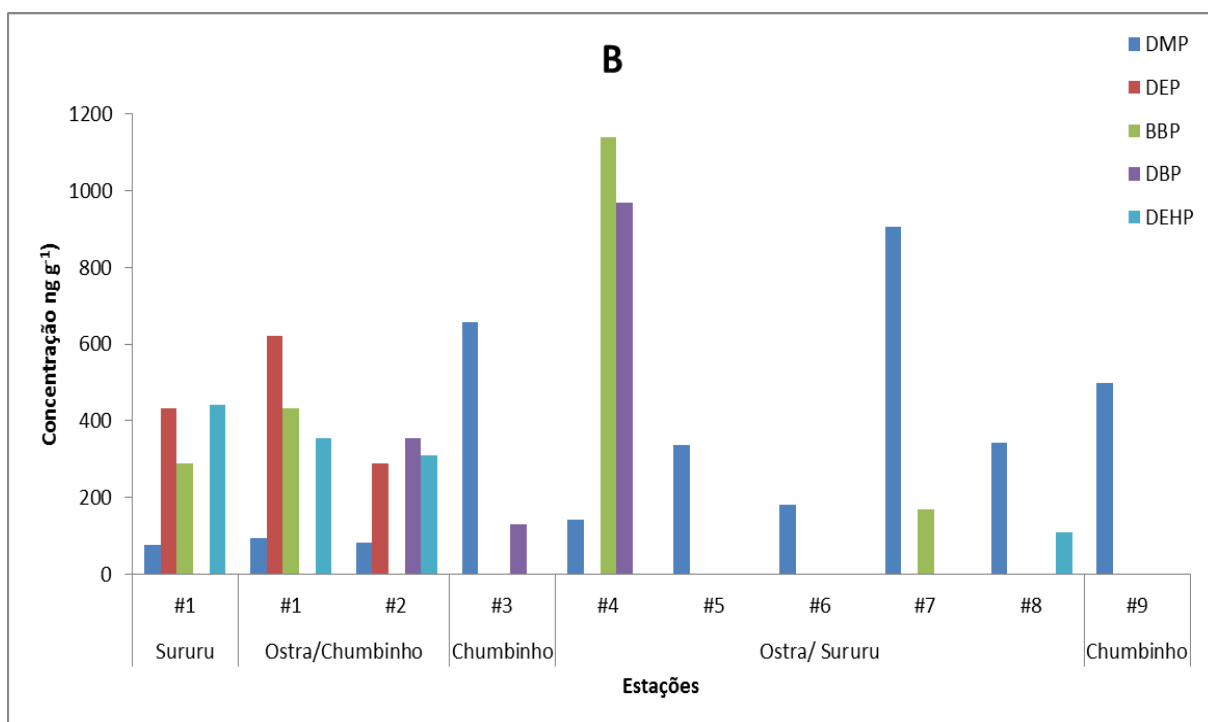
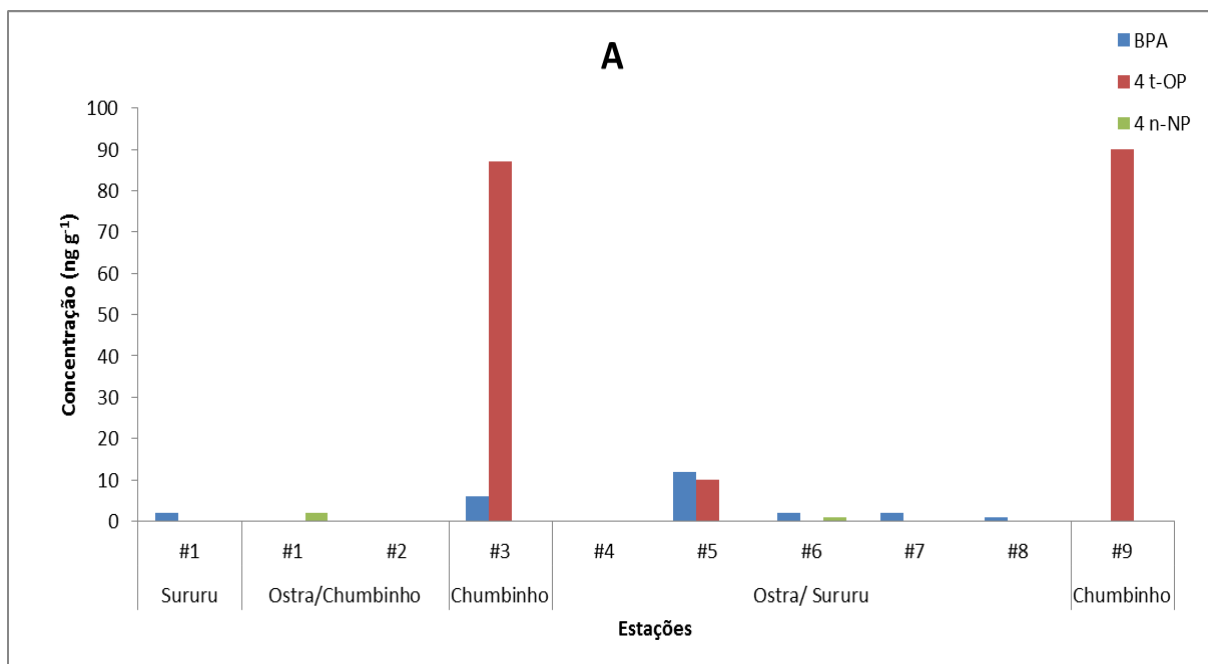


Figura 9: Concentração de Alquilfenóis e BPA (A), e Ftalatos (B) em sedimentos associados aos bivalves coletados na Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil

Tabela 13: Concentração dos IE em sedimentos associados aos bivalves (ng g^{-1}) coletados na Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil.

Estação	#1		#2	#3	#4		#5	#6	#7	#8	#9
Organismos	C/O	S	C/O	C	O/S	O/S	O/S	O/S	O/S	O/S	C
BPA	<LD	1,998	<LD	6,076	<LD	11,97	2,001	1,896	1,348	<LD	
4 t-OP	<LD	<LD	<LD	87,19	<LD	10,08	<LD	<LD	<LD	<LD	90,87
4 n-NP	2,098	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	1,736	<LD	<LD	<LD	<LD
DMP	93,45	77,09	82,38	657,4	142,0	336,1	180,3	907,3	342,5	499,2	
DEP	620,2	433,0	290,0	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
BBP	433,4	289,9	<LD	<LD	1139	<LD	<LD	170,0	<LD	<LD	<LD
DBP	<LD	<LD	355,3	129,8	969,2	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
DEHP	355,5	442,1	311,6	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	110,4	<LD	<LD
C_{org} (%)	0,05000	4,420	0,05000	0,06000	2,540	5,540	1,100	4,770	2,070	0,03000	
N_{tot} (%)	0,1000	0,4000	0,1000	0,4600	0,2500	0,3300	0,08000	0,4400	0,1500	0,2300	
Razão C/N	0,5000	11,05	0,5000	0,1304	10,16	16,78	13,75	10,84	13,8	0,1304	

C = Chumbinho; O = Ostra; S = Sururu; C_{org} = Carbono orgânico; N_{tot} = Nitrogênio total; LD = Limite de Detecção. (LD em ng g^{-1} : BPA = 0,7; 4 t-OP = 0,6; 4 n-NP = 0,5; DMP = 40; DEP = 45; BBP = 55; DBP = 60; DEHP = 30)

Os dados de C_{org} e N_{tot} nos sedimentos para as amostras do Rio Paraguaçu, Madre de Deus e Ribeira são apresentados na tabela 12. O C_{org} e N_{tot} nos sedimentos variaram entre 0,05 % a 5,54 % e 0,03 % a 0,94 %, respectivamente. Os maiores valores de C_{org} e N_{tot} foram observados nos sedimentos próximos a manguezais. A razão C/N foram, em sua maioria, maior que 10 indicando que a matéria orgânica nos sedimentos é uma mistura de compostos de origem terrestre e marinha (Cifuentes et al., 1996).

A análise das componentes principais (PCA) entre as concentrações dos IE e as variáveis acessórias é apresentada na figura 10. O PC1 e o PC2 explicam juntos 86,7% (PC1=56,1 % e PC2=30,6 %) da variabilidade dos dados. Foi observada uma clara separação da estação 4 das demais estações. Esta separação foi causada, principalmente, devido ao BBP e DBP presentes no sedimento, associados ao PC1. Já o PC2 separou em dois grupos as demais estações, onde as concentrações de DMP, DEP e DEHP foram as principais responsáveis (Tabela 14). A estação 4 foi claramente isolada das demais por apresentar as maiores concentrações de BBP quanto de DBP. Já as demais, foram separadas em função das concentrações do DEP e DEHP (amostras de sedimentos coletadas na região de Madre de Deus) e também do DMP (amostras coletadas no rio Paraguaçu e praia da Ribeira). A presença desses compostos está associada, principalmente, a atividades industriais, que são bem características as regiões amostradas. A matéria orgânica presente

nos sedimentos, é também um fator que pode contribuir com os elevados escores para estes compostos no sedimento, devido às características lipofílicas dos alquilfenóis e ftalatos.

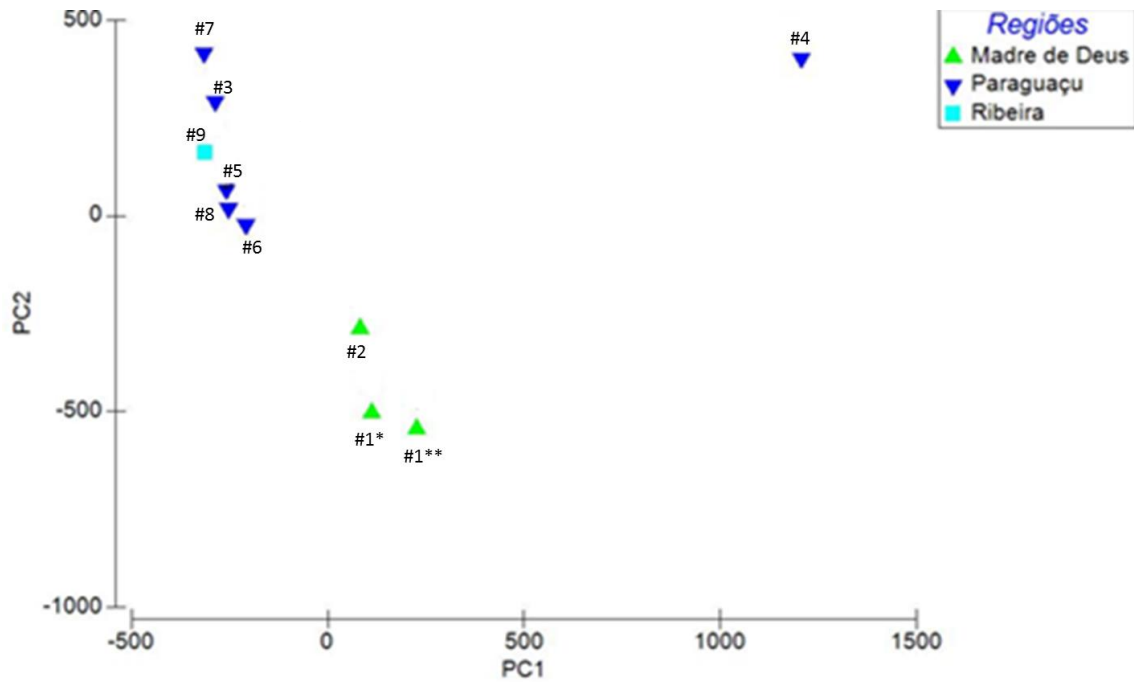


Figura 10: Resultados da análise das componentes principais para os IE, carbono orgânico e nitrogênio total em amostras de sedimentos coletados na Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil.

