



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
LABORATÓRIO DE QUÍMICA ANALÍTICA E AMBIENTAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fabíula Sousa Amorim

Orientador: Prof. Dr. Jurandir Rodrigues de Souza

Brasília-DF

2013

Fabíula Sousa Amorim

**DETERMINAÇÃO DE 17 α METILTESTOSTERONA EM AMOSTRAS
DE SEDIMENTOS DE TANQUES DE PISCICULTURA DE PEIXES
TILÁPIA DO NILO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade de Brasília, na Área de concentração de Química Analítica como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Jurandir Rodrigues de Souza

Brasília-DF

2013



COMUNICADO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Fabíula de Sousa Amorim**, matrícula nº **11/0092121**, intitulada **“Determinação de 17 α Metiltestosterona em Amostras de Sedimentos de Tanques de Piscicultura de Peixes Tilápia do Nilo”**, apresentada no Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 20 de dezembro de 2013.

Prof^o Dr. Jurandir Rodrigues de Souza
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof^o Dr. José Garrofe Dórea
Membro Titular (FS / UnB)

Prof^o Dr. Alexandre Fonseca
Membro Titular (IQ/UnB)

Prof^a Dr^a Ana Cristi Basile Dias
Membro Titular (IQ/UnB)

Em 20 de dezembro de 2013.

Dedico esta dissertação **aos meus pais**, que sempre souberam me apoiaram e me deram suporte para realizar esse trabalho.

Agradecimentos

À Deus pela oportunidade de fazer este mestrado e por toda a força que permitiu que eu chegasse até o fim desta etapa da minha vida.

Ao meu orientador Jurandir Rodrigues de Souza, pela oportunidade de todo aprendizado que conquistei nesses anos de trabalho, pela sua orientação e sua paciência com meus momentos difíceis.

À minha família, meu pai que me deu todo o suporte, a minha querida mãe que me ensinou tudo que sou e minhas irmãs, Larissa e Juliana por terem auxiliado nas correrias do mestrado. E que hoje está de longe olhando por mais essa conquista que também. Agradecimento especial à minha mãe e à minha irmã Juliana, apesar de não poderem hoje comemorar esse momento comigo, sei que estão de longe olhando e felizes por essa conquista.

Às minhas queridas amigas Joelma e Ângela por terem me ajudado durante todas as fases do meu mestrado e da minha vida também.

Ao Ray por ter me ajudado tanto nas etapas de coleta, preparo e análises sem ele esse trabalho não seria o mesmo.

Ao meu namorado, por ter me dado forças e me incentivado nos momentos de cansaço e fraqueza.

A todos os amigos do LQAA em especial ao Naamã, Gustavo, Rosaninha e ao Frederico que mesmo longe não deixa de contribuir enormemente e que sempre fará parte do LQAA. E aos que não são do LQAA, mas não menos importantes, Marcos, Haline, Gabi, Rosângela e todos aqueles que contribuíram e eu não citei aqui.

Ao REUNI e CAPES pelo apoio financeiro prestado.

Ao Centro de Piscicultura da Granja do Ipê por proporcionar acesso às amostras coletadas utilizadas neste trabalho, bem como a todos os integrantes do projeto do MAPA ao qual fazia parte essa pequena o contexto desse trabalho.

Resumo

O hormônio 17 α metiltestosterona (MT) é usado em tanques de piscicultura para masculinização de peixes Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). A problemática da utilização deste hormônio pode estar associada a uma possível deposição da MT em água e amostras de sedimento e pode causar desequilíbrio na biota devido à alterações hormonais. Este trabalho adaptou uma metodologia para determinação da 17 α metiltestosterona em sedimentos dos tanques de piscicultura do Centro de Tecnologia em Piscicultura da Granja do Ipê-Brasília. Foram realizadas duas coletas para estudo dos tanques, uma no início de seca e outra no início de chuva. Foi observado que os sedimentos do tanque em geral possuem uma característica arenosa, mas também uma característica argilosa, sendo que essa segunda característica é mais suscetível à deposição de compostos orgânicos nas paredes dos sedimentos. As análises de pH revelaram que os sedimentos dos tanques estavam ácidos e os resultados de Capacidade de Troca Catiônica-CTC mostraram uma alta capacidade de troca catiônica. Um método baseado em cromatografia líquida com detecção UV/VIS foi adaptado e validado para determinação do hormônio nos sedimentos. Os resultados de validação mostraram que o método é linear, sensível, seletivo, preciso, exato e com limites de detecção e quantificação de 0,125 $\mu\text{g/mL}$ e 0,184 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, adequados para a análise do hormônio. Os resultados das amostras reais demonstraram que há deposição de MT nos sedimentos dos tanques de piscicultura onde ocorrem a reprodução e masculinização dos peixes sendo a concentração média encontrada de 0,126 $\mu\text{g/mg}$ de MT nos sedimentos.

Palavras-chave: hormônio, 17 α -metiltestosterona, tilápia do Nilo, sedimentos

Abstract

The hormone 17 α metiltestosterona (MT) is used in fish tanks for fish masculinization of Nile Tilapia (*Oreochromis Oreochomis*). The problem of using this hormone may be associated with a possible deposition of TM in water and sediment samples and may cause imbalance in the biota due to hormonal changes. This study adapted a methodology for determining the 17 α metiltestosterona in sediments of fishponds of the Center for Technology in Fish Breeding Farm of the Ipe-Brasilia. Two collections for the study of the tanks, one on top of drought and other early rain were performed. It was observed that the sludge tank typically has a sandy characteristic feature but also a clay, and that this second feature is more susceptible to the deposition of organic compounds on the walls of the sediments. The pH analyzes revealed that the sediments of the tanks were acids and the results of Cation Exchange Capacity - CTC showed a high cation exchange capacity. A method based on liquid chromatography with UV / VIS detection method was adapted and validated for determination of hormone sediments. The validation results showed that the method is linear, sensitive, selective, precise, accurate and with limits of detection and quantification of 0.125 $\mu\text{g/mL}$ and 0.184 $\mu\text{g/mL}$ respectively, suitable for the analysis of the hormone . The results of real samples showed that there is deposition of MT in the sediments of fishponds where there playing and masculinization of fish with an average concentration found of 0.126 mg / mg of MT in the sediments.

Keywords: hormone, 17 α -methyltestosterone, Nile tilapia, sediment

Sumário

Folha de rosto	ii
Folha de aprovação	iii
Dedicatória	iv
Agradecimentos	v
Resumo	vi
Abstract	vii
Sumário	viii
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xiii
Lista de abreviaturas e acrônimos	xv
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	
1.1 – Introdução	01
1.2 – Objetivos.....	03
1.2.1- <i>Objetivos Específicos</i>	03
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1 – Contaminação ambiental de sedimentos.....	04
2.2 – Fontes de contaminação por hormônios estrogênicos.....	05
2.3 – Piscicultura.....	08
2.4 – O hormônio 17 α metiltestosterona.....	09
2.5 – Técnicas de coleta e análises de sedimentos de piscicultura.....	11
2.5.1- <i>Análises físicas e físico-químicas</i>	12
2.5.2- <i>Análises granulométricas</i>	13
2.6 – Técnicas de análise de hormônios em sedimentos.....	13
2.7 – Ferramentas para validação de métodos analíticos.....	15
2.7.1- <i>Seletividade</i>	16
2.7.2- <i>Linearidade e sensibilidade</i>	17
2.7.3- <i>Tendência/Recuperação</i>	18
2.7.4- <i>Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)</i>	19
2.7.5- <i>Precisão</i>	21
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS	

3.1- Lavagem de Vidraria.....	23
3.2- Amostragem.....	23
3.2.1- <i>Manipulação do hormônio</i>	26
3.3- Preparo de Amostra – secagem e armazenagem.....	26
3.4- Análises físicas, físico-químicas, químicas.....	27
3.4.1- <i>pH</i>	27
3.4.2- <i>Capacidade de Troca Catiônica – CTC</i>	27
3.4.3- <i>Análise Granulométrica</i>	28
3.5- Escolha da metodologia de extração.....	29
3.5.1- <i>Extração</i>	32
3.5.2- <i>Concentração do Extrato</i>	33
3.5.3- <i>Detecção e Quantificação Analítica</i>	34
3.6 - Identificação espectroscópica da 17 α metiltestosterona.....	35
3.7 – Estabilidade do hormônio.....	35
3.8 – Validação da Metodologia.....	35
3.8.1- <i>Seletividade</i>	36
3.8.2- <i>Linearidade</i>	36
3.8.3- <i>Tendência/Recuperação</i>	36
3.8.4- <i>Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)</i>	36
3.8.5- <i>Precisão</i>	37
3.9 – Análises das amostras de sedimentos do CTP.....	37
3.9 – Tratamento estatísticos dos dados.....	39
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1- Análises físico-químicas, químicas e granulométricas.....	41
4.1.1- <i>pH</i>	41
4.1.2- <i>Capacidade de Troca Catiônica – CTC</i>	43
4.1.3- <i>Análise Granulométrica</i>	44
4.2- Otimização e adaptação do método.....	45
4.3- Identificação espectroscópica da 17 α metiltestosterona.....	51
4.4- Estabilidade de padrão analítico da 17 α metiltestosterona e do analito disponível nas amostras.....	54
4.5 – Validação da Metodologia.....	56
4.5.1- <i>Seletividade</i>	57

4.5.2- Linearidade e sensibilidade.....	58
4.5.3-Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	59
4.5.4- Tendência/Recuperação.....	59
4.5.5- Precisão.....	60
4.6- Análises das amostras de sedimentos do CTP.....	61
CONCLUSÕES.....	66
PERSPECTIVAS.....	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