*Sedimento associado ao sururu; **Sedimento associado ao chumbinho e ostra.

Tabela 14: Coeficientes nas combinações lineares de variáveis que compõem os PC do PCA das amostras de sedimento.

Variáveis	PC1 (56,1%)	PC2 (30,6%)	PC3 (9,1%)	PC4 (3,3%)	PC5 (0,6%)
BPA	-0,003	0,002	0,003	-0,006	0,008
4 t-OP	-0,028	0,038	-0,002	0,059	0,315
4 n-NP	0,000	-0,001	-0,001	-0,002	0,008
DMP	-0,319	0,571	-0,651	0,381	-0,043
DEP	0,108	-0,590	-0,428	0,288	0,583
BBP	0,733	0,137	-0,488	-0,430	-0,118
DBP	0,587	0,301	0,355	0,649	0,113
DEHP	0,065	-0,464	-0,171	0,403	-0,729
% C	0,000	0,003	-0,002	-0,002	-0,001
% N	0,000	0,000	0,000	0,000	-0,004

- *Fator de acumulação Biota – Sedimento (BSAF)*

Bioacumulação é o processo no qual substâncias químicas provenientes do ambiente são assimiladas e retidas pelos organismos (Kong et al., 2015). O processo de acumulação nos organismos aquáticos pode ocorrer por duas vias: (i) absorção direta da água e/ou sedimento através das brânquias ou pele e (ii) pela ingestão de alimentos contaminados transferidos por meio do intestino para o corpo (Zhou et al., 2007; Oost et al., 1996). Com o objetivo de investigar mais profundamente os processos de bioacumulação em bivalves, os fatores de acumulação biota-sedimento (BSAF) foram calculados para alguns IE.

Neste estudo, o BSAF foi calculado de acordo com a equação 1 (Huang et al., 2008).

$$\text{BSAF} = \frac{\text{Cb/Cl}}{\text{Cs/CO}} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: Cb é concentração do analito no tecido do bivalve (ng g⁻¹); Cl é o conteúdo lipídico no tecido do bivalve (g lipídio g⁻¹ bivalve); Cs é a concentração do analito no sedimento (ng g⁻¹); CO é o carbono orgânico no sedimento (g CO g⁻¹ sedimento).

Dentre os 14 IE analisados neste estudo, apenas os compostos 4 n-NP, DMP, DEP e DEHP, amostrados na cidade de Madre de Deus, foram detectados em concentrações acima do LD no tecido dos três organismos e também no sedimento, logo estes foram selecionado para a avaliação do fator de bioacumulação (Tabela 15).

Tabela 15: Fator de acumulação sedimento-biota calculados para bivalves coletados na Baía de Todos os Santos, Bahia – Brasil.

	Ostra						Sururu			Chumbinho					
	#1			#2			#1			#1			#2		
	Cb	Cs	BSAF	Cb	Cs	BSAF	Cb	Cs	BSAF	Cb	Cs	BSAF	Cb	Cs	BSAF
4 n-NP	24,00	2,000	1,074	26,00	5,000	1,538	15,00	3,000	0,797	24,00	2,000	0,318	34,00	5,000	0,200
DMP	115,0	93,00	0,110	120,0	82,00	0,432	607,0	77,00	1,258	290,0	40,80	0,188	266,0	82,00	0,957
DEP	147,0	620,0	0,021	491,0	290,0	0,500	580,0	433,0	0,213	--	--	--	267,0	452,0	0,017
DEHP	876,0	355,0	0,220	535,0	311,0	0,508	467,0	422,0	0,176	1296	535,0	0,064	1584	417,0	0,112
CI	0,0471			0,0317			0,1437			0,1591			0,3183		
CO	0,0042			0,0093			0,0229			0,0042			0,0093		

Cb: Concentração do IE no organismo (ng g^{-1}); Cs: concentração do IE no sedimento (ng g^{-1}); CI: quantidade de lipídio no organismo (g lipídio g^{-1} amostra); CO: Carbono orgânico total (g carbono g^{-1} sedimento)

Os valores encontrados, em sua maioria, foram próximos ou abaixo de 1 para todos os compostos indicando a não bioacumulação destes compostos nos organismos avaliados. Conforme a ASTM 1997, a bioacumulação só ocorre quando o valor para o BSAF é superior a 1. Contudo, um valor para o BSAF de 1,7 é estimado para representar a partição no equilíbrio teórico de compostos orgânicos não iônicos entre as quantidades de lipídios no organismo e de carbono orgânico no sedimentos. Um valor maior que 1,7 indica uma absorção do composto orgânico no lipídio (Ozkoc et al., 2007).

Casatta et al (2015) reportaram valor semelhante para o BASF do NP (0,11 – 0,48) para chumbinho e também por Fay et al (2000) (0,93), para *Ampelisca ábdita*, um anfípode marinho. Hecht et al (2004) encontraram valores muito mais elevados para o NP (4,7 – 33,9). Segundo os autores altos valores de BSAF podem ser atribuídos aos hábitos de alimentação dos anfípodes e também a baixa capacidade de metabolizar os contaminantes, tendo em vista que esses fatores podem influenciar a acumulação do NP nesses organismos.

Para os ftalatos os valores encontrado foram inferiores aos valores relatados por Teil et al (2012) (0,5 – 7,1) e por Hung et al (2008) (2,4 – 40,9) para espécies de peixes. Os valores

elevados de BSAF para peixes podem estar relacionados com os hábitos de vida desses animais.

Zhang et al (2011) verificaram que valores de BSAF para o NP aumentaram de 0,07 para 0,4 entre as espécies de peixe (*Sparus latus*) e chumbinho (*Ruditapes philippinarum*), respectivamente. A fonte de alimentação do chumbinho são organismos bentônicos, que vivem associados a sedimentos e assim podem acumular uma maior quantidade de contaminantes. Lee et al. (2014) calcularam BSAF para musks sintéticos em sururu (*Mytilus coruscus e Mytilus edulis*) e ostras (*Crassostrea gigas*) e foi observado que em apenas um único ponto de amostragem o valor do BSAF foi superior a 1,7 para um dos compostos. Neste estudo, água poderia ser uma fonte de contaminação para estes organismos já que bivalves são considerados organismos filtradores e podem absorver contaminantes de diferentes compartimentos ambientais.

A absorção de contaminantes a partir de partículas em suspensão, o que é geralmente menos eficaz do que a partir da água, associada a biodisponibilidade e ao metabolismo de cada substância influenciam a redução do BSAF (Komorita et al., 2014; Zhang et al., 2011). Bivalves podem se tornar uma fonte de exposição de substâncias químicas a níveis tróficos superiores, uma vez que são alimentos para diferentes espécies de peixes, aves ou mamíferos. Não existem dados específicos disponíveis na literatura sobre os efeitos da bioacumulação destas classes de IE em bivalves marinhos e nem do potencial de biomagnificação ao longo da cadeia trófica. No entanto, os dados relativos aos IE no presente estudo não evidenciam processo de bioacumulação na espécies de bivalves estudadas.

5.3 Interferentes Endócrinos em Peixes e Mariscos Comercializados na Cidade De Salvador - Ba

Medidas de interferentes endócrinos foram realizadas em peixes e mariscos comercializados na cidade de Salvador – BA com o objetivo de avaliar a qualidade dos pescados consumidos pela população.

Para a realização deste estudo foram compradas 13 espécies de peixes: Raia (*Dasyatis angricana*), Vermelho (*Lutjanus synagris*), Sororoca (*Scomberomorus brasiliensis*), Guaiuba (*Ocyurus crysurus*), Sardinha (*Opisthonema oglinum*), Corvina (*Micropogonis furnieri*), Chumbrega (*Carnx crysus*), Pititinga (*Anchoa lyolepis*), Olho de Boi (*Seriola dumerilli*), Atum (*Thunnus atlanticus*), Pescada Branca (*Cynoscion leiarchus*), Badejo (*Mycteroperca bonaci*) e Dourado (*Salminus maxillosus*), sendo três indivíduos de cada espécie. Adicionalmente, foram também adquiridas 6 espécies de frutos do mar: sururu (*Mytella guyanensis*), ostra (*Crassostrea rhizophorae*), chumbinho (*Anomalocardia brasiliiana*), caranguejo (*Ucides cordatus*), camarão (*Penaeus subtilis*) e siri (*Callinectes sapidus*).

As amostras foram compradas em mercados municipais. Os pescados e frutos do mar estavam frescos, e não estavam envolvidos em embalagens plásticas ou de isopor, os quais podem ser uma importante fonte de contaminação para as amostras, visto que a maioria dos compostos estudados (BPA, alquilfenóis e ftalatos) são utilizados na fabricação de plásticos e estes podem migrar para os alimentos. Logo, é possível inferir que as concentrações encontradas nos organismos foram provenientes do *habitat* e/ou seus hábitos alimentares.

Foi observada a presença da maioria dos IE estudados nas amostras analisadas (Tabela 16). Os ftalatos foram a classe de compostos de maior ocorrência seguido dos alquilfenóis e BPA enquanto que os hormônios foram os compostos menos presentes nas amostras.

As concentrações dos hormônios variaram de 1 ng g⁻¹ para o EE2 (Chumbrega) a 26 ng g⁻¹ para o E3 (Guaiuba). O BPA foi encontrado em concentrações de 3 ng g⁻¹ (Dourado) a 81 ng g⁻¹ (Chumbinho). Dentre os alquilfenóis, o 4 t-OP não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas. O 4 n-OP foi o composto que apresentou a maior concentração (45 ng g⁻¹ – no Dourado), e o 4 n-NP a menor concentração (1 ng g⁻¹ - ostras). Os valores encontrados para esses compostos foram, de um modo geral, inferiores aos valores descritos por Basheer et al (2004). Eles determinaram alquilfenóis e BPA em uma diversidade mariscos comercializados na Singapura. O nonilfenol, por exemplo, foi detectado em camarões numa

Tabela 16: Níveis de concentração (ng g⁻¹) dos interferentes endócrinos estudados em amostras de peixes e frutos do mar comercializados na cidade de Salvador – Bahia, Brasil.