Lista de Figuras

Figura 1. Possíveis rotas dos contaminantes desreguladores endócrinos no meio ambiente com ênfase nos sedimentos. Adaptado Bila e Dezotti (2003) ¹¹	06
Figura 2: Peixe Tilápia do Nilo (<i>Oreochomis niloticus</i>).....	08
Figura 3: Fórmula estrutural do hormônio 17 α -metiltestosterona utilizado em piscicultura para masculinização de peixes tilápia do Nilo.....	10
Figura 4: Metodologias de extração e <i>Clean-up</i> utilizadas para analisar hormônios em sedimentos ^{32,33}	15
Figura 5: Imagem de satélite dos pontos de coleta realizados na CTB – Granja do Ipê em Brasília. TB indica o tanque branco, TA tanque aberto e TF tanque fechado.....	23
Figura 6: Tanque de criação de peixe Tilápia do Nilo, pontos P1TA, P2TA e P3TA referentes ao tanque aberto.....	23
Figura 7: Draga de Birge-Ekman.....	24
Figura 8: Coleta de amostras de sedimento utilizando a draga Birge-Ekman. Fotografia de arquivo da autora.....	24
Figura 9: Procedimento de extração descrito por Petrovic <i>et al</i> (2001) com adaptações.....	29
Figura 10: Procedimento de extração descrito por Falone (a) e Petrovic (b), com adaptações.....	30
Figura 11: Etapas do processo de extração das amostras de sedimentos, etapa de sonificação.....	31
Figura 12: Extrato antes e após o processo de centrifugação.....	32
Figura 13: Filtração em filtros de seringa e armazenagem para rotaevaporação.....	32
Figura 14: Cromatógrafo líquido com detecção UV/VIS- Varian 920-CL.....	33
Figura 15: Principais etapas do método utilizado para a determinação de 17 α -metiltestosterona em sedimentos.....	37
Figura 16: Cromatograma do padrão (na concentração de 1,25 ug/mL) analítico utilizado para construção da curva analítica (a) e cromatograma do extrato (b), ambos evidenciam o pico da MT no tempo de retenção em 8,92 minutos, realizado em coluna C18 de 10 cm	45

Figura 17: Espectro de UV/VIS obtido experimentalmente da 17 α metiltestosterona com concentração na faixa de. 0,1 μ g/mL, 0,2 μ g/mL, 0,3 μ g/mL, 0,4 μ g/mL e 0,5 μ g/mL.....	46
Figura 18: Cromatograma do padrão analítico do hormônio 17 α metiltestosterona em coluna C18 de 10 cm na faixa de 1,25 μ g/mL.....	47
Figura 19: Cromatograma de extratos das análises realizadas conforme os métodos 1 (a) e método 2 (b).....	49
Figura 20: Percentagens de recuperação para as metodologias testadas para extração da MT em sedimento.....	50
Figura 21: Espectro de Infravermelho obtido experimentalmente da 17 α metiltestosterona realizado com o padrão sólido.....	51
Figura 22: Espectro de RMN de Carbono obtido experimentalmente da 17 α metiltestosterona.....	52
Figura 23: Espectro de RMN de Hidrogênio obtido experimentalmente da 17 α metiltestosterona.....	52
Figura 24: Metabólitos do hormônio 17 α metiltestosterona (Adaptado Yamada <i>et al</i> , (2007).....	52
Figura 25: Cromatogramas do padrão da MT (a) uma semana após o preparo, acondicionado em freezer e (b) preparado no mesmo dia de análise.....	55
Figura 26: Cromatograma (a) do extrato do ponto controle coletado, sem a presença de MT (ponto controle). Cromatograma (b) extrato do ponto controle fortificado com MT.....	56
Figura 27: Curva analítica para expressar a linearidade do método.....	58
Figura 28: Cromatograma da amostra P3TA obtido no LC Varian 920 UV/VIS.....	61
Figura 29: Concentração de MT nos sedimentos coletados nos três tanques de piscicultura do CTP (Coleta 1).....	62
Figura 30: Concentração de MT nos sedimentos coletados nos tanques de piscicultura do CTP (Coleta 2).....	62
Figura 31: Cromatograma de sedimento dos tanques que nunca haviam sido manipulados MT, obtido no LC Varian 920 UV/VIS.....	63

Lista De Tabelas

Tabela 1 – Tabela 1 – Metodologias de cálculo de Limites de Detecção (Adaptado, INMETRO, 2011) ⁴⁸	20
Tabela 2 – Metodologias de cálculo de Limites de Quantificação (Adaptado, INMETRO, 2011) ⁴⁸	20
Tabela 3 – Parâmetros cromatográficos utilizado nos testes iniciais do LC-UV/VIS para a determinação de 17 α metiltestosterona em amostras de sedimentos.....	29
Tabela 4 – Parâmetros cromatográficos do LC-UV/VIS para a determinação de 17 α metiltestosterona em amostras de sedimentos, utilizados na validação e determinação da MT nas amostras de sedimento.....	34
Tabela 5 – Resultados obtidos para valores de pH nas seis amostras durante a coleta 1 e coleta 2.....	41
Tabela 6 – Tratamento estatístico para valores obtidos no parâmetro pH, testes de homogeneidade (teste F) e de amostras interdependentes (teste t).....	41
Tabela 7 – Resultados obtidos para valores de Capacidade de Troca Catiônica CTC nas seis amostras durante a coleta 1 e coleta 2.....	42
Tabela 8 – Teores de areia, silte e argila em percentagem, encontrados nos sedimentos dos tanques, resultados obtidos com as análises granulométricas.....	43
Tabela 9 – Classificação granulométrica dos sedimentos de acordo com o tamanho dos poros.....	44
Tabela 10 – Valores médios de concentração recuperada nos teste de extração, que foram realizadas as comparações entre as metodologia 1 e 2.....	48
Tabela 11 – Taxa de crescimento do segundo pico durante o período de uma semana.....	54
Tabela 12 – Dados para o teste de seletividade (teste F, n=6). Adição de padrão na matriz de sedimento e sem matriz. Tabela com os resultados dos valores calculados para o nível de concentração 0,750 μ g/mL. Considerando $F_{\text{tabelado}} = 4,28$ e $t_{\text{tabelado}} = 1,943$	57
Tabela 13 – Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos para a metodologia de extração e quantificação do hormônio 17 α metiltestosterona.....	58

Tabela 14 – Percentagem de recuperação obtida para extração dos sedimentos controles fortificados com padrão para recuperação nos três níveis de concentração, 0,25µg/mL 0,75µg/mL e 1,25µg/mL.....59

Tabela 15 – Precisão estimada em valores de Desvio Padrão e Variância.....59

Lista de Abreviaturas e Acrônimos

- ANOVA** – Análise de Variância
- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- C18** – Octadecilsilano
- CLAE** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CG** – Cromatografia Gasosa
- CTC** – Capacidade de Troca Catiônica
- CV** – Coeficiente de Variação
- CTP** – Centro de Tecnologia e Piscicultura
- CONAMA** – Conselho Nacional do Meio Ambiente
- EAA** – Esteroide anabólico-androgênico
- ETEs** – Estação de Tratamento de Esgoto
- EM** – Espectrômetro de Massas
- EMBRAPA** – Empresa Brasileira de Pesquisa Agrícola
- FT/IR** – Infravermelho com Transformada de Fourier
- INMETRO** – Instituto Nacional de Metrologia
- MT** – 17 α metiltestosterona
- LD** – Limite de Detecção
- LQ** – Limite de Quantificação
- LQAA** – Laboratório de Química Analítica e Ambiental
- MRV** – Materiais de Referência Certificados
- MO** – Matéria Orgânica
- pH** – Potencial Hidrogeniônico
- RMN** – Ressonância Magnética Nuclear
- USEPA** – Agência Internacional de Proteção Ambiental
- UV/VIS** – Detector Ultravioleta/Visível

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 – Introdução

Nos últimos anos, a preocupação com as alterações ambientais está em grande destaque em todo o meio científico. Elas estão cada vez mais frequentes e, na maioria das vezes, atreladas ao grande crescimento populacional e o suprimento de suas necessidades através dos diferentes segmentos industriais¹. A agricultura, pecuária, indústria e os centros urbanos têm adotado modelos de desenvolvimento dessas áreas, de forma que estes setores não tem se preocupado com sua atuação no meio ambiente². Conectado a este contexto, a utilização de compostos orgânicos sintéticos e naturais trouxe não só o benefício de sua utilização, mas também um problema ambiental devido principalmente ao descarte e ou destino final no meio ambiente. Assim, fatores como deposição residual de contaminantes fazem com que diversas matrizes de interesse ambiental sejam utilizadas como indicadores de poluição do meio ambiente².

Um exemplo de utilização de compostos sintéticos para fins de melhores resultados na produção é a utilização da 17 α metilttestosterona em tanques de piscicultura. A 17 α metilttestosterona (MT), é utilizada para a masculinização de peixes da linhagem Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), onde tilápias geneticamente fêmeas são revertidas sexualmente para machos fenotipicamente³. A utilização do hormônio 17 α metilttestosterona em piscicultura, na criação de tilápias é desejada porque os machos de sua espécie crescem mais rapidamente e em maior proporção do que as suas fêmeas, o que economicamente é mais viável para a produção e comercialização de filé⁴. Também é relatado, que a utilização do hormônio para a reversão se dá para um controle da superpopulação causada pela quantidade excessiva de fêmeas durante a reprodução⁵.

Com a utilização do hormônio em tanques de piscicultura, pode haver um acúmulo deste ou de seus metabólitos nos sedimentos e na água destes tanques e por consequência, estes compostos podem entrar em contato com o meio ambiente, como rios e lagoas podendo atingir populações aquáticas e o próprio ser humano com o consumo da água. Com isso, é de grande relevância estudar a acumulação

do hormônio em sedimentos de tanques de piscicultura, para se prever os níveis de contaminação, que possam vir causar desequilíbrio ecológico ou mesmo doenças.

Atualmente, o estudo dos sedimentos aquáticos vem fornecendo resultados muito importantes sobre diferentes ecossistemas, uma vez que eles podem refletir a identidade desses sistemas, e também podem ser usados para detectar a presença de contaminantes que não permanecem solúveis após seu lançamento em águas superficiais⁶.

A importância ambiental dos sedimentos não está associada apenas ao armazenamento ou acumulação de nutrientes e contaminantes, como também ao reprocessamento de tais materiais e de troca de espécies químicas com a coluna d'água e biota aquática⁶. Após o lançamento de substâncias no meio aquático, algumas delas podem ser adsorvidas ou se ligar em partículas orgânicas em suspensão⁸. O tipo de interação que ocorrerá, irá depender da morfologia do rio ou lago e das condições hidrológicas deste⁷. Com isso, essas partículas em suspensão podem se depositar ao longo do curso com esses contaminantes tornando-se parte do sedimento de fundo⁷.

A análise de substâncias tóxicas persistentes, interferentes endócrinos e produtos de origem farmacêutica, em amostras de sedimentos tornam-se portanto uma alternativa para estimar os níveis de contaminação ambiental. Sua acumulação e biodisponibilidade devem ser estudadas a fim de se verificar quais efeitos que estes podem causar ao meio ambiente. Para tanto, faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas que sejam capazes de determinar e quantificar contaminantes em baixos níveis de concentração⁶. Com isso, esse trabalho abordará sobre a determinação do hormônio 17 α metiltestosterona (MT) em tanque de piscicultura utilizando técnicas de extração ultrassônica com solventes orgânicos e a técnica analítica de separação por cromatografia líquida associada com detecção por UV/VIS.

1.2 – Objetivos

O objetivo desse trabalho foi quantificar o hormônio 17 α metiltestosterona em sedimento de tanques de piscicultura onde são criados peixes da linhagem Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Para quantificação do hormônio foi otimizado um método de extração, e uma metodologia para quantificação em cromatógrafo líquido com detecção UV/VIS. O método foi estatisticamente validado para realização das análises.

1.2.1- *Objetivos Específicos*

- Otimizar um método analítico baseado em cromatografia líquida com detecção de UV/VIS, com relação aos parâmetros de fluxo, comprimento de onda, melhor fase móvel e melhor coluna;
- Selecionar uma metodologia de extração;
- Validar a metodologia de extração;
- Analisar as amostras coletadas na Granja do Ipê para quantificação da 17 α metiltestosterona.

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Contaminação ambiental de sedimentos

A crescente demanda e oferta de novos produtos pela sociedade levaram ao grande consumo e por consequência produção de produtos químicos. A utilização desses compostos está associada a diversas áreas a indústria farmacêutica que cresce a cada ano em produção e pesquisas de novos medicamentos e a petroquímica que oferta várias opção de matéria prima para diversos produtos^{8,9}. O consumo de produtos químicos pelo homem gera, por consequência, sua liberação no meio ambiente. Os compostos orgânicos, por serem utilizados em uma grande faixa de aplicação, compreendem uma grande fonte de contaminação em amostras ambientais^{8,9,10}.

Dentre as substâncias que são liberadas no meio ambiente, muitas podem ser prejudiciais o ser humano, mesmo em pequenas concentrações. Fármacos, em especial os de origem estrogênica, possuem o potencial adverso de causar desequilíbrio no processo de reprodução de organismos aquáticos, caso esteja disponível mesmo em pequenas faixas de concentração^{11,12}. Esses compostos orgânicos além de poderem causar um desequilíbrio aquático, podem causar efeitos adversos à saúde humana, como câncer, alergias ou problemas relacionados aos sistema hormonal, quando presentes em águas próprias para o consumo¹².

A entrada desses compostos nos corpos d'água ocorre por vários processos de transporte, geralmente de fontes antropogênicas, como provenientes de descarga de efluentes industriais e domésticos e arraste por água da chuva¹³. Outra fonte antropogênica, porém pouco estudada, é o descarte de água utilizada em tanques e piscicultura o qual utiliza o hormônio para masculinização dos peixes, objeto de estudo desse trabalho.

Esses compostos orgânicos são incorporados ao material particulado rico em matéria orgânica, que ao decantar se misturam a minerais de diversos tipos e granulações presente nos fundos dos rios, participando da formação dos sedimentos¹³. A acumulação desses contaminantes nos sedimentos é dependente da granulometria do sedimento. Geralmente a acumulação de compostos orgânicos

ocorre nas frações mais finas desse material, por isso a importância de estudar essa matriz biológica¹³.

Sedimentos são materiais sólidos e semifluidos depositados no leito de lagos e reservatórios¹⁴. Sedimentos lacustres, límnicos e fluviais são constituídos de partículas de grande variedade de tamanho, formas geométricas e composição química que são transportados pela água, ar ou gelo, dos pontos de origem nos ambientes terrestres e, posteriormente, depositados nos fundos dos rios (dominantemente em locais de correnteza baixa ou nula), lagos, represas, áreas alagáveis (costeiras ou continentais) e oceanos^{7,14}.

Por serem capazes de armazenar nutrientes em seu interior, os sedimentos constituem também substrato para uma variedade de organismos, no seu interior ou na interface sedimento-água¹⁵. Com isso, eles podem se tornar fontes de contaminação para organismos que se alimentam de matéria orgânica, até mesmo muitos micro-organismos como bactérias. O sedimento contaminado pode causar alterações vitais importantes nesses seres, interferindo na cadeia alimentar, pois esses micro-organismos são fonte de alimentos para diversos animais aquáticos como os peixes, por exemplo^{11,12,16}.

Considerando as vias de deposição de compostos químicos, pode-se considerar que o sedimento é o destino final desses compostos no meio ambiente, onde se acumulam os materiais nele depositados. Com isso, a determinação, quantificação e estudo da atuação desses compostos nos sedimentos são de elevada importância para controle ambiental. Os sedimentos de rios, lagos, e reservatórios aquáticos onde sejam administrados compostos químicos devem ser analisados, pois se tornam indicadores de acumulação de contaminantes com o passar do tempo e de sua utilização¹⁷. A contaminação de um sedimento pode exercer efeitos muito negativos em um ecossistema¹⁵. Dessa forma, os sedimentos tem se tornado um indicador de contaminação em ambientes aquáticos.

2.2 – Fontes de contaminação por hormônios estrogênicos

Há muito tempo existe a preocupação com o consumo de água e alimentos contaminados, evidenciando-se que a ingestão destes é um risco potencial para a vida humana. Atualmente, este enfoque continua tendo sua importância, contudo uma nova problemática vem tomando uma tônica de grande proporção: as possíveis

interferências causadas no sistema endócrino, devido ao contato com substâncias químicas presentes no meio ambiente³⁵. Hormônios, que também podem estar presentes na água e alimentos consumidos devido a um processo de contaminação também podem causar interferências e com isso um desequilíbrio aos seres vivos.

Hormônios estrogênicos são produzidos naturalmente pelos seres vivos, ou sintetizados para serem utilizados como medicamentos. Na piscicultura estes compostos são utilizados como hormônios para promover a masculinização dos peixes. Estes são eliminados e encaminhados por diversas rotas ao ambiente¹⁸. Na Figura 1 são apresentadas algumas possíveis rotas de contaminantes desreguladores endócrinos no meio ambiente.