	E3	BPA	E2	EE2	E1	4 n-OP	4 n-NP	DMP	DEP	BBP	DEHP	DnOP
Pititinga	<LD	<LD	<LD	4,667	18,32	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Sardinha	<LD	<LD	7,289	<LD	9,554	<LD	2,893	461,7	664,4	<LD	<LD	<LD
Chumbrega	<LD	<LD	7,805	1,467	4,497	<LD	4,938	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Vermelho	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	3,234	2739	<LD	<LD	<LD	<LD
Guaiuba	26,06	<LD	<LD	<LD	<LD	16,24	6,444	<LD	<LD	1551	1356	204,1
Sororca	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	2,950	<LD	<LD	<LD	2176	729,6
Corvina	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	3,687	1174	376,2	<LD	831,2	198,0
Arraia	<LD	6,807	<LD	<LD	4,973	13,52	3,770	2121	<LD	316,0	<LD	<LD
Olho de Boi	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	25,69	2,975	1365	210	459,2	750,1	386,7
Atum	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	126,8	201,8	354,2
Dourado	<LD	2,941	<LD	4,417	<LD	45,20	<LD	<LD	<LD	613,0	87,09	326,8
Badejo	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	216,6	696,7	<LD	<LD
Pescada	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Sururu	<LD	<LD	23,06	<LD	<LD	14,07	<LD	405,3	807,0	<LD	<LD	<LD
Siri	<LD	16,41	19,64	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	1718	<LD
Ostra	<LD	13,98	<LD	<LD	<LD	<LD	1,226	<LD	3397	<LD	<LD	<LD
Chumbinho	<LD	81,05	<LD	14,09	<LD	<LD	<LD	323,6	477,1	253,1	<LD	<LD
Caranguejo	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	4,671	<LD	402,5	137,2	<LD	<LD	<LD
Camarão	<LD	30,67	<LD	3,241	<LD	7,348	<LD	247,2	<LD	<LD	<LD	<LD

LD = Limite de Detecção. (LD em ng g⁻¹: E3 = 0,6; BPA = 0,7; E2 = 0,8; EE2 = 0,6; E1 = 3,9; 4 n-OP = 0,4; 4 t-OP = 0,6; 4 n-NP = 0,5; DMP = 40; DEP = 45; BBP = 55; DBP = 60; DEHP = 30; DnOP = 30)

concentração de 197 ng g⁻¹. Em caranguejos, o BPA foi encontrado na concentração de 213 ng g⁻¹; e o OP em chumbinho foi encontrado em até 44 ng g⁻¹.

Em regiões industrializadas da Itália, foram encontrados elevados níveis de alquilfenóis em pescados, os quais também foram superiores as concentrações apresentadas neste estudo. No Mar Tirreno, o octilfenol foi determinado em atum na concentração 28 ng g⁻¹ e o nonilfenol em camarão na concentração de 1220 ng g⁻¹ (Ferrara et al., 2008). No Mar Adriático, as concentrações encontradas em lulas de octilfenol foi de 19 ng g⁻¹ e de NP de 696 ng g⁻¹ (Ferrara et al., 2001). As elevadas concentrações desses compostos nestes organismos estão relacionadas com o fato de que o Mar Tirreno recebe descargas fluviais oriundas de diversas cidades da Itália, como Roma, e também de distritos industriais e agrícolas que transportam assim grandes quantidades de alquilfenóis. O Mar Adriático também é uma região que recebe descargas de distritos industriais italianos. Tavazzi et al (2002) determinaram nonilfenol e octilfenol em fígado de peixes e encontraram concentrações de até 5400 ng g⁻¹ e 850 ng g⁻¹, respectivamente. Os altos valores de concentrações desses compostos refletem a localização dos pontos de amostragem. Quanto mais próximos a uma planta de tratamento de esgoto, maiores foram os níveis de concentração dos compostos encontrados.

Para os ftalatos, as concentrações encontradas neste estudo variaram de 87 ng g⁻¹ para o DEHP (Dourado) a 3397 ng g⁻¹ para o DEP (Ostra), sendo que o DnOP apresentou-se sempre abaixo do limite de detecção. Comparados com peixes da espécie *Rutilus rutilus* no rio Ogre (Valton et al., 2014), na França as concentrações dos seis ftalatos, foram sempre inferiores. No entanto, valores comparáveis com o presente trabalho, foram relatados por Munshi et al (2013) tanto para peixe quanto para mariscos coletados na Baía Chesapeake, na costa da Virginia. O DEHP foi o composto que apresentou a maior variação de concentração (500 ng g⁻¹ (chumbinho) – 2500 ng g⁻¹ (ostra)). O nível de ftalatos nas amostras pode ser afetado tanto pelo *habitat* dos peixes quanto pelas propriedades físico-químicas desses contaminantes, já que os ftalatos são compostos lipofílicos, o que permitem o acúmulo destes compostos junto à matéria orgânica presente nos sedimentos. Por meio de hábitos alimentares e através de cadeia alimentar estes compostos podem ser transportados até as espécies superiores.

Alguns estudos sugerem que a ingestão de peixes e mariscos tem sido a principal fonte de exposição humana aos contaminantes fenólicos, tais como o BPA e as alquilfenóis. Essa relação foi observada por meio da quantidade de peixes e frutos do mar consumidos e as

concentrações de BPA, OP e NP encontrados em tecido humano, soro e leite (Mita et al., 2011; Ferrara et al., 2011; Lopez-Espinosa et al., 2009)

A quantidade ingerida desses compostos pode ser estimada por meio do cálculo da dose diária ingerida (DI). Segundo a USEPA (1989), a DI quantifica a exposição a um agente químico específico para cada via de exposição identificada, expressa em $\text{mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, e pode ser calculada pela Equação 2.

$$\text{DI} = \frac{(\text{CxIRxFIxEFxED})}{(\text{BWxAT})} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: C é a concentração do contaminante no alimento (mg kg^{-1}); IR a taxa de ingestão (kg dia^{-1}); FI a fração ingerida do contaminante, e EF a frequência de exposição (dias ano^{-1}), ED corresponde ao tempo de duração da exposição (anos); BW o peso corporal (kg) e AT o período de exposição (anos).

Neste trabalho foi utilizado para os cálculos parâmetros referentes a indivíduos adultos para estimar a ingestão diária (DI). Onde IR x FI foi de $0,0301 \text{ kg dia}^{-1}$ (Duan et al., 2011); EF de $365 \text{ dias ano}^{-1}$ (USEPA, 2011); ED de 70 anos (USEPA, 2011); BW de 60 Kg (Duan et al., 2011) e AT de $365 \text{ dias} \times \text{ED}$ (USEPA, 2004).

Os valores de DI encontrados neste trabalho são apresentados na Tabela 17, e foi observado que, para todos os compostos analisados esses valores foram sempre inferiores aos estabelecidos por agencias regulamentadoras internacionais.

Tanto o bisfenol A quanto o nonilfenol apresentam taxas de ingestão diária de $0,05 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, de acordo com a legislações europeia como a Autoridade de Segurança Alimentar (EFSA - *European Food Safety Authority*) e a Agência Ambiental da Dinamarca (*Danish Environmental Agency*), respectivamente. As taxas calculadas no presente estudo para o BPA ($1,5 \times 10^{-6} - 4,0 \times 10^{-5} \text{ mg Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$); o 4 n-OP ($2,3 \times 10^{-6} - 3,8 \times 10^{-5} \text{ mg Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) e o

Tabela 17: Valores de ingestão diária (mg Kg⁻¹ dia⁻¹) calculados para amostras de peixes e mariscos comercializados na cidade de Salvador, Bahia – Brasil

Amostra	E3	BPA	E2	EE2	E1	4 n-OP	4 n-NP	DMP	DEP	BBP	DEHP	DnOP
Pititinga	NC	NC	NC	2,3E-06	9,2E-06	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Sardinha	NC	NC	3,6E-06	0	4,8E-06	NC	1,4E-06	2,30E-04	3,3E-04	NC	NC	NC
Chumbrega	NC	NC	3,9E-06	7,3E-07	2,5E-06	NC	2,4E-06	NC	NC	NC	NC	NC
Vermelho	NC	NC	NC	NC	NC	NC	1,6E-06	1,3E-03	NC	NC	NC	NC
Guaiuba	1,3E-05	NC	NC	NC	NC	3,8E-05	3,2E-06	NC	NC	7,7E-04	6,8E-04	1,0E-04
Sororca	NC	NC	NC	NC	NC	NC	1,5E-06	NC	NC	NC	1,1E-03	3,6E-04
Corvina	NC	NC	NC	NC	NC	NC	1,8E-06	5,8E-04	1,8E-04	NC	4,1E-04	9,8E-05
Arraia	NC	3,4E-06	NC	NC	2,5E-06	6,8E-06	1,8E-06	1,0E-03	NC	1,5E-04	NC	NC
Olho de Boi	NC	NC	NC	NC	NC	1,3E-05	1,4E-06	6,8E-04	1,0E-04	2,3E-04	3,7E-04	1,9E-04
Atum	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	6,3E-05	1,1E-04	1,7E-04
Dourado	NC	1,5E-06	NC	2,2E-06	NC	2,3E-05	NC	NC	NC	3,0E-04	4,3E-05	1,6E-04
Badejo	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	1,0E-04	3,5E-04	NC	NC
Sururu	NC	NC	4,6E-05	NC	NC	7,0E-06	NC	2,0E-04	4,0E-04	NC	NC	NC
Siri	NC	8,2E-06	9,8E-06	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	8,6E-04	NC
Ostra	NC	6,9E-06	NC	NC	NC	NC	6,1E-07	NC	1,7E-03	NC	NC	NC
Chumbinho	NC	4,0E-05	NC	7,0E-06	NC	NC	NC	1,6E-04	2,3E-04	1,2E-04	NC	NC
Caranguejo	NC	NC	NC	NC	NC	2,3E-06	NC	2,0E-04	6,8E-05	NC	NC	NC
Camarão	NC	1,5E-05	NC	1,6E-06	NC	3,7E-06	NC	1,2E-04	NC	NC	NC	NC
DI (mg.Kg ⁻¹ .dia ⁻¹)	NE	0,05 ^a	NE	NE	NE	NE	0,005 ^b	NE	0,5 ^c	0,5 ^a	0,05 ^a	NE

NC: Não calculado; NE: Não encontrado; a: EFSA (European Food Safety Authority); b: Danish Environmental Agency; c: WHO (World Health Organization)

4n-NP ($6,1 \times 10^{-7} - 3,2 \times 10^{-6} \text{ mg Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) foram comparáveis aos valores de DI determinados em músculos de peixes do Golfo do Gdansk (Staniszewska et al., 2014). Ambos não representam risco por ingestão aos seres humanos, já que se encontram aos valores permitidos por tais agências. Estes valores referentes às doses diárias também se encontram muito abaixo do que são indicados em outros países, como a Alemanha, Itália, Nova Zelândia e Taiwan. (Ferrara et al., 2011)

Para os ftalatos, as taxas de DI foram de $1,2 \times 10^{-7} - 3,2 \times 10^{-6} \text{ mg Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (DMP); $6,8 \times 10^{-5} - 1,7 \times 10^{-3} \text{ mg Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (DEP); $6,3 \times 10^{-5} - 7,7 \times 10^{-4} \text{ mg Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (BBP); $4,3 \times 10^{-5} - 1,1 \times 10^{-3} \text{ mg Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (DEHP); $9,8 \times 10^{-5} - 3,6 \times 10^{-4} \text{ mg Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (DnOP). Conforme a EFSA a DI máxima permitida para o BBP e o DEHP são, respectivamente 0,5 e 0,05 $\text{mg Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e para o DEP a Organização Mundial de Saúde (WHO - *World Health Organization*) determina também um dose diária de até 0,5 $\text{mg Kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Todos os valores encontrados tanto para os peixes como também para os mariscos estão abaixo dos valores regulamentados por agências internacionais.

A ingestão de ftalatos foi investigada por Sioen et al. (2012). Este estudo foi realizado na Bélgica com crianças (2,5-6,5 anos de idade) e adultos (≥ 15 anos de idade) para os seguintes ftalatos: DMP, DEP, DIBP, DBP, BBP, DCHP, DEHP e DOP. Assim como o presente estudo, a exposição alimentar foi avaliada por meio do cálculo de ingestão diária e eles também concluíram que os valores de DI encontrados estavam de acordo com o que é estabelecido tanto pela EFSA quanto pelo WHO.

Mariscos de diferentes regiões da BTS foram avaliados referentes à contaminação por metais e conseqüente risco toxicológico à população (de Souza et al., 2011). Contrariamente a este estudos, os valores encontrados para o risco associados ao consumo de mariscos bivalves foram relevantes em todos os pontos de amostragem. Todas as estações apresentaram risco de alto a crítico para crianças e adultos, sendo a Baía de Aratu e a foz do rio Subaé as regiões com os riscos mais elevados. Dentre as espécies estudadas, foi observado que o sururu foi a espécie que apresentou o maior risco carcinogênico e não carcinogênico ao ser humano associado à sua ingestão.

Grande parte dos compostos avaliados neste estudo foram detectados acima do LD, principalmente os ftalatos, entretanto o consumo de peixes e mariscos na cidade de Salvador não se caracteriza um risco de contaminação por IE para a população, haja visto que as doses de ingestão diárias se encontram abaixo dos valores estabelecidos. Contudo é preciso

considerar que apenas três indivíduos de cada espécie de peixe foram avaliados, e estes foram comprados em uma única vez e de um mesmo vendedor. E também que existem outras formas de exposição, tais como ar, água, e outras fontes de alimentação como os vegetais, frutas, ovos, leite, carne, etc.

6. CONCLUSÕES

O método desenvolvido para avaliar a presença de interferentes endócrinos em organismos marinho se mostrou simples, rápido, eficiente, utiliza uma pequena quantidade de solvente, gerando muito pouco resíduo, e ainda permite a determinação de 14 interferentes endócrinos em nível de ng g^{-1} em bivalves. A metodologia que consistiu da extração dos IE em amostras de ostras, sururu e chumbinho por extração assistida por micro-ondas (MAE) seguida por análise de UFLC-FLD-DAD, teve procedimento validado e resultados mostrando uma boa exatidão, com baixos limites de detecção e quantificação. Foram detectados nas amostras analisadas 9 compostos entre os 14 interferentes endócrinos estudados (BPA, E1, EE2, 4 t-OP, 4 n-NP, DMP, BBP, DEHP e DnOP).

O presente estudo verificou a ocorrência de 3 importantes classes de IE além do BPA em organismos marinhos. Os ftalatos foram a classe de compostos detectados com maior frequência tanto nos tecidos dos bivalves quanto no sedimento, com elevadas concentrações de DnOP nos bivalves e de BBP no sedimento coletados na Baía de Todos os Santos.

A bioacumulação dos compostos foi avaliada por meio do cálculo do fator de acumulação biota-sedimento (BSFA), que por sua vez apresentou baixos valores (<1) indicando assim que não está ocorrendo bioacumulação destes compostos na biota.

Peixes e mariscos foram avaliados referente a contaminação por interferentes endócrinos além do risco de contaminação por ingestão destes alimentos para a população. A maioria dos compostos estudados, com exceção apenas do 4 t-OP e do DBP, foi detectada nas amostras de peixes e mariscos comercializados na cidade de Salvador e consumidos pela população. Contudo os níveis de concentração encontrados nas amostras foram, de um modo geral, abaixo de valores reportados na literatura e não foram apontados como prejudiciais à saúde humana, haja visto que as taxas de ingestão diária calculadas foram sempre abaixo do valor mínimo estabelecido para esses contaminantes.

Esse trabalho representa uma importante contribuição à sociedade visto que não há disponível na literatura estudos envolvendo essas classes de interferentes endócrinos em organismos marinhos no Brasil. Além disso, este é o primeiro estudo que apresenta um método de extração e resultados para a quantificação dos 14 IE (E1, E2, EE2, E3, BPA, 4 n-OP, 4 t-OP, 4 n-NP, DMP, DEP DBP, BBP, DnOP e DEHP) em tecido de organismos

marinhos coletados na Baía de Todos os Santos, bem como peixes e mariscos comercializados em Salvador - Ba.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Estudos de monitoramento sazonal desses compostos na biota, água e sedimento coletada na BTS associados a testes ecotoxicológicos e assim gerar resultados conclusivos sobre o real efeito que estes interferentes possa vir a causar na biota.
- Ampliar os estudos com a biota proveniente de diferentes regiões da BTS, como o estuário do Rio Subaé, uma das áreas mais impactadas da baía.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Ansari, A.M., Saleem, A., Kimpe, L.E., Trudeau, V.L., Blais, J.M., 2011. The development of an optimized sample preparation for trace level detection of 17-ethinylestradiol and estrone in whole fish tissue. *J. Chromatogr. B* 879, 3649–3652.
- Andersson, A.M., Jensen, T.K., Juul, A., Petersen, J.H., Jørgensen, T., Skakkebæk, N.E., 2007. Secular decline in male testosterone and sex hormone binding globulin serum levels in Danish population surveys. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 4696–4705.
- Aparicio, I., Santos, J.L., Alonso, E., 2007. Simultaneous sonication-assisted extraction, and determination by gas chromatography-mass spectrometry, of di-(2-ethylhexyl)phthalate, nonylphenol, nonylphenol ethoxylates and polychlorinated biphenyls in sludge from wastewater treatment plants. *Anal. Chim. Acta* 584, 455–461.
- Arditsoglou, A., Voutsas, D., 2012. Occurrence and partitioning of endocrine-disrupting compounds in the marine environment of Thermaikos Gulf, Northern Aegean Sea, Greece. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2443–52.
- Arditsoglou, A., Voutsas, D., 2008. Determination of phenolic and steroid endocrine disrupting compounds in environmental matrices. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 15, 228–36.
- Ballesteros-Gómez, A., Rubio, S., 2011. Recent advances in environmental analysis. *Anal. Chem.* 83, 4579–613.
- Bartolomé, L., Cortazar, E., Raposo, J.C., Usobiaga, a., Zuloaga, O., Etxebarria, N., Fernández, L. a., 2005. Simultaneous microwave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, phthalate esters and nonylphenols in sediments. *J. Chromatogr. A* 1068, 229–236.
- Basheer, C., Lee, H.K., Tan, K.S., 2004. Endocrine disrupting alkylphenols and bisphenol-A in coastal waters and supermarket seafood from Singapore. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 1161–7.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Sorbe, J.C., Burgeot, T., Bellocq, J., 1998. Concentrations of PHAs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Mar. Pollut. Bull.* 36, 951–960.
- Beck, J., Totsche, K.U., Kögel-Knabner, I., 2008. A rapid and efficient determination of natural estrogens in soils. *Chemosphere* 71, 954–960.
- Beretta, M., Britto, V., Tavares, T.M., da Silva, S.M.T., Pletsch, A.L., 2014. Occurrence of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in marine sediments in the Todos os Santos Bay and the north coast of Salvador, Bahia, Brazil. *J. Soils Sediments* 14, 1278–1286.
- Bergé, A., Cladière, M., Gasperi, J., Coursimault, A., Tassin, B., Moilleron, R., 2013. Meta-analysis of environmental contamination by phthalates. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 8057–8076.
- Bila, D.M., Dezotti, M., 2007. DESREGULADORES ENDÓCRINOS NO MEIO AMBIENTE: EFEITOS E CONSEQUÊNCIAS. *Quim. Nova* 30, 651–666.
- Bossio, J.P., Harry, J., Kinney, C. a, 2008. Application of ultrasonic assisted extraction of chemically diverse organic compounds from soils and sediments. *Chemosphere* 70, 858–

64.

- Bouzas, A., Aguado, D., Martí, N., Pastor, J.M., Herráez, R., Campins, P., Seco, A., 2011. Alkylphenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in eastern Mediterranean Spanish coastal marine bivalves. *Environ. Monit. Assess.* 176, 169–81.
- Broman, D., Nfif, C., Lundbergh, I., Zebijhr, Y., 1990. An in situ study of the distribution, biotransformation and flux of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an aquatic food chain (seston- *Mytilus edulis* L.-*Somateria mollissima* L.) from the Baltic: an ecotoxicological perspective. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 429–442.
- Camel, V., 2000. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *Trends Anal. Chem.* 19, 229–248.
- Campíns-Falcó, P., Verdú-Andrés, J., Sevillano-Cabeza, a, Herráez-Hernández, R., Molins-Legua, C., Moliner-Martinez, Y., 2010. In-tube solid-phase microextraction coupled by in valve mode to capillary LC-DAD: Improving detectability to multiresidue organic pollutants analysis in several whole waters. *J. Chromatogr. A* 1217, 2695–702.
- Capelo, J., Mota, a., 2005. Ultrasonication for Analytical Chemistry. *Curr. Anal. Chem.* 1, 193–201.
- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Revilla-Ruiz, P., Hernández-Méndez, J., 2005. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *J. Chromatogr. A* 1089, 1–17.
- Casatta, N., Mascolo, G., Roscioli, C., Viganò, L., 2015. Science of the Total Environment Tracing endocrine disrupting chemicals in a coastal lagoon (Sacca di Goro , Italy): Sediment contamination and bioaccumulation in Manila clams 511, 214–222.
- Cathum, S., Sabik, H., 2001. Determination of steroids and coprostanol in surface water, effluent and mussel using gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* 53, S394–S399.
- Cheng, C.-Y., Liu, L.-L., Ding, W.-H., 2006. Occurrence and seasonal variation of alkylphenols in marine organisms from the coast of Taiwan. *Chemosphere* 65, 2152–9.
- Cheng, H., Kumar, M., Lin, J., 2008. Assessment of Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP) in Municipal and Industrial Sludges of Taiwan by Supercritical Fluid Extraction (SFE) and Gas Chromatography with Electron Ionization Detection. *Sep. Sci. Technol.* 43, 132–146.
- Cheng, Z., Nie, X.P., Wang, H.S., Wong, M.H., 2013. Risk assessments of human exposure to bioaccessible phthalate esters through market fish consumption. *Environ. Int.* 57-58, 75–80.
- Cifuentes, L.A., Coffin, R.B., Solorzano, L., Cardenas, W., Espinoza, J., Twilley, R.R., 1996. Isotopic and Elemental Variations of Carbon and Nitrogen in a Mangrove Estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 43, 781–800.
- Cirano, M., Lessa, G.C., 2007. OCEANOGRAPHIC CHARACTERISTICS OF BAÍA DE TODOS OS SANTOS, BRAZIL. *Rev. Bras. Geofísica* 25, 363–387.
- Clara, M., Strenn, B., Saracevic, E., Kreuzinger, N., 2004. Adsorption of bisphenol-A, 17 beta-estradiol and 17 alpha-ethinylestradiol to sewage sludge. *Chemosphere* 56, 843–851.
- Corl, E., 2001. Bioaccumulation in the ecological risk assessment (ERA) process. *Issue Pap.* 1–12.