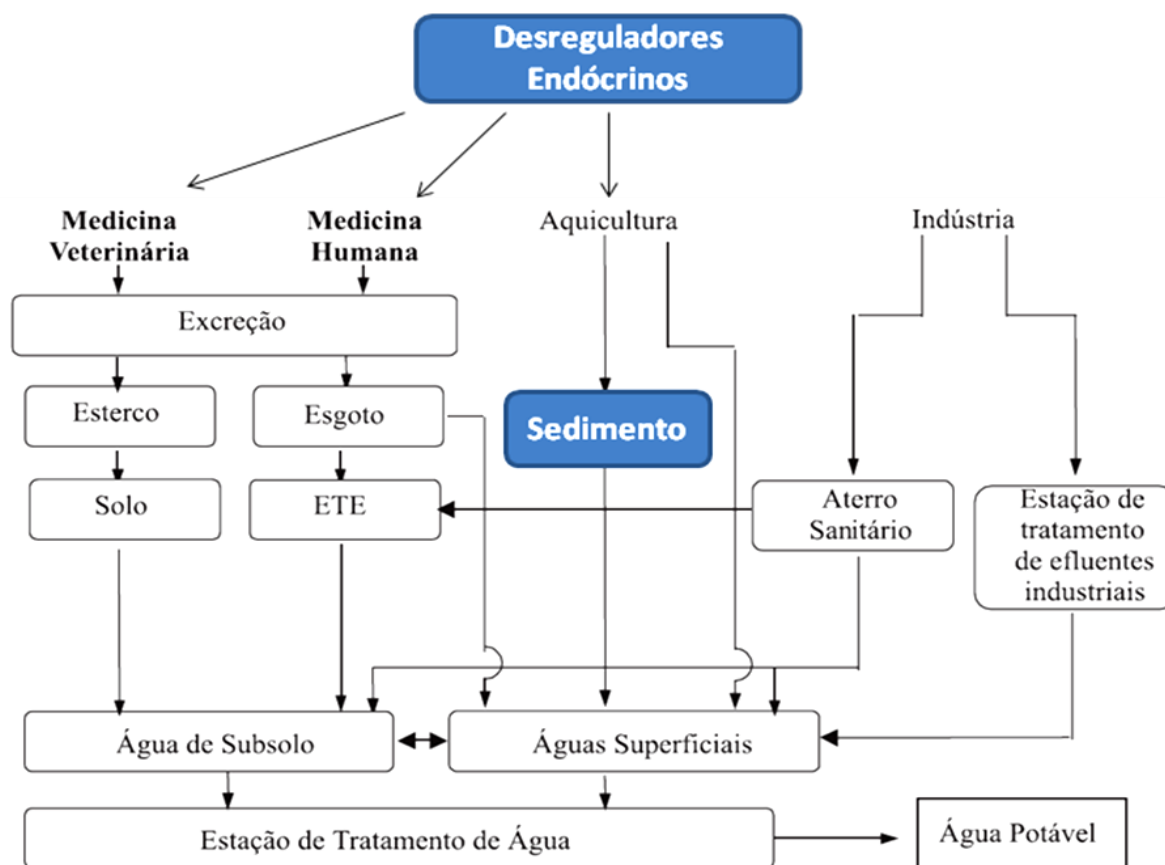


Figura 1. Possíveis rotas dos contaminantes desreguladores endócrinos no meio ambiente com ênfase nos sedimentos. Adaptado de Bila e Dezotti (2003)¹⁷

Hormônios esteroides podem ser divididos em andrógenos, corticoides e estrógenos, sendo que os andrógenos são um grupo importante que possuem 19 átomos de carbono. Dentro desse grupo o mais importante é a testosterona¹.

Esteróides anabólico-androgênicos (EAA) podem ser compostos naturais ou sintéticos formados pela testosterona e seus derivados². Os mesmos são produzidos principalmente pelos ovários sob o comando de hormônios proteínóides liberados pela pituitária na corrente sanguínea, mas também podem ser administrados sob a forma de medicamentos.

Após o consumo destes hormônios pelo sistema alvo, animais ou humanos (neste caso, o uso se dá como medicamento), ocorre excreção, para a rede coletora de esgoto e em muitos casos o esgoto é lançado *in natura* diretamente nos corpos d'água. Em outros casos, o esgoto passa por tratamento em Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) e o efluente é então lançado no corpo d'água. Na Pecuária, o consumo de hormônios é realizado por animais terrestres, onde o principal destino de excreção é o solo, que pode atingir tanto o manancial superficial, por escoamento, como o subterrâneo, por infiltração¹⁷. Quando utilizado por animais aquáticos, como peixes, o destino de excreção é a própria água.

Bila e Bezoti (2003)¹⁷ relataram em seu estudo que a ocorrência de fármacos residuais no meio ambiente pode apresentar efeitos adversos em organismos aquáticos e terrestres e estes efeitos podem ser em qualquer nível da hierarquia biológica: célula, órgãos, organismo, população e ecossistema¹⁷. Ao se analisar os estrogênios sintéticos, pode-se considerar que, eles também exercem uma influência ambiental importante¹⁸. Ressalta-se também dois problemas ambientais importantes relacionado ao uso desenfreado de fármacos. O primeiro refere-se a acumulação nos recursos hídricos e segundo à resistência de micro-organismos a esses fármacos¹⁷, onde algumas bactérias podem se tornar resistentes a fármacos, com isso, podendo inibir o efeito de alguns medicamentos em sua finalidade principal¹⁷.

Em estudo de revisão, Lopes (2003) descreve as concentrações de alguns hormônios estrogênicos no meio ambiente. Neste estudo foi verificado que, no Brasil as concentrações de estrógenos encontradas são superiores aos países comparados, Inglaterra, EUA, Alemanha Espanha e que, embora esses hormônios expostos no esgoto estejam em baixos níveis, ainda assim atingem mananciais e água potável em concentrações acima de 1 ng L⁻¹, dose mínima a apresentar efeito biológico¹⁹.

Devido a possíveis efeitos adversos causados a humanos e a animais aquáticos pela utilização de hormônios estrogênicos, torna-se importante o estudo desses compostos em matrizes de interesse ambiental. Leis que regulamentam o padrão de portabilidade de água no Brasil (CONAMA, Resolução 357, e Portaria 158 do Ministério da Saúde) não citam os hormônios como contaminantes passíveis de controle, por isso a preocupação com esses contaminantes no meio ambiente.

2.3 – Piscicultura

Piscicultura é denominada a criação de peixes em tanques com objetivo de reprodução e engorda para fins recreativos, ecológicos e para alimentação. Os tanques de piscicultura geralmente apresentam baixa profundidade e devem ser de fácil manejo²⁰. Assim como na agricultura, esse ramo objetiva bons resultados, como alimentos de boa qualidade e produção em grande escala, na medida da procura pelos consumidores.

A criação de peixes tilápia (Figura 2), tilapicultura, vem atravessando grande crescimento, impulsionado pelo desempenho zootécnico das espécies de tilápia e sua aceitação no mercado⁵, é hoje o segundo grupo de peixes mais cultivados no mundo, perdendo apenas para as carpas²¹. A tilapicultura é objeto de estudo de diversas áreas do ramo científico, principalmente por apresentar a limitação de alta prolificidade e a maturação sexual precoce⁵.



Figura 2: Peixe Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um peixe de água doce, espécie tipicamente tropical, que foi introduzida no Brasil em 1971. Essa espécie possui grande capacidade de adaptação aos mais variados climas, possui carne de fino

paladar, destacando-se pelo fácil manejo, característica que facilita sua criação mesmo em pequenas quantidades de água³. A tilápia do Nilo é também a espécie mais bem sucedida em processos de masculinização de peixes utilizando hormônios sintéticos de baixo custo e fácil manejo. Com isso, é considerada a mais relevante para essas condições de cultivo, utilizando hormônios masculinizantes³. A maior parte da Tilápia produzida, e por consequência seus produtos, tem origem, em alevinos machos obtidos através do tratamento com MT na ração durante pelo menos os seus 30 primeiros dias de vida²¹.

2.4 – O hormônio 17 α metiltestosterona

Na literatura é reportada a utilização do hormônio 17 α metil-testosterona em tanques de piscicultura para masculinização de peixes^{5,22,23,24,25}. Com a masculinização dos peixes, o ganho de massa é maior e se torna mais viável economicamente^{5,22,23,24}. Phelps e Cerezo (1992) em seu estudo, concluíram que a técnica mais prática para obtenção de populações monossexuais masculinas se dá com a manipulação do sexo fenotípico pelo tratamento de larvas com hormônios masculinizantes^{19, 26}.

Entre os hormônios mais utilizados na piscicultura para a masculinização de peixes tilápia está o hormônio andrógeno sintético 17 α metiltestosterona (MT). Este hormônio é bastante utilizado por possuir uma grande taxa de masculinização e por ser facilmente excretado logo após o período de tratamento hormonal¹⁸. Este hormônio é utilizado em peixes da linhagem Tilápia do Nilo, por esse apresentar baixa disponibilidade de alevinos monossexo de boa qualidade, e com isso tornar viável o seu cultivo em piscicultura²².

O hormônio estrogênico 17 α metiltestosterona é um hormônio sintético derivado da testosterona que tem um grupo alquil na posição 17 α , Figura 3. A indústria farmacêutica, para minimizar os efeitos metabólicos causados pelos hormônios sexuais, começou a estudar modificações na estrutura molecular desses compostos²⁷. No caso da testosterona, esteroide anabólico-androgênico que dá origem a 17 α metiltestosterona por alquilação, originaram-se três grupos sintéticos: ésteres do grupo 17- β -hidroxil; alquilados na posição 17 α e por fim os com o anel esteroide alterado²⁷.

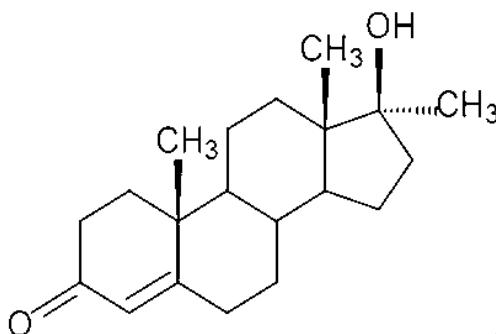


Figura 3: Fórmula estrutural do hormônio 17 α metiltestosterona utilizado em piscicultura para masculinização de peixes tilápia do Nilo.

A 17 α metiltestosterona é administrada por via oral nos alevinos recém-eclodidos por meio da alimentação⁴. Desta forma o hormônio entra em contato com três matrizes diferentes: o animal ao qual está sendo submetida à dosagem, a água ao qual é o veículo de administração do hormônio e por fim o sedimento do tanque de piscicultura. A quantidade deste no sedimento é uma das indicações de quanto do hormônio é absorvido pelo animal, sendo que a acumulação deste nos sedimentos poderá causar danos ao meio ambiente. Principalmente ao promover a liberação de água para outros locais.

Os sedimentos destes tanques devem ser analisados, pois se tornam indicadores de bioacumulação dessas moléculas com o passar do tempo e de sua utilização. A utilização de hormônios em tanques de piscicultura apresenta uma maior possibilidade de contaminação do meio ambiente, Uma vez que essas moléculas podem não ser totalmente metabolizadas pelos peixes, e se acumular na água ou sedimento do tanque de piscicultura.