- Cortazar, E., Bartolomé, L., Delgado, A., Etxebarria, N., Fernández, L. A., Usobiaga, A., Zuloaga, O., 2005. Optimisation of microwave-assisted extraction for the determination of nonylphenols and phthalate esters in sediment samples and comparison with pressurised solvent extraction. *Anal. Chim. Acta* 534, 247–254.
- Cotrim, G., 2015. Interferentes Endócrinos em Ambientes Estuarinos. Tese de Doutorado: Universidade Federal da Bahia.
- Cousins, I.T., Staples, C. a., Klecka, G.M., Mackay, D., 2002. A Multimedia Assessment of the Environmental Fate of Bisphenol A. *Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J.* 8, 1107–1135.
- CRA Diagnóstico ambiental do grau de contaminação da Baía de Todos os Santos por metais pesados e hidrocarbonetos., 2004.
- Czech, P., Weber, K., Dietrich, D.R., 2001. Effects of endocrine modulating substances on reproduction in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis* L. *Aquat. Toxicol.* 53, 103–114.
- D'Amato, C., Torres, J.P.M., Malm, O., 2002. DDT (dicloro difenil tricloroetano): Toxicidade e contaminação ambiental uma revisão. *Quim. Nova* 25, 995–1002.
- Da Rocha, G.O., Guarieiro, a L.N., De Andrade, J.B., Eça, G.F., Aragão, N.M., Aguiar, R.M., Korn, M.G. a, Brito, G.B., Moura, C.W.N., Hatje, V., 2012. Contamination at Todos os Santos Bay . *Contam. na Baía Todos os Santos* 4, 583–610.
- Dantas, L.M. V, Hatje, V., Ribeiro, N.M., de Andrade, J.B., 2012. Programa de Pesquisa Baía de Todos os Santos : Resposta à Complexidade das Demandas por Conhecimento. *Rev. Virtual Química* 4, 497–516.
- David, A., Fenet, H., Gomez, E., 2009. Alkylphenols in marine environments: Distribution monitoring strategies and detection considerations. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 953–960.
- de los Ríos, A., Juanes, J. a, Ortiz-Zarragoitia, M., López de Alda, M., Barceló, D., Cajaraville, M.P., 2012. Assessment of the effects of a marine urban outfall discharge on caged mussels using chemical and biomarker analysis. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 563–73.
- de Souza, M.M., Windmöller, C.C., Hatje, V., 2011. Shellfish from Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil: Treat or threat? *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2254–2263.
- Dévier, M.-H., Labadie, P., Togola, A., Budzinski, H., 2010. Simple methodology coupling microwave-assisted extraction to SPE/GC/MS for the analysis of natural steroids in biological tissues: application to the monitoring of endogenous steroids in marine mussels *Mytilus* sp. *Anal. Chim. Acta* 657, 28–35.
- Du, B., Haddad, S.P., Luek, A., Scott, W.C., Saari, G.N., Kristofco, L. a, Connors, K. a, Rash, C., Rasmussen, J.B., Chambliss, C.K., Brooks, B.W., 2014. Bioaccumulation and trophic dilution of human pharmaceuticals across trophic positions of an effluent-dependent wadeable stream. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369, 1–10.
- Duan, X., Tao, S., Xu, D., Jiang, Q., 2011. Exposure measurement and health risk assessment of human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Press.*
- Duft, M., Schulte-Oehlmann, U., Weltje, L., Tillmann, M., Oehlmann, J., 2003. Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Aquat. Toxicol.* 64, 437–449.
- Ebinghaus, R., Xie, Z., 2007. Occurrence and air/sea-exchange of novel organic pollutants in the marine environment. *J. Phys. IV* 139, 211–237.

- Fajar, N.M., Carro, A.M., Lorenzo, R. a, Fernandez, F., Cela, R., 2008. Optimization of microwave-assisted extraction with saponification (MAES) for the determination of polybrominated flame retardants in aquaculture samples. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 25, 1015–1023.
- Farajzadeh, M.A., Nouri, N., Khorram, P., 2014. Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography. *TrAC Trends Anal. Chem.* 55, 14–23.
- Farré, M., Kantiani, L., Petrovic, M., Pérez, S., Barceló, D., 2012. Achievements and future trends in the analysis of emerging organic contaminants in environmental samples by mass spectrometry and bioanalytical techniques. *J. Chromatogr. A* 1259, 86–99.
- Farré, M., Pérez, S., Gonçalves, C., Alpendurada, M.F., Barceló, D., 2010. Green analytical chemistry in the determination of organic pollutants in the aquatic environment. *Trends Anal. Chem.* 29, 1347–1362.
- Fatoki, O.S., Noma, A., 2001. Determination of Phthalate Esters in the Aquatic Environment 1–16.
- Fay, A. A., Brownawell, B. J., Elskus, A. A., McElroy, A. E., 2000. Critical Body Residues in the Marine Amphipod *Ampelisca abdita*: Sediment Exposures With Nonionic Organic Contaminants. *Environ. Toxicol.* 19, 1028–1035.
- Ferguson, P.L., Iden, C.R., Brownawell, B.J., 2001. Distribution and fate of neutral alkylphenol ethoxylate metabolites in a sewage-impacted urban estuary. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2428–35.
- Ferguson, P.L., Iden, C.R., Brownawell, B.J., 2000. Analysis of alkylphenol ethoxylate metabolites in the aquatic environment using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* 72, 4322–30.
- Fernandez, M.A., Limaverde, A.M., de Castro, I.B., Wagener, A. de L.R., 2002. Occurrence of imposex in *Thais haemastoma*: possible evidence of environmental contamination derived from organotin compounds in Rio de Janeiro and Fortaleza, Brazil. *Cad. Saúde Pública, Rio Janeiro* 18, 463–476.
- Ferrara, F., Ademollo, N., Delise, M., Fabietti, F., Funari, E., 2008. Alkylphenols and their ethoxylates in seafood from the Tyrrhenian Sea. *Chemosphere* 72, 1279–85.
- Ferrara, F., Ademollo, N., Orru, M.A., Silvestroni, L., Funari, E., 2011. Alkylphenols in adipose tissues of Italian population. *Chemosphere* 82, 1044–1049.
- Ferrara, F., Fabietti, F., Delise, M., Bocca, P., Funari, E., 2001. Alkylphenolic compounds in edible molluscs of the Adriatic Sea (Italy). *Environ. Sci. Technol.* 35, 3109–12.
- Fidalgo-Used, N., Blanco-González, E., Sanz-Medel, A., 2007. Sample handling strategies for the determination of persistent trace organic contaminants from biota samples. *Anal. Chim. Acta* 590, 1–16.
- Fontenele E. G. P., M.M.R.A., Quidute A. R. P., M.J.R.M., 2010. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. *Arq Bras Endocrinol Metab* 54, 6–16.
- Fromme, H., Kuchler, T., Otto, T., Pilz, K., Müller, J., Wenzel, A., 2002. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res.* 36, 1429–38.
- Fry, D.M., Toone, C.K., 1981. DDT-induced feminization of gull embryos. *Science* (80-.). 213, 922–924.
- Gallart-Ayala, H., Moyano, E., Galceran, M.T., 2010. RECENT ADVANCES IN MASS

SPECTROMETRY ANALYSIS OF PHENOLIC ENDOCRINE DISRUPTORS AND RELATED COMPOUNDS. *Mass Spectrom. Rev.* 29, 776–805.

- Gallart-Ayala, H., Núñez, O., Lucci, P., 2013. Recent advances in LC-MS analysis of food-packaging contaminants. *TrAC Trends Anal. Chem.* 42, 99–124.
- Gentili, A., Marchese, S., Perret, D., 2008. MS techniques for analyzing phenols, their metabolites and transformation products of environmental interest. *TrAC Trends Anal. Chem.* 27, 888–903.
- Genuis, S.J., Beesoon, S., Birkholz, D., Lobo, R.A., 2012. Human excretion of bisphenol A: Blood, urine, and sweat (BUS) study. *J. Environ. Public Health* 2012.
- Ghiselli, Gislaine; Jardim, W.F., 2007. Interferentes endócrinos no ambiente. *Quim. Nova* 30, 695–706.
- Gu, Y., Yu, X., Peng, J., Chen, S., Zhong, Y., Yin, D., Hu, X., 2014. Simultaneous solid phase extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry and gas chromatography tandem mass spectrometry for the highly sensitive determination of 15 endocrine disrupting chemicals in seafood 965, 164–172.
- Guillette, L.J., Pickford, D.B., Crain, D. a, Rooney, a a, Percival, H.F., 1996. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. *Gen. Comp. Endocrinol.* 101, 32–42.
- Guo, L., Li, Z., Gao, P., Hu, H., Gibson, M., 2015. Ecological risk assessment of bisphenol A in surface waters of China based on both traditional and reproductive endpoints. *Chemosphere* 139, 133–137.
- Hatch, E.E., Nelson, J.W., Stahlhut, R.W., Webster, T.F., 2011. Association of Endocrine Disruptors and Obesity: Perspectives from Epidemiologic Studies. *Int. J.* 33, 324–332. doi:10.1111/j.1365-2605.2009.01035.x. Association
- Hatje, V., Barros, F., 2012. Overview of the 20th century impact of trace metal contamination in the estuaries of Todos os Santos Bay: Past, present and future scenarios AN - 1171878722; 17338821. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2603–2614.
- Hatje, V., de Andrade, J.B., 2009. Baía de Todos os Santos Aspectos Oceanográficos. Salvador: EDUFBA.
- Hatje, V., Macedo, S.M., de Jesus, R.M., Cotrim, G., Garcia, K.S., de Queiroz, A.F., Ferreira, S.L.C., 2010. Inorganic As speciation and bioavailability in estuarine sediments of Todos os Santos Bay, BA, Brazil. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 2225–2232.
- Hecht, S. a, Gunnarsson, J.S., Boese, B.L., Lamberson, J.O., Schaffner, C., Giger, W., Jepson, P.C., 2004. Influences of sedimentary organic matter quality on the bioaccumulation of 4-nonylphenol by estuarine amphipods. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 865–873.
- Hernández, F., Sancho, J. V, Ibáñez, M., Abad, E., Portolés, T., Mattioli, L., 2012a. Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 1251–64.
- Hernando, M.D., Mezcuca, M., Gómez, M.J., Malato, O., Agüera, a., Fernández-Alba, a. R., 2004. Comparative study of analytical methods involving gas chromatography–mass spectrometry after derivatization and gas chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of selected endocrine disrupting compounds in wastewaters. *J. Chromatogr. A* 1047, 129–135.
- Herrero, M., Mendiola, J. a, Cifuentes, A., Ibáñez, E., 2010. Supercritical fluid extraction:

- Recent advances and applications. *J. Chromatogr. A* 1217, 2495–511.
- Hotta, Y., Hosoda, A., Sano, F., Wakayama, M., Niwa, K., Yoshikawa, H., Tamura, H., 2010. Ecotoxicity by the biodegradation of alkylphenol polyethoxylates depends on the effect of trace elements. *J. Agric. Food Chem.* 58, 1062–7.
- Hsieh, T.H., Tsai, C.F., Hsu, C.Y., Kuo, P.L., Hsi, E., Suen, J.L., Hung, C.H., Lee, J.N., Chai, C.Y., Wang, S.C., Tsai, E.M., 2012. N-butyl benzyl phthalate promotes breast cancer progression by inducing expression of lymphoid enhancer factor 1. *PLoS One* 7, 1–12.
- Hsu, N.Y., Lee, C.C., Wang, J.Y., Li, Y.C., Chang, H.W., Chen, C.Y., Bornehag, C.G., Wu, P.C., Sundell, J., Su, H.J., 2012. Predicted risk of childhood allergy, asthma, and reported symptoms using measured phthalate exposure in dust and urine. *Indoor Air* 22, 186–199.
- Huang, L.P., Lee, C.C., Hsu, P.C., Shih, T.S., 2011. The association between semen quality in workers and the concentration of di(2-ethylhexyl) phthalate in polyvinyl chloride pellet plant air. *Fertil. Steril.* 96, 90–94.
- Huang, P.C., Tien, C.J., Sun, Y.M., Hsieh, C.Y., Lee, C.C., 2008. Occurrence of phthalates in sediment and biota: Relationship to aquatic factors and the biota-sediment accumulation factor. *Chemosphere* 73, 539–544.
- Huerta, B., Jakimska, A., Llorca, M., Ruhí, A., Margoutidis, G., Acuña, V., Sabater, S., 2015. Development of an extraction and purification method for the determination of multi-class pharmaceuticals and endocrine disruptors in freshwater invertebrates. *Talanta* 132, 373–381.
- Huerta, B., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2012. Pharmaceuticals in biota in the aquatic environment: analytical methods and environmental implications. *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 2611–24.
- Huyghe, E., Matsuda, T., Thonneau, P., 2003. Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *J. Urol.* 170, 5–11.
- Isobe, T., Nishiyama, H., Nakashima, a, Takada, H., 2001. Distribution and behavior of nonylphenol, octylphenol, and nonylphenol monoethoxylate in Tokyo metropolitan area: their association with aquatic particles and sedimentary distributions. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1041–9.
- Isobe, T., Serizawa, S., Horiguchi, T., Shibata, Y., Managaki, S., Takada, H., Morita, M., Shiraishi, H., 2006. Horizontal distribution of steroid estrogens in surface sediments in Tokyo Bay. *Environ. Pollut.* 144, 632–8.
- Isobe, T., Takada, H., Kanai, M., Tsutsumi, S., Isobe, K.O., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P., 2007. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) and phenolic endocrine disrupting chemicals in South and Southeast Asian mussels. *Environ. Monit. Assess.* 135, 423–40.
- Jahnke, A., Gandrass, J., Ruck, W., 2004. Simultaneous determination of alkylphenol ethoxylates and their biotransformation products by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1035, 115–122.
- Jakimska, A., Huerta, B., Bargańska, Ż., Kot-Wasik, A., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2013. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry procedure for determination of endocrine disrupting compounds in fish from Mediterranean rivers. *J. Chromatogr. A* 1306, 44–58.
- Jardim, W.F., Montagner, C.C., Pescara, I.C., Umbuzeiro, G. a., Di Dea Bergamasco, A.M.,

- Eldridge, M.L., Sodr , F.F., 2012. An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water. *Sep. Purif. Technol.* 84, 3–8.
- Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, a. P., Tyler, C.R., 2003. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat. Toxicol.* 65, 205–220.
- Jonkers, N., Laane, R.W.P.M., de Voogt, P., 2003. Fate of nonylphenol ethoxylates and their metabolites in two Dutch estuaries: evidence of biodegradation in the field. *Environ. Sci. Technol.* 37, 321–7.
- Jurgens, M.D., Holthaus, K.I.E., Johnson, A.C., Smith, J.J.L., Hetheridge, M., Williams, R.J., 2002. The potential for estradiol and ethynylestradiol degradation in English Rivers. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 480–488.
- Kang, J.H., Kondo, F., Katayama, Y., 2006. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* 226, 79–89.
- Kato, K., Silva, M.J., Needham, L.L., Calafat, A.M., 2005. Determination of total phthalates in urine by isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 814, 355–60.
- Khim, J.S., Kannan, K., Villeneuve, D.L., Koh, C.H., Giesy, J.P., 1999. Characterization and Distribution of Trace Organic Contaminants in Sediment from Masan Bay , Korea . 1 . Instrumental Analysis. *Environ. Sci. Technol.* 33, 4199–4205.
- Kinsella, B., O’Mahony, J., Malone, E., Moloney, M., Cantwell, H., Furey, A., Danaher, M., 2009. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *J. Chromatogr. A* 1216, 7977–8015.
- Komorita, T., Kajihara, R., Tsutsumi, H., Shibamura, S., Yamada, T., Montani, S., 2014. Food sources for *Ruditapes philippinarum* in a coastal Lagoon determined by mass balance and stable isotope approaches. *PLoS One* 9.
- Kong, P., Luo, W., Lu, Y., Wang, T., Jiao, W., Hu, W., Naile, J.E., Khim, J.S., Giesy, J.P., 2015. Distribution and bioaccumulation of lead in the coastal watersheds of the Northern Bohai and Yellow Seas in China. *Environ. Geochem. Health* 37, 491–506.
- Labadie, P., Budzinski, H., 2005. Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 381, 1199–205.
- Labadie, P., Hill, E.M., 2007. Analysis of estrogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. Comparison of tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1141, 174–81.
- Lanças, F.M., 2002. Extra o com fluido supercrítico: quo vadis? *Analytica* 30–37.
- Latini, G., Wittassek, M., Del Vecchio, A., Presta, G., De Felice, C., Angerer, J., 2009. Lactational exposure to phthalates in Southern Italy. *Environ. Int.* 35, 236–9.
- Lee, I.S., Kim, U.J., Oh, J.E., Choi, M., Hwang, D.W., 2014. Comprehensive monitoring of synthetic musk compounds from freshwater to coastal environments in Korea: With consideration of ecological concerns and bioaccumulation. *Sci. Total Environ.* 470-471, 1502–1508.
- Leonards, P.E.G., Zierikzee, Y., Cofino, W.P., Van Hattum, B., Brinkman, U. a T., Van Straalen, N.M., 1997. The selective dietary accumulation of planar polychlorinated

- biphenyls in the otter (*Lutra lutra*). *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1807–1815.
- Li, D., Dong, M., Shim, W.J., Yim, U.H., Hong, S.H., Kannan, N., 2008a. Distribution characteristics of nonylphenolic chemicals in Masan Bay environments, Korea. *Chemosphere* 71, 1162–72.
- Li, D., Dong, M., Shim, W.J., Yim, U.H., Hong, S.H., Kannan, N., 2008b. Distribution characteristics of nonylphenolic chemicals in Masan Bay environments, Korea. *Chemosphere* 71, 1162–72.
- Li, J., Cai, Y., Shi, Y., Mou, S., Jiang, G., 2008. Analysis of phthalates via HPLC-UV in environmental water samples after concentration by solid-phase extraction using ionic liquid mixed hemimicelles. *Talanta* 74, 498–504.
- Liang, P., Zhang, L., Peng, L., Li, Q., Zhao, E., 2010. Determination of phthalate esters in soil samples by microwave assisted extraction and high performance liquid chromatography. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 85, 147–151.
- Limpiyakorn, T., Homklin, S., Ong, S.K., 2009. Contaminants of Emerging Environmental Concern., in: ASCE.
- Lisboa, N.S., Fahning, C.S., Cotrim, G., dos Anjos, J.P., de Andrade, J.B., Hatje, V., da Rocha, G.O., 2013. A simple and sensitive UFLC-fluorescence method for endocrine disrupters determination in marine waters. *Talanta* 117, 168–75.
- Liu, J., Wang, R., Huang, B., Lin, C., Zhou, J., Pan, X., 2012. Biological effects and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in high-back crucian carp exposed to wastewater treatment plant effluents. *Environ. Pollut.* 162, 325–331.
- Liu, X., Sun, Z., Chen, G., Zhang, W., Cai, Y., Kong, R., Wang, X., Suo, Y., You, J., 2015. Determination of phthalate esters in environmental water by magnetic Zeolitic Imidazolate Framework-8 solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1409, 46–52.
- Lopes, L.G., Marchi, M.R.R., Souza, J.B.G., Moura, J. a., Lorenzon, C.S., Cruz, C., Amaral, L. a., 2010. Estrogênios em águas naturais e tratadas da região de jaboticabal - São Paulo. *Quim. Nova* 33, 639–643.
- Lopez-Espinosa, M.J., Freire, C., Arrebola, J.P., Navea, N., Taoufiki, J., Fernandez, M.F., Ballesteros, O., Prada, R., Olea, N., 2009. Nonylphenol and octylphenol in adipose tissue of women in Southern Spain. *Chemosphere* 76, 847–852.
doi:10.1016/j.chemosphere.2009.03.063
- Ma, T., Teng, Y., Christie, P., Luo, Y., Chen, Y., Ye, M., HUANG, Y., 2013. A new procedure combining GC-MS with accelerated solvent extraction for the analysis of phthalic acid esters in contaminated soils. *Front. Environ. Sci. Eng.* 7, 31–42.
- Mackintosh, C.E., Maldonado, J., Hongwu, J., Hoover, N., Chong, a, Ikonomou, M.G., Gobas, F. a. P.C., 2004. Distribution of phthalate esters in a marine aquatic food web: comparison to polychlorinated biphenyls. *Env. Sci Technol* 38, 2011–2020.
- Magdoulis, S., Daghbir, R., Brar, S.K., Tyagi, R.D., 2013. Di 2-ethylhexylphthalate in the aquatic and terrestrial environment: a critical review. *J. Environ. Manage.* 127, 36–49.
- Markey, C.M., Luque, E.H., Munoz De Toro, M., Sonnenschein, C., Soto, a M., 2001. In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biol. Reprod.* 65, 1215–23.