Sedimentos de ambientes aquáticos são indicadores da situação ambiental, e nutritiva deste ambiente. São de grande importância, dado o reconhecimento de que ele atua, não só de armazenamento ou acumulação de nutrientes e contaminantes, como também de reprocessamento de tais materiais e de troca de espécies químicas com a coluna d'água e biota aquática⁶. O que faz do sedimento um dos compartimentos ambientais mais importantes na avaliação dos níveis de contaminação dos sistemas aquáticos é a sua capacidade de acumular compostos²⁹. Essa capacidade se deve à sua característica de alta superfície específica e alta capacidade de troca catiônica, são termodinamicamente instáveis, sendo

constituídos por diferentes substratos geoquímicos dos quais os mais importantes são aqueles que possuem a capacidade de reter e concentrar elementos-traços²⁷.

Um estudo realizado por Homklin *et al*, (2011)²⁸, mostrou que a 17 α metiltestosterona e seus produtos de degradação com atividade androgênica podem acumular-se potencialmente nos sedimentos de lagoas de piscicultura. Isso demonstra a importância dessas análises em sedimentos cujo teor do hormônio androgênico é estudado²⁸.

2.5 – Técnicas de coleta e análises de sedimentos de piscicultura

A coleta de sedimentos feita corretamente irá assegurar que as análises dessa matriz de interesse ambiental sejam realizadas de forma confiável. Em piscicultura, uma amostragem correta do material coletado no fundo dos viveiros é fundamental para identificar a qualidade dos sedimentos bem como alternativas para aperfeiçoar os índices de produção.

Para que os sedimentos coletados expressem as suas reais condições, devem ser considerados fatores como: tipo de equipamento utilizado para coleta; camadas de sedimento das amostras; número de amostras por viveiro; conservação e preparação das amostras²⁹. A técnica de coleta utilizada irá depender do tipo de análise a ser realizada.

O fundo dos viveiros de piscicultura não apresenta uniformidade da camada de sedimentos, da textura do solo ou da composição química. Normalmente, a espessura da camada de sedimentos aumenta das áreas mais rasas para as áreas mais profundas, e a textura do solo é mais fina nas áreas mais profundas do que nas áreas mais rasas, sendo que algumas propriedades do solo, como por exemplo, teores de matéria orgânica, capacidade de troca de cátions e teor de nitrogênio orgânico, frequentemente apresentam concentrações mais elevadas em direção ao centro dos viveiros. Além disso, mesmo em áreas com a mesma profundidade, algumas propriedades do solo exibem uma variação aleatória entre pontos diferentes, sendo que essas propriedades também podem variar de acordo com a espessura da camada dos sedimentos coletados, alterando diretamente o perfil e a nomeação dos horizontes dos sedimentos²⁹.

As amostras devem ser coletadas ao longo de toda extensão do tanque de piscicultura e em pontos nos quais a estrutura do sedimento do fundo não tenha sido

alterada anteriormente pela passagem da pessoa que está realizando a coleta. A coleta deve seguir das áreas mais rasas para áreas mais profundas, ou seja, das bordas do tanque para o meio. É necessário que em todos os pontos ao longo do transepto, as amostras coletadas tenham a mesma espessura, eliminando-se, com este procedimento, a variabilidade devida aos diferentes perfis de solo²⁹.

A coleta de testemunhos curtos pode ser feita com o uso de coletor cilíndrico (cerca de 9,0 cm de diâmetro), do tipo gravidade. Este coletor permite a coleta de testemunhos de sedimentos praticamente não perturbado, bem como a coleta de amostras de água, da interface sedimento-coluna d'água. Coleta de sedimentos superficiais pode ser feita com draga de *Birge-Ekman*, esta draga é apropriada para a coleta de sedimentos não muito consolidada e é recomendada para ambientes com pequena correnteza⁶.

Logo após a coleta os sedimentos devem ser secos para evitar atividade microbiana. A secagem pode ser feita em estufa, ou em contato com o ar desde que sejam espalhadas em camadas finas para secagem uniforme à temperatura ambiente em uma capela. Para evitar contaminação as amostras devem ser tampadas com papel alumínio ou papel filme, dependendo do tipo de análise a ser realizada²⁹.

Após a etapa de secagem o sedimento deve ser pulverizado, para obtenção de diferentes tamanhos de partículas, dependendo da análise a ser realizada. Após a peneiração, os sedimentos devem ser estocados em sacos de papel ou de plástico, caixas de papelão, frascos de vidro ou pequenas latas de metal. As amostras devem ser mantidas secas, porque elas absorvem umidade do ar durante a trituração, peneiração e estocagem²⁹.

2.6.1- Análises físicas e físico-químicas

A caracterização físico-química de um sedimento é realizada avaliando alguns dos critérios como: determinação de potencial hidrogeniônico - pH, determinação de potencial redox, temperatura, capacidade de troca catiônica (CTC), umidade e oxigênio dissolvido²⁷. Já a análise granulométrica é importante para a discussão sobre a contaminação dos sedimentos por substâncias químicas. As partículas mais importantes na caracterização granulométrica são a argila e a silte que por serem de menor tamanho, apresentam maior possibilidade de adsorção de metais²⁷.

2.5.2- Análises granulométricas

As análises granulométricas têm o objetivo de subsidiar o entendimento da partição de contaminantes entre as partículas, a água e a biota e, daí então, poder levantar outros importantes subsídios à toxicidade de sedimentos⁶. O principal objetivo de se analisar a granulometria de sedimentos em caráter ambiental, é para se verificar o teor de silte e argila presente nas amostras, que é a parte mais fina do sedimento, posto que estas partículas sejam mais suscetíveis de reter compostos orgânicos, pois apresentam maior quantidade de matéria orgânica e até mesmo de metais¹⁰.

2.6 – Técnicas de análise de hormônios em sedimentos

Amostras ambientais são muito complexas, pois são muito ricas em compostos orgânicos, biomoléculas, metais, dentre outros. Com isso, alguns desses compostos podem se tornar interferentes frente a análises de outros compostos orgânicos. Nos tanques de piscicultura em que é administrado o hormônio 17 α metiltestosterona, poderá haver a deposição tanto do hormônio, como também dos metabólitos expelidos pelos peixes criados nesses ambientes. Frente a essa questão é necessário que se desenvolvam metodologias capazes de quantificar e diferenciar este hormônio frente aos possíveis interferentes da amostra.

A utilização de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de contaminantes em matrizes ambientais tem se tornado uma ferramenta cada vez mais frequente, considerando-se que os níveis de contaminação são cada vez maiores, com inúmeros analitos a serem analisados e com faixas de concentração muito baixas. Dentre as técnicas cromatográficas mais rotineiramente utilizadas pode-se destacar a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa (CG)²⁹.

Esses métodos de separação estão acoplados a diferentes sistemas de detecção, destacando-se atualmente o acoplamento a espectrometria de massas (EM), devido a sua possibilidade de identificação de compostos pela razão massa carga²⁹. Assim, o monitoramento de resíduos em sedimentos depende de técnicas analíticas que sejam capazes de determinar e quantificar elementos traços em matrizes complexas³⁰.

Devido à característica de os sedimentos serem considerados indicadores ambientais, é importante que sejam realizadas análises que não delimitem apenas os aspectos físico-químicos dos sedimentos. Pois eles podem liberar ou armazenar contaminantes orgânicos em sua área superficial, como consequências de trocas catiônicas ou das condições físico-químicas.

A análise de compostos orgânicos, mais especificamente hormônios, em amostras de sedimento geralmente é feita utilizando métodos de extração que empregam solventes orgânicos como soluções extratoras. Métodos como extração com solvente acelerado, extração ultrassônica, extração com *soxhlet* e extração com fluidos supercríticos são exemplos de métodos de extração utilizados em sedimentos^{31,32}. A extração em *soxhlet* apesar de ser muito usada para análise de compostos orgânicos em sedimentos, não é muito usada para análise de hormônios, principalmente, pois em seu processo são utilizadas altas temperaturas, o que pode ser um fator limitante no caso de hormônios, pois esses compostos orgânicos degradam em temperaturas não muito altas.

O sedimento é uma matriz considerada muito complexa, que contém muitos interferentes, com isso, na maioria das vezes é necessário utilizar etapas de limpeza (*clean-up*), para remoção de interferentes da matriz. Nessas etapas de *clean-up* podem ser usadas colunas de sílica, tratadas de acordo com o interesse de limpeza da amostra. Geralmente a exclusão dos interferentes é feita a partir de suas características físico-químicas. Outro exemplo de material utilizado em *clean-up* são os cartuchos para extração em fase sólida (SPE) contendo adsorventes específicos, como C18, Florisil, C8, CN entre outros^{33,34}.