- Matějček, D., 2011. On-line two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of estrogens in sediments. *J. Chromatogr. A* 1218, 2292–300.
- Melo, S.M., Brito, N.M., 2013. Analysis and Occurrence of Endocrine Disruptors in Brazilian Water by HPLC-Fluorescence Detection. *Water, Air, Soil Pollut.* 225, 1783.
- Meng, X.Z., Wang, Y., Xiang, N., Chen, L., Liu, Z., Wu, B., Dai, X., Zhang, Y.H., Xie, Z., Ebinghaus, R., 2014. Flow of sewage sludge-borne phthalate esters (PAEs) from human release to human intake: Implication for risk assessment of sludge applied to soil. *Sci. Total Environ.* 476-477, 242–249.
- Mita, L., Bianco, M., Viggiano, E., Zollo, F., Bencivenga, U., Sica, V., Monaco, G., Portaccio, M., Diano, N., Colonna, a., Lepore, M., Canciglia, P., Mita, D.G., 2011. Bisphenol A content in fish caught in two different sites of the Tyrrhenian Sea (Italy). *Chemosphere* 82, 405–410.
- Montagner, C.C., Jardim, W.F., 2011. Spatial and Seasonal Variations of Pharmaceuticals and Endocrine Disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil) 22, 1452–1462.
- Montesdeoca-Esponda, S., Vega-Morales, T., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., 2013. Extraction and determination methodologies for benzotriazole UV stabilizers in personal-care products in environmental and biological samples. *TrAC Trends Anal. Chem.* 51, 23–32.
- Munshi, A.B., Karim, N., Shaukat, S., Hashmi, D., Boardman, G.D., Flick, G.J., 2013. Toxicity of Phthalate Esters in Fish and Shellfish from Virginia Beach Using Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) and GC-MS 35, 1463–1471.
- Navarro, P., Cortazar, E., Bartolomé, L., Deusto, M., Raposo, J.C., Zuloaga, O., Arana, G., Etxebarria, N., 2006. Comparison of solid phase extraction, saponification and gel permeation chromatography for the clean-up of microwave-assisted biological extracts in the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Chromatogr. A* 1128, 10–16.
- Nieto, A., Borrull, F., Pocurull, E., Marcé, R.M., 2008. Determination of natural and synthetic estrogens and their conjugates in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1213, 224–30.
- Norrgren, L., Blom, a., Andersson, P.L., Börjeson, H., Larsson, D.G.J., Olsson, P.-E., 1999. Effects of potential xenoestrogens (DEHP, nonylphenol and PCB) on sexual differentiation in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat. Ecosyst. Health Manag.* 2, 311–317.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K.O., Wollenberger, L., Santos, E.M., Paull, G.C., Van Look, K.J.W., Tyler, C.R., 2009. A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364, 2047–62.
- Oost, D., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Oost, R. van der, Opperhuizen, A., Satumalay, K., Heida, H., Vermeulenc, N.P.E., 1996. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) I. Bioaccumulation: biota-sediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs. *Aquat. Toxicol.* 35, 21–46.
- Ozaki, A., Yamaguchi, Y., Fujita, T., Kuroda, K., Endo, G., 2004. Chemical analysis and genotoxicological safety assessment of paper and paperboard used for food packaging. *Food Chem. Toxicol.* 42, 1323–1337.

- Ozkoc, H.B., Bakan, G., Ariman, S., 2007. Distribution and bioaccumulation of organochlorine pesticides along the Black Sea coast. *Environ. Geochem. Health* 29, 59–68.
- Parera, J., Santos, F.J., Galceran, M.T., 2004. Microwave-assisted extraction versus Soxhlet extraction for the analysis of short-chain chlorinated alkanes in sediments. *J. Chromatogr. A* 1046, 19–26.
- Pedersen, S.N., Lindholm, C., 1999. Quantification of the xenoestrogens 4-tert.-octylphenol and bisphenol A in water and in fish tissue based on microwave assisted extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 864, 17–24.
- Pérez, E., Blasco, J., Solé, M., 2004. Biomarker responses to pollution in two invertebrate species: *Scrobicularia plana* and *Nereis diversicolor* from the Cádiz bay (SW Spain). *Mar. Environ. Res.* 58, 275–279.
- Picó, Y., Barceló, D., 2012. Emerging contaminants in biota. *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 2525–2526.
- Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N., Marcomini, A., 2007. Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environ. Int.* 33, 929–36.
- Porte, C., Janer, G., Lorusso, L.C., Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M.P., Fossi, M.C., Canesi, L., 2006. Endocrine disruptors in marine organisms: approaches and perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 143, 303–15.
- Prokkola, J.M., Katsiadaki, I., Sebire, M., Elphinstone-Davis, J., Pausio, S., Nikinmaa, M., Leder, E.H., 2016. Microarray analysis of di-n-butyl phthalate and 17 α ethinyl-oestradiol responses in three-spined stickleback testes reveals novel candidate genes for endocrine disruption. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 124, 96–104.
- Puy-Azurmendi, E., Ortiz-Zarragoitia, M., Kuster, M., Martínez, E., Guillamón, M., Domínguez, C., Serrano, T., Barbero, M.C., Alda, M.L. De, Bayona, J.M., Barceló, D., Cajaraville, M.P., 2010. An integrated study of endocrine disruptors in sediments and reproduction-related parameters in bivalve molluscs from the Biosphere's Reserve of Urdaibai (Bay of Biscay). *Mar. Environ. Res.* 69 Suppl, S63–6. 03
- Puy-Azurmendi, E., Ortiz-Zarragoitia, M., Villagrasa, M., Kuster, M., Aragón, P., Aienza, J., Puchades, R., Maquieira, A., Domínguez, C., López de Alda, M., Fernandes, D., Porte, C., Bayona, J.M., Barceló, D., Cajaraville, M.P., 2013. Endocrine disruption in thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*) from the Urdaibai Biosphere Reserve (Bay of Biscay, Southwestern Europe). *Sci. Total Environ.* 443, 233–44.
- Quednow, K., Püttmann, W., 2008. Endocrine disruptors in freshwater streams of Hesse, Germany: changes in concentration levels in the time span from 2003 to 2005. *Environ. Pollut.* 152, 476–83.
- Ribani, M., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., Jardim, I. C. S. F., Melo, L. F. C., 2004. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova* 27, 771-780
- Ribeiro, C., Pardal, M.A., Martinho, F., Margalho, R., Tiritan, M.E., Rocha, E., Rocha, M.J., 2009. Distribution of endocrine disruptors in the Mondego River estuary, Portugal. *Environ. Monit. Assess.* 149, 183–93.
- Richardson, S.D., 2012. Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* 84, 747–78.

- Richardson, S.D., Ternes, T. a, 2014. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* 86, 2813–48.
- Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Corporation, D., Way, T., Box, P.O., 1996. Accelerated Solvent Extraction : A Technique for Sample Preparation 68, 1033–1039.
- Rippen, G., 1998. Umweltchemikalien, Ecobase Media Explorer (ECOMED). Verlagsgesellschaft, Landsb.
- Rodriquez-Mozaz, S., Alda, M. De, Barcelo, D., 2004. Picogram per liter level determination of estrogens in natural water and waterworks by a fully automated on-line solid-phase extraction–liquid. *Anal. Chem.* 76, 6998–7006.
- Salgueiro-González, N., Turnes-Carou, I., Besada, V., Muniategui-Lorenzo, S., 2015. Science of the Total Environment Occurrence , distribution and bioaccumulation of endocrine disrupting compounds in water , sediment and biota samples from a European river basin 529, 121–130.
- Salgueiro-González, N., Turnes-Carou, I., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D., 2014. Analysis of endocrine disruptor compounds in marine sediments by in cell clean up-pressurized liquid extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry determination. *Anal. Chim. Acta* 852, 112–120.
- Samaras, V.G., Thomaidis, N.S., Stasinakis, A.S., Lekkas, T.D., 2011. An analytical method for the simultaneous trace determination of acidic pharmaceuticals and phenolic endocrine disrupting chemicals in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 2549–61.
- Sánchez-Avila, J., Fernandez-Sanjuan, M., Vicente, J., Lacorte, S., 2011. Development of a multi-residue method for the determination of organic micropollutants in water, sediment and mussels using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218, 6799–6811.
- Sanchez-Prado, L., Garcia-Jares, C., Llompart, M., 2010. Microwave-assisted extraction: Application to the determination of emerging pollutants in solid samples. *J. Chromatogr. A* 1217, 2390–414.
- Santos, H.M., Capelo, J.L., 2007. Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. *Talanta* 73, 795–802.
- Schlenk, D., Sapozhnikova, Y., Irwin, M.A., Xie, L., Hwang, W., Reddy, S., Brownawell, B.J., Armstrong, J., Kelly, M., Montagne, D.E., Kolodziej, E.P., Sedlak, D., Snyder, S., 2005. In vivo bioassay-guided fractionation of marine sediment extracts from the Southern California Bight, USA, for estrogenic activity. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2820–6.
- Schmitz-Afonso, I., Loyo-Rosales, J.E., De La Paz Avilés, M., Rattner, B. a., Rice, C.P., 2003. Determination of alkylphenol and alkylphenolethoxylates in biota by liquid chromatography with detection by tandem mass spectrometry and fluorescence spectroscopy. *J. Chromatogr. A* 1010, 25–35.
- Segner, H., Caroll, K., Fenske, M., Janssen, C.R., Maack, G., Pascoe, D., Schäfers, C., Vandenbergh, G.F., Watts, M., Wenzel, a., 2003. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: Report from the European IDEA project. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 302–314.
- Selvaraj, K.K., Shanmugam, G., Sampath, S., Larsson, D.G.J., Ramaswamy, B.R., 2014. GC-

- MS determination of bisphenol A and alkylphenol ethoxylates in river water from India and their ecotoxicological risk assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 99, 13–20.
- Senthil Kumar, K., Sajwan, K.S., Richardson, J.P., Kannan, K., 2008. Contamination profiles of heavy metals, organochlorine pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and alkylphenols in sediment and oyster collected from marsh/estuarine Savannah GA, USA. *Mar. Pollut. Bull.* 56, 136–49.
- SETAC - Society of Environmental Toxicology and Chemistry. Endocrine disruptors and modulators. Technical Issue Paper, 2000. . PENSACOLA.
- Shimada, K., Mitamura, K., Higashi, T., 2001. Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids. *J. Chromatogr. A* 935, 141–72.
- Silva, F.V. da, Rodrigues, J.L., Batista, B.L., Oliveira, D.P. De, 2007. Alquilfenóis e alquilfenóis etoxilados : uma visão ambiental. *Rev. Bras. Toxicol. BRAZILIAN J. Toxicol.* 2, 1–12.
- Sioen, I., Fierens, T., Van Holderbeke, M., Geerts, L., Bellemans, M., De Maeyer, M., Servaes, K., Vanermen, G., Boon, P.E., De Henauw, S., 2012. Phthalates dietary exposure and food sources for Belgian preschool children and adults. *Environ. Int.* 48, 102–108.
- Smith, E., Coffey, M., 2001. The determination of alkylphenols in aqueous samples from the Forth Estuary by SPE-HPLC-fluorescence. *R. Soc. Chem.*
- Soto, a M., Justicia, H., Wray, J.W., Sonnenschein, C., 1991. p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from “modified” polystyrene. *Environ. Health Perspect.* 92, 167–73.
- Staniszewska, M., Falkowska, L., Grabowski, P., Kwaśniak, J., Mudrak-Cegiołka, S., Reindl, A.R., Sokołowski, A., Szumiło, E., Zgrundo, A., 2014. Bisphenol A, 4-tert-Octylphenol, and 4-Nonylphenol in The Gulf of Gdańsk (Southern Baltic). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 67, 335–347.
- Staples, C.A., Dom, P.B., Klecka, G.M., Sandra, T.O., Harris, L.R., 1998. A review of the environmental fate, effects, and exposures of Bisphenol A. *Chemosphere* 36, 2149–2173.
- Stuart, J.D., Capulong, C.P., Launer, K.D., Pan, X., 2005. Analyses of phenolic endocrine disrupting chemicals in marine samples by both gas and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1079, 136–145.
- Sumpter, J.P., 1998. Xenoendocrine disruptors--environmental impacts. *Toxicol. Lett.* 102-103, 337–42.
- Swan, S.H., Elkin, E.P., Fenster, L., 2000. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environ. Health Perspect.* 108, 961–6.
- Tadeo, J.L., Sánchez-Brunete, C., Albero, B., García-Valcárcel, A.I., Pérez, R. a., 2012. Analysis of emerging organic contaminants in environmental solid samples. *Cent. Eur. J. Chem.* 10, 480–520.
- Tan, B.L.L., Hawker, D.W., Müller, J.F., Leusch, F.D.L., Tremblay, L., Chapman, H.F., 2007a. Comprehensive study of endocrine disrupting compounds using grab and passive sampling at selected wastewater treatment plants in South East Queensland, Australia. *Environ. Int.* 33, 654–69.
- Tan, B.L.L., Hawker, D.W., Müller, J.F., Leusch, F.D.L., Tremblay, L. a, Chapman, H.F., 2007b. Modelling of the fate of selected endocrine disruptors in a municipal wastewater treatment plant in South East Queensland, Australia. *Chemosphere* 69, 644–54.

- Tan, B.L.L., Hawker, D.W., Müller, J.F., Leusch, F.D.L., Tremblay, L. a, Chapman, H.F., 2007c. Comprehensive study of endocrine disrupting compounds using grab and passive sampling at selected wastewater treatment plants in South East Queensland, Australia. *Environ. Int.* 33, 654–69.
- Tavazzi, S., Benfenati, E., Barceló, D., 2002. Accelerated solvent extraction then liquid chromatography coupled with mass spectrometry for determination of 4-t-octylphenol, 4-nonylphenols, and bisphenol A in fish liver. *Chromatographia* 56, 463–467.
- Teil, M.J., Tlili, K., Blanchard, M., Chevreuil, M., Alliot, F., Labadie, P., 2012. Occurrence of polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, and phthalates in freshwater fish from the orge river (Ile-de France). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 101–113.
- Teo, C.C., Chong, W.P.K., Ho, Y.S., 2013. Development and application of microwave-assisted extraction technique in biological sample preparation for small molecule analysis. *Metabolomics* 9, 1109–1128.
- Tijani, J.O., Fatoba, O.O., Petrik, L.F., 2013. A review of pharmaceuticals and endocrine-disrupting compounds: Sources, effects, removal, and detections. *Water. Air. Soil Pollut.* 224.
- Tillmann, M., Schulte-Oehlmann, U., Duft, M., Markert, B., Oehlmann, J., 2001. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part III: Cyproterone acetate and vinclozolin as antiandrogens. *Ecotoxicology* 10, 373–388.
- Toft, G., Jönsson, B. a G., Lindh, C.H., Jensen, T.K., Hjollund, N.H., Vested, A., Bonde, J.P., 2012. Association between pregnancy loss and urinary phthalate levels around the time of conception. *Environ. Health Perspect.* 120, 458–463.
- Toze, S., 2006. Reuse of effluent water—benefits and risks. *Agric. Water Manag.* 80, 147–159.
- Travison, T.G., Araujo, A.B., O'Donnell, A.B., Kupelian, V., McKinlay, J.B., 2007. A population-level decline in serum testosterone levels in American men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 196–202.
- Troiano, R., Goodman, W., 2009. UHPLC separation and detection of Bisphenol A (BPA) in plastics. *Appl. Note Liq. Chromatogr.* Perkin Elm.
- Tyler, C.R., Routledge, E.J., 1998. Oestrogenic ejects in øsh in English rivers with evidence of their causation. *Pure Appl. Chem.* 70, 1795–1804.
- USEPA, 2004. Risk Assessment Guidance for Superfund Volume I: Human Health Evaluation Manual (Part E, Supplemental Guidance for Dermal Risk Assessment) Final. . Washington DC.EPA/540.
- USEPA, 2011. Exposure Factors Handbook: (Final). Washington.
- USEPA, 1989. Risk Assessment Guidance for Superfund Volume I Human Health Evaluation Manual (Part A) Interim Final Risk Assessment Guidance for Superfund Human Health Evaluation Manual (Part A) Interim Final I.
- Valton, S., Serre-Dargnat, C., Blanchard, M., Alliot, F., Chevreuil, M., Teil, M.J., 2014. Determination of phthalates and their by-products in tissues of roach (*Rutilus rutilus*) from the Orge river (France). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 12723–12730.
- Vekey, K., 2001. Mass spectrometry and mass-selective detection in. *J. Chromatogr. A*, 921, 227–236.

- Villar-Navarro, M., Ramos-Payán, M., Fernández-Torres, R., Callejón-Mochón, M., Bello-López, M.Á., 2013. A novel application of three phase hollow fiber based liquid phase microextraction (HF-LPME) for the HPLC determination of two endocrine disrupting compounds (EDCs), n-octylphenol and n-nonylphenol, in environmental waters. *Sci. Total Environ.* 443, 1–6.
- Vitali, M., Ensabella, F., Stella, D., Guidotti, M., 2004. Nonylphenols in freshwaters of the hydrologic system of an Italian district: association with human activities and evaluation of human exposure. *Chemosphere* 57, 1637–47.
- Voutsas, E., Magoulas, K., Tassios, D., 2002. Prediction of the bioaccumulation of persistent organic pollutants in aquatic food webs. *Chemosphere* 48, 645–651.
- Wang, J., Pan, H., Liu, Z., Ge, F., 2009. Ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of alkylphenols in soil. *J. Chromatogr. A* 1216, 2499–503.
- Wang, J., Shim, W.-J., Yim, U.-H., Kannan, N., Li, D., 2010. Nonylphenol in bivalves and sediments in the northeast coast of China. *J. Environ. Sci. (China)* 22, 1735–40.
- Wang, W., Meng, B., Lu, X., Liu, Y., Tao, S., 2007. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: a comparison between Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques. *Anal. Chim. Acta* 602, 211–22.
- Whyatt, R.M., Liu, X., Rauh, V.A., Calafat, A.M., Just, A.C., Hoepner, L., Diaz, D., Quinn, J., Abidi, J., Perera, F.P., Factor-Litvak, P., 2012. Maternal Prenatal Urinary Phthalate Metabolite Concentrations and Child Mental, Psychomotor, and Behavioral Development at 3 Years of Age. *Environ. Health Perspect.* 120, 290 – 295.
- Wu, J., Zhang, L., Yang, Z., 2010. A Review on the Analysis of Emerging Contaminants in Aquatic Environment. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 40, 234–245.
- Xia, X., Li, H., Yang, Z., Zhang, X., Wang, H., 2015. How does predation affect the bioaccumulation of hydrophobic organic compounds in aquatic organisms? *Environ. Sci. Technol.* 49, 4911–4920.
- Xie, Z., Lakaschus, S., Ebinghaus, R., Caba, A., Ruck, W., 2006. Atmospheric concentrations and air-sea exchanges of nonylphenol, tertiary octylphenol and nonylphenol monoethoxylate in the North Sea. *Environ. Pollut.* 142, 170–80.
- Xu, J., Wang, P., Guo, W., Dong, J., Wang, L., Dai, S., 2006. Seasonal and spatial distribution of nonylphenol in Lanzhou Reach of Yellow River in China. *Chemosphere* 65, 1445–51.
- Yan, H., Wang, H., 2013. Recent development and applications of dispersive liquid-liquid microextraction. *J. Chromatogr. A* 1295, 1–15.
- Yang, O., Kim, H.L., Weon, J.-I., Seo, Y.R., 2015. Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis. *J. cancer Prev.* 20, 12–24.
- Ye, A., Yang, Y., Zhang, J., Liu, M., Hou, L., Zhou, J.L., 2013a. Simultaneous determination of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in fish by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1278, 126–32.
- Ye, A., Yang, Y., Zhang, J., Liu, M., Hou, L., Zhou, J.L., 2013b. Simultaneous determination of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in fish by ultra-high-

- performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1278, 126–32.
- Yi, B., Kim, C., Yang, M., 2010. Biological monitoring of bisphenol A with HPLC/FLD and LC/MS/MS assays. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 878, 2606–2610.
- Yin, G.-G., Kookana, R.S., Ru, Y.-J., 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ. Int.* 28, 545–51.
- Ying, G.-G., Williams, B., Kookana, R., 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates--a review. *Environ. Int.* 28, 215–26.
- Yu, Y., Huang, Q., Cui, J., Zhang, K., Tang, C., Peng, X., 2011. Determination of pharmaceuticals, steroid hormones, and endocrine-disrupting personal care products in sewage sludge by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 891–902.
- Zedda, M., Zwiener, C., 2012. Is nontarget screening of emerging contaminants by LC-HRMS successful? A plea for compound libraries and computer tools. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 2493–502.
- Zhang, S., You, J., Sun, Z., Song, C., Ning, S., Zhao, C., Suo, Y., 2012. A sensitive method for extraction and determination of endocrine-disrupting compounds from wastewater using 10-ethyl-acridone-2-sulfonyl chloride as pre-column labeling reagent by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Microchem. J.* 103, 90–96.
- Zhang, X., Gao, Y., Li, Q., Li, G., Guo, Q., Yan, C., 2011. Estrogenic compounds and estrogenicity in surface water, sediments, and organisms from Yundang Lagoon in Xiamen, China. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 61, 93–100. doi:10.1007/s00244-010-9588-0
- Zhang, X., Li, Q., Li, G., Wang, Z., Yan, C., 2009. Levels of estrogenic compounds in Xiamen Bay sediment, China. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1210–6.
- Zhang, Z., Ren, N., Kannan, K., Nan, J., Liu, L., Ma, W., Qi, H., Li, Y., 2014. Occurrence of endocrine-disrupting phenols and estrogens in water and sediment of the songhua river, northeastern china. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 66, 361–9.
- Zheng, X., Zhang, B.T., Teng, Y., 2014. Distribution of phthalate acid esters in lakes of beijing and its relationship with anthropogenic activities. *Sci. Total Environ.* 476-477, 107–113.
- Zhou, R., Zhu, L., Kong, Q., 2007. Persistent chlorinated pesticides in fish species from Qiantang River in East China. *Chemosphere* 68, 838–847.
- Zuloaga, O., Navarro, P., Bizkarguenaga, E., Iparraguirre, A., Vallejo, A., Olivares, M., Prieto, A., 2012. Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: a review. *Anal. Chim. Acta* 736, 7–29.
- Zuo, Y., Zhang, K., Deng, Y., 2006. Occurrence and photochemical degradation of 17alpha-ethinylestradiol in Acushnet River Estuary. *Chemosphere* 63, 1583–90.
- Zuo, Y., Zhang, K., Lin, Y., 2007. Microwave-accelerated derivatization for the simultaneous gas chromatographic-mass spectrometric analysis of natural and synthetic estrogenic steroids. *J. Chromatogr. A* 1148, 211–8.