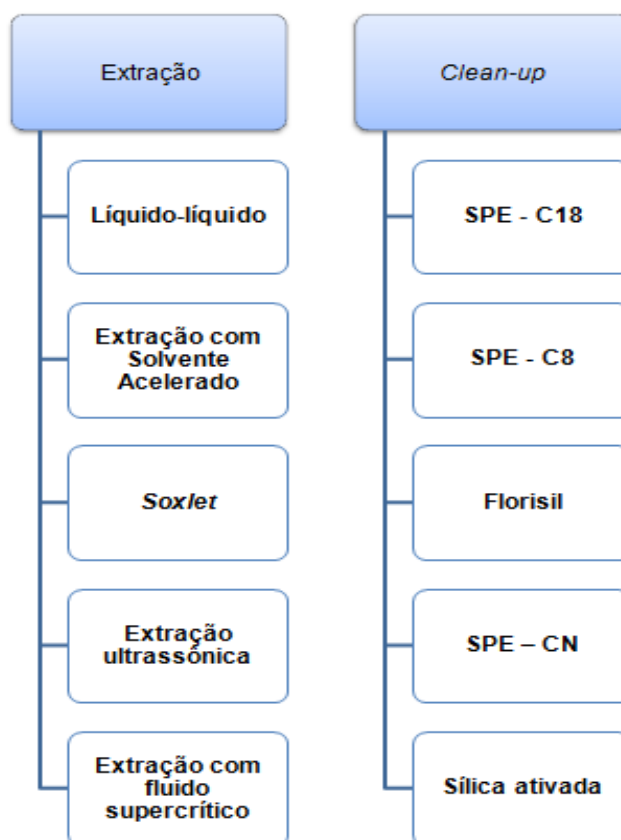


Figura 4: Metodologias de extração e *Clean-up* utilizadas para analisar hormônios em sedimentos^{33,34}.

2.8 – Ferramentas para validação de métodos analíticos

O objetivo da validação de um método analítico é demonstrar que esse procedimento, quando corretamente executado, produz resultados satisfatórios e confiáveis³⁵. Critérios como confiabilidade, reprodutibilidade e rastreabilidade são importantes quando se aperfeiçoa ou produz novas metodologias de análise³⁶. A validação de um método analítico se baseia desde o planejamento dos experimentos, preparo dos materiais, registro de dados, realização do experimento em si até a análise dos dados e conclusão da qualidade do método proposto^{36,37}. O laboratório deve validar um método nos casos em que se trabalha com métodos não normalizados, métodos criados ou desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos e ampliações e modificações de métodos normalizados³⁸.

As análises cromatográficas de compostos orgânicos, em especial os compostos endógenos ou exógenos, em matrizes de interesse ambiental também tem sua importância dentro da comunidade acadêmica³⁹. Metodologias para

quantificação de hormônios em matrizes de interesse ambiental geralmente são aplicadas a quantificação de compostos a níveis de concentração muito baixos, na faixa de ng/mL, com isso se exige dessas metodologias uma maior confiabilidade de seus resultados.

No Brasil, alguns órgãos disponibilizam guias de validação para realização de ensaios para quantificações bioanalíticas. Da mesma forma, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, disponibiliza uma Resolução que descreve os critérios de validação para métodos bioanalíticos, o Instituto Nacional de Metrologia – INMETRO disponibiliza também um guia com orientação sobre validação de métodos analíticos.

Em métodos de separação como a cromatografia, geralmente são considerados alguns parâmetros base para a validação do método^{36,38,40,41}. A definição das figuras de mérito, ou seja, dos parâmetros para a realização da validação do método analítico irá depender do foco das análises a serem realizadas, bem como do analito de interesse, sua faixa de concentração e a matriz de interesse analisada. Os parâmetros que geralmente são realizados em validação de métodos de separação são: linearidade, sensibilidade, recuperação, limites de detecção e quantificação, seletividade, precisão e robustez.

2.7.1- Seletividade

A presença de metabólitos, produtos de degradação, ou até mesmo compostos com características semelhantes aos compostos estudados, podem interferir no desempenho de medição, esses interferentes podem aumentar ou diminuir o sinal e a força desse evento pode também depender da concentração³⁸. A seletividade, ou também como pode ser chamada, especificidade de um método analítico é um parâmetro que define se um método é ou não afetado pela presença de outros compostos³⁹. Em outras palavras, seletividade é o grau de interferência que um composto tem frente a outros compostos³⁶. A seletividade é um parâmetro que, se não for avaliada e com isso assegurada, parâmetros como linearidade, tendência e precisão estarão certamente comprometidos³⁸.

De acordo com as orientações do INMETRO sobre validação de métodos analíticos a seletividade pode ser realizada utilizando ou não amostras e materiais de referência. Para metodologias onde se utilizem amostras e materiais de

referência, a análise é feita com a presença de interferentes na amostra de referência e é então verificado se há ou não a interferência desses compostos. Quando não se possui um material de referência, são analisadas amostras reais que contenham vários interferentes, e se houver uma alteração nos resultados das análises com interferentes em relação às análises sem interferentes, o método deve ser aperfeiçoado ou selecionado outro mais adequado ao tipo de análise.

Em cromatografia, existem algumas formas de se verificar se um método é ou não seletivo, por exemplo, a comparação da matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com a substância padrão do analito de interesse. Nesse tipo de análise deve se verificar uma boa separação do pico do analito, este deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse e estar bem separada dos demais picos da matriz³⁶.

2.7.2- Linearidade e sensibilidade

A linearidade de um método está relacionada à capacidade de um método em oferecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada faixa de trabalho^{36,38,39}. Os equipamentos utilizados para a realização das análises devem oferecer uma faixa dinâmica linear, para que seja feita então a correlação entre o sinal analítico produzido pelo composto e sua concentração. Para isso, é necessário verificar até que ponto a faixa de concentração do analito coincide com faixa dinâmica linear, assim será definido a faixa de trabalho para o analito no equipamento.

Em cromatografia, geralmente se usa o valor da área do pico cromatográfico do composto estudado, para os cálculos de correlação linear, com esses valores e os respectivos valores de concentrações dos padrões analíticos, é feita uma correlação matemática entre o sinal (área ou altura do pico) e a concentração, essa correlação matemática é expressa em forma de uma equação, que pode ser expressa como uma equação de reta chamada curva analítica^{36,39,38}.

A linearidade pode ser observada com a construção de um gráfico de dispersão, onde os resultados dos ensaios estarão em função da concentração do analito e verificada a partir da equação regressão linear³⁸.

A equação da reta que correlaciona os valores de concentração do analito é assim descrita:

$$y=ax + b$$

onde, o valor de y é correspondente a resposta medida, x equivale a concentração que irá ser encontrada com a equação, b é a interseção com o eixo y , quando $x=0$ e a corresponde a inclinação da curva analítica ou sua sensibilidade³⁸. Além dos coeficientes de regressão a e b , também se pode calcular o coeficiente de correlação (r), parâmetro que define a qualidade de uma curva analítica. Onde valores que se aproximam de 1 são considerados com melhores correlações lineares^{36,37,42,43}.

Além dos valores de correlação linear (r), pode também ser feitos outros testes estatísticos para verificar a linearidade da curva analítica, uma alternativa seria a utilização da análise de variância ANOVA na regressão³⁸.

A capacidade do método em distinguir com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas é denominada com sensibilidade de um método. A sensibilidade (a) é descrita na curva analítica de um método^{37,44}. Um método é descrito como sensível se, uma pequena diferença na concentração do analito causa grande variação no valor do sinal analítico medido^{37,44}.

2.7.3- Tendência/Recuperação

Normalmente nos processo para avaliar a tendência de um método são usados materiais de referências certificados (MRV) ou comparações interlaboratoriais, bem como a realização dos ensaios de recuperação³⁸.

A tendência pode ser expressa como recuperação analítica³⁸:

$$\text{Tendência} = \frac{\text{Valor observado} \times 100}{\text{Valor esperado}}$$

Uma forma de avaliar a exatidão de um método é empregar os valores obtidos nos ensaios de recuperação. Para isso, pode-se avaliar a exatidão por meio do cálculo do erro relativo (ER) expresso pela seguinte equação:

$$\text{ER} = \frac{\text{Valor observado} - \text{valor esperado} \times 100}{\text{Valor esperado}}$$

A eficiência de uma metodologia de extração pode ser estimada através de ensaios de recuperação do analito. Para o cálculo é feita a comparação da resposta obtida para o analito adicionado na matriz e extraído, com a resposta obtida para o analito em amostras preparadas em solvente e, conseqüentemente, não extraídas, as quais devem representar 100%³⁹.

A recuperação pode ser estimada com a análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do analito (*spike*). O ensaio pode ser realizado adicionado à amostra o analito em três faixas de concentração: baixa, média e alta da faixa de uso do método. O cálculo é então feito da seguinte forma³⁸:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C1 - C2}{C3} \right) \times 100$$

Os dados C1, corresponde à concentração do analito na amostra fortificada, C2 a concentração do analito na amostra não fortificada e C3 a concentração do analito adicionada à amostra fortificada³⁸.

2.7.4 - Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

✓ **Limite de detecção**

O limite de detecção (LD) é definido como a menor concentração de um analito que o método é capaz de diferenciar com confiança. É a menor concentração que pode ser detectada através do método utilizado. Para medidas feitas com analitos em faixas de concentrações muito baixas é necessário se conhecer qual o limite de detecção do método, para saber qual a menor concentração possível de detecção para o composto^{36,38,39}.

Existem diversas maneiras de se calcular o limite de detecção, com o LD pode variar em função do tipo de amostra, não há uma fórmula estatística que preveja como realizar esse cálculo, sendo que este irá depender da situação em questão. Portanto, a estimativa do LD pode ser feita através de método visual, método relação sinal-ruído e métodos baseados em parâmetros da curva analítica^{36,38,39}.

De acordo com o INMETRO, é recomendado no mínimo 7 replicatas para o cálculo do LD⁴⁸. Algumas metodologias para o cálculo do LD é apresentado abaixo:

Tabela 1 – Metodologias de cálculo de Limites de Detecção (Adaptado, INMETRO, 2011)³⁸.

Matriz	Cálculos
Branco da amostra	$LD = X + t_{(n-1,1-\alpha)} \cdot s$ sendo: X = média dos valores dos brancos da amostra; t é a distribuição de <i>Student</i> , dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança e, s = desvio-padrão amostral dos brancos da amostra.
Branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito	$LD = 0 + t_{(n-1,1-\alpha)} \cdot s$ sendo: t = distribuição de <i>Student</i> , dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança e, s = desvio-padrão amostral dos brancos da amostra, com adição.

✓ Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitável para o método proposto^{31,34}. O valor do limite de quantificação deve ser testado em amostras independentes, após ter sido determinado, a fim de se verificar se a tendência e a precisão conseguidas são ou não satisfatórias^{37,38}. Na Tabela 2 estão descritos algumas metodologias para se calcular o LQ de método, segundo os critérios do documento do INMETRO DOQ-CGCRE-008.

Tabela 2 – Metodologias de cálculo de Limites de Quantificação (Adaptado, INMETRO, 2011)³⁸.

Matriz	Cálculos
Branco da amostra	$LQ = X + 5s$ ou $LQ = X + 6s$ ou $LQ = X + 10s$ onde: X = média dos valores dos brancos s = desvio-padrão amostral dos brancos
Branco com adição de concentrações variadas do analito, próximas ao LD	<ul style="list-style-type: none"> - Medir, uma vez cada replicata independente, a cada nível de concentração. - Calcular o desvio-padrão amostral “s” do valor do analito, para cada concentração. - Fazer o gráfico “concentração” versus “s”, e atribuir um valor para o LQ, por inspeção.

2.7.5 – Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, ela é representada a partir de circunstâncias específicas de medição, as maneiras mais comuns de expressá-la são através da repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade que geralmente são expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação - CV (%)³⁸:

$$CV (\%) = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{Concentração média determinada}} \times 100$$

✓ **Repetitividade**

A concordância dos resultados de medições sucessivas de um método é definida repetitividade. Essas análises devem ser analisadas sob as mesmas condições de medição, mesmo procedimento, laboratório, analista e estas repetições devem ser feitas em um curto intervalo de tempo⁴³. Quantitativamente, a repetitividade pode ser expressa em termos da dispersão dos resultados e pode ser determinado por meio de análises de padrões, material de referência ou adição do analito ao branco da amostra em várias concentrações na faixa de trabalho³⁸.

Para definir se as diferenças entre as análises realizadas são significativas, calcula-se o limite de repetitividade a partir dos valores de desvio padrão dos resultados dos resultados dos ensaios.

✓ **Precisão Intermediária**

A precisão intermediária diferencia-se da repetitividade em relação a alguns parâmetros que são variados durante as análises. Na precisão intermediária as análises são realizadas por diferentes analistas, em diferentes equipamentos e em tempos diferentes³⁸. Esta medida de precisão representa a variabilidade dos resultados em um laboratório³⁸.

✓ **Reprodutibilidade**

A reprodutibilidade é análise da qualidade de um método, sua precisão, entre laboratórios diferentes. O teste é feito utilizando o mesmo método, e as mesmas

amostras em laboratórios diferentes, sendo as análises também realizadas por analistas diferentes^{43,48}.

CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Limpeza da vidraria

Todas as vidrarias utilizadas para o desenvolvimento desse trabalho foram lavadas inicialmente com detergente comum, de uso doméstico, para retirar o excesso de resíduos. Em seguida, após o enxague e retirada dos resíduos, foram deixadas por 24 horas submersas em detergente alcalino Detertec, na concentração 5% v/v. Após este período, as vidrarias foram limpas e enxaguadas com água corrente. E então utilizado KOH 5% v/v, preparado em solução alcoólica, para remoção de compostos orgânicos presentes. As vidrarias foram enxaguadas abundantemente com água corrente, em seguida com água deionizada e finalmente com água *nanopure*.

Após a etapa de enxague, foi feita a separação das vidrarias que podem ser levadas à mufla. As vidrarias volumétricas foram secas à temperatura ambiente e em seguida guardadas em local fechado, livre de partículas suspensas do ar. As vidrarias que podem ser levadas à mufla, as não volumétricas, foram deixadas por 4 horas a temperatura de 400 °C na mufla. Após essas etapas de lavagens as vidrarias foram armazenadas em cubas tampadas para posteriormente serem utilizadas.

3.2- Amostragem

As amostras de sedimento foram coletadas no Centro de Tecnologia em Piscicultura (CTP) da Granja Modelo do Ipê, localizada no Núcleo Bandeirante, Distrito Federal. As amostras foram coletadas em três tanques de piscicultura, sendo que um dos tanques foi utilizado como controle, ao qual nunca foi administrado o hormônio, os outros dois são um tanque aberto, exposto ao sol, e o outro um tanque estufa, fechado. Foram realizadas duas coletas para comparação de sazonalidade, a primeira coleta foi feita em Junho de 2011 em período de seca e a segunda coleta foi feita em novembro de 2011 no início do período chuvoso.

Para os testes de escolha do método e validação da metodologia foram utilizadas as amostras coletadas no tanque controle, ou também classificado tanque branco TB. A descrição dos pontos coletados foi feita seguindo o critério de tanque

aberto (PxTA) e tanque fechado (PxTF) e tanque branco (TB), onde a letra x identifica a localização do ponto dentro do tanque, as amostras foram identificadas desta forma no local de coleta e posteriormente no preparo de amostras.



Figura 5: Imagem de satélite dos pontos de coleta realizados na CTB – Granja do Ipê em Brasília. TB indica o tanque branco, TA tanque aberto e TF tanque fechado.



Figura 6: Tanque de criação de peixe Tilápia do Nilo, pontos P1TA, P2TA e P3TA referentes ao tanque aberto.

A coleta foi feita seguindo o procedimento descrito no Comunicado Técnico 16 e 17 da Embrapa Meio Ambiente²⁹ sobre coleta de sedimentos de viveiros de

piscicultura. Para a realização da coleta foi utilizada a draga de *Birge-Ekman* Figura 8, devido o sedimento do local não possuir galhos ou raízes de plantas e também pelo objetivo da coleta ser captar uma amostra superficial do sedimento do tanque. As amostras foram coletadas em três pontos distintos dos dois tanques de piscicultura, como demonstra a Figura 7, a escolha dos pontos amostrais procurou enfatizar as extremidades do tanque, e entrada e saída na captação da água.



Figura 7: Draga de *Birge-Ekman*

O procedimento de coleta utilizando a draga de *Birge-Ekman* se deu da seguinte forma, foi feita a armadilha na draga e instantaneamente ela foi jogada no tanque, quando em contato com o sedimento a draga se abre e se fecha automaticamente sendo assim coletado aproximadamente 1,5Kg de amostra. A amostra coletada foi armazenada em um saco plástico, devidamente identificado, temporariamente em caixa de isopor até a estocagem no laboratório.



Figura 8: Coleta de amostras de sedimento utilizando a draga *Birge-Ekman*.

3.2.1- Manipulação do hormônio

O hormônio é manipulado inicialmente na ração para posterior disponibilização aos alevinos recém-eclodidos. A manipulação é feita seguindo o procedimento: o hormônio sólido já vem pesado e lacrado em sua embalagem de fábrica, cada embalagem contém 60mg de 17 α metilttestosterona que são então diluídos em 60 mL de álcool etílico 98 %, essa solução é então adicionada em 1 Kg de ração.

O procedimento de reversão ocorre em 4 dos 20 tanques em cada mês. Sendo que, aproximadamente 45 dias o tanque fica recebendo hormônio, com a presença dos peixes para a masculinização. Após esse período os tanques são secos e passam por um processo de calagem para regulação do pH e ficam secos por aproximadamente 15 dias. Com isso, os tanques que são administrados os hormônios passam a maior parte do ano ativo, recebendo o hormônio diariamente.

A aplicação da ração com o hormônio é realizada por um período de 6 vezes ao dia, sendo que a ração é administrada aos peixes de 9h da manhã até as 16h. Em cada tanque são colocados aproximadamente 250 peixes para reprodução, 15 dias após são retirados esses peixes. Em 30 dias os peixes maiores e já revertidos são retirados e em 45 dias após o início da exposição ao hormônio é cessado o tratamento e os peixes já estão em sua grande maioria masculinizada.

O Centro de Tecnologia em Piscicultura possui duas lagoas de decantação para tratamento da água proveniente dos tanques de piscicultura. Após a exposição com hormônio o tanque é esvaziado e a água vai diretamente para a primeira lagoa de decantação em seguida para a segunda (Figura 4), para um tratamento da água, e por fim é captada pelo córrego Coqueiro, que é o principal afluente, na margem direita, do Riacho Fundo, que é uma sub-bacia da bacia do Lago Paranoá.

Com o tanque de piscicultura vazio, este passa por um processo de calagem para correção do pH e preparação para um novo período de reprodução. Anualmente os sedimentos dos tanques são retirados do tanque e esse sedimento é reutilizado como matéria orgânica em plantação de mudas nativas do cerrado.

3.3- Preparo de Amostra - secagem e armazenagem

Após a coleta as amostras foram encaminhadas para o laboratório de química analítica e ambiental – LQAA, e foram expostas ao procedimento de secagem. Foi

retirada uma alíquota de aproximadamente 200 g de amostra coletada e armazenada em uma placa de petri a qual foi envolvida em papel alumínio, com orifícios para um melhor processo de secagem à temperatura ambiente. A alíquota da amostra foi levada à capela, onde permaneceu até secar o material.

Para as análises físico-químicas as amostras foram preparadas conforme procedimentos acima, e após a secagem em capela as amostras foram peneiradas em peneira de malha de 250 µm e colocadas em estufa por 24h. Para as análises orgânicas as amostras foram peneiradas em peneira de 200 µm, e armazenadas em freezer a temperatura na faixa de -20°C em recipiente escuro, para evitar a degradação do hormônio.

3.4- Análises física e físico-química

Para as análises físico-químicas foram obtidos os seguintes parâmetros: pH e capacidade de troca catiônica – CTC onde foram determinados os cátions metálicos traçáveis e acidez trocável. O procedimento utilizado para as análises de pH e CTC, foram descritos por COTTA *et al*, 2006²⁷.

3.4.1- pH

As amostras de sedimento para análise de pH seguiram o procedimento descrito no tópico 3.3. As amostras foram pesadas em balança analítica Mettler Toledo AG204, massas na faixa de 5,0 g. Essas amostras foram transferidas para um tubo plástico e nele foi adicionado 12,5 mL de solução de cloreto de cálcio Merk, 0,01 mol.L⁻¹. A mistura foi agitada manualmente e levada em seguida a um agitador mecânico por um período de 30 minutos de agitação. Em seguida é feita a leitura do pH das amostras recém agitadas, com auxílio do pHmetro DPMH 2 Digimed.

Para verificar se os valores obtidos de pH entre as duas coletas eram estatisticamente iguais, ou seja se não houve uma alteração significativa em relação aos dois períodos de coleta foram feitos testes de diferenças entre duas médias conforme descreve o item 3.10 referente aos tratamentos estatísticos.

3.4.2- Capacidade de Troca Catiônica CTC

3.4.2.1- Cátions Metálicos Totais

Em um tubo plástico, foi adicionado 12,5 mL de solução de ácido acético 1,00 mol L⁻¹ a uma massa de aproximadamente 2,5 g de amostra pesada em balança analítica. A suspensão foi agitada por 1 hora com auxílio de um agitador mecânico, e em seguida feita a leitura do pH da suspensão utilizando um pHmetro.

Para a determinação dos cátions metálicos totais deve seguir os seguintes cálculos: cátions metálicos trocáveis (cmol_c/kg) = [pH1 – pH2] x 22, onde, pH1 é referente ao pH da suspensão e pH2 é a medida de pH da solução utilizada para formação da mistura, no caso a solução de ácido acético.

3.4.2.2- Acidez trocável

Em uma balança analítica foram pesados aproximadamente 5,00 g de amostra de sedimento e transferidas a um erlenmeyer de 125,00 mL a ele também foi adicionados 50,00 mL de solução de KCl 1,00 mol L⁻¹. Agitou-se a mistura manualmente algumas vezes, deixou-se em repouso durante 30 minutos. A mistura foi filtrada em papel de filtro Quantitativo J. Prolab, e lavada por duas vezes com alíquotas de 10,00 mL de KCl 1,00 mol L⁻¹. Ao filtrado foram adicionadas 6 gotas de fenolftaleína a 0,1% (m/v) em etanol.

A solução foi titulada com NaOH 0,01 mol L⁻¹ padronizado com biftalato de sódio Merk. Pela equação a seguir, determinou-se a acidez trocável: acidez trocável (cmol_c/kg) = (V x C x 100) / m onde: V= volume (em mL) de NaOH gastos na titulação; C= concentração (em mol/L) da solução de NaOH; m= massa (em g) da amostra.

Para a determinação de CTC é necessário que se realize a soma dos valores dos cátions metálicos totais trocáveis, onde se incluem os valores de cátions metálicos e de acidez trocável. Logo, CTC = acidez trocável (cmol_c/kg) + cátions metálicos trocáveis (cmol_c/kg).

3.4.3- Análise Granulométrica

A análise granulométrica foi realizada segundo o procedimento proposto por Bouyoucos (1926) denominado Método do Densímetro⁴⁵. Para a realização da análise de textura, foram pesados em um béquer, 50 g de sedimento seco. A amostra foi levada a um agitador Hamilton Beach e acrescentada de 200 mL de água destilada e 10 mL de solução de NaOH 6% (m/v), por um período de 15

minutos. Logo após a mistura foi transferida para uma proveta de 1 litro e avolumada com água destilada e então feita a homogeneização por 20 vezes. Após 4 minutos cronometrados foi feita a primeira leitura com o densímetro e aferida a temperatura. Uma segunda leitura da densidade e temperatura foi feita após um período de 2 horas. Os valores foram anotados para posteriores cálculos das proporções de areia, silte e argila no material dragado.

3.5- Escolha da metodologia de extração

Para tornar o analito disponível para quantificação, as amostras de sedimento passaram por processo de extração com solventes orgânicos, para posterior detecção e quantificação utilizando a técnica de cromatografia líquida.

Amostras de sedimento são muito complexas, portanto para a determinação do hormônio nas amostras foi necessário à realização de vários testes de extração encontrados na literatura. Inicialmente foi testada uma metodologia descrito por Petrovic, *et al* (2001)³⁴ para análise de hormônios esteroides em sedimento. A escolha da extração ultrassônica ao invés de extração utilizando *soxhlet*, mais usual em análises de amostras de sedimentos, se deu devido o hormônio degradar em altas temperaturas.

As análises realizadas foram feitas utilizando um sedimento isento do analito (sedimento branco), um sedimento branco adicionado o padrão analítico e sedimento de tanques em que foi administrado o hormônio. Esses testes iniciais serviram para verificar a presença ou ausência do hormônio nas amostras em que foi administrado o hormônio inicialmente. A metodologia utilizada para a realização dos testes iniciais seguiu o organograma abaixo.

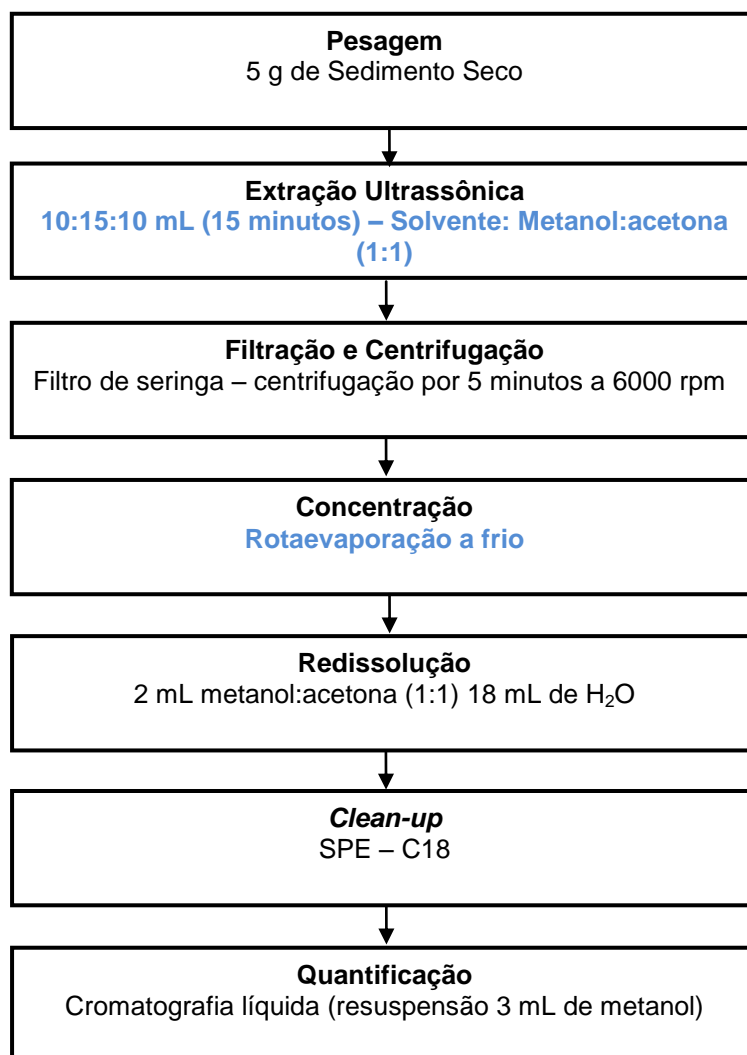


Figura 9: Procedimento de extração descrito por Petrovic *et al* (2001)³⁴ com adaptações.

Para a realização dos primeiros testes foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas:

Tabela 3 – Parâmetros cromatográficos utilizado nos testes iniciais do CL-UV/VIS para a determinação de 17 α metiltestosterona em amostras de sedimentos.

Parâmetros	
Coluna	Coluna <i>Varian</i> C18, 15 cm, ID 4,6 μ m
Fase Móvel	Metanol/água 80/20 (v/v)
Fluxo	0,8 ml/mim
Comprimento de onda	254 nm

Os testes iniciais tinham como objetivo a verificação da presença do hormônio nas amostras e qual sua faixa de concentração. Assim, para aplicação final foi necessário adaptação de uma metodologia com valores de recuperação

consideráveis. Para a escolha do melhor método de extração, foram testados métodos propostos na literatura que trabalharam com amostras de sedimentos.

As duas principais metodologias testadas foram respectivamente as metodologias de Falone (2008) - metodologia 1 - e a proposta por Petrovic *et al* (2001) – metodologia 2. Em ambas as metodologias foram feitas algumas modificações para adequação às condições de análises. Devido a um extrato muito concentrado nos testes preliminares, foi reduzida a massa de amostra para 4,0 gramas, bem como os volumes de solventes extratores, conforme Figura 10.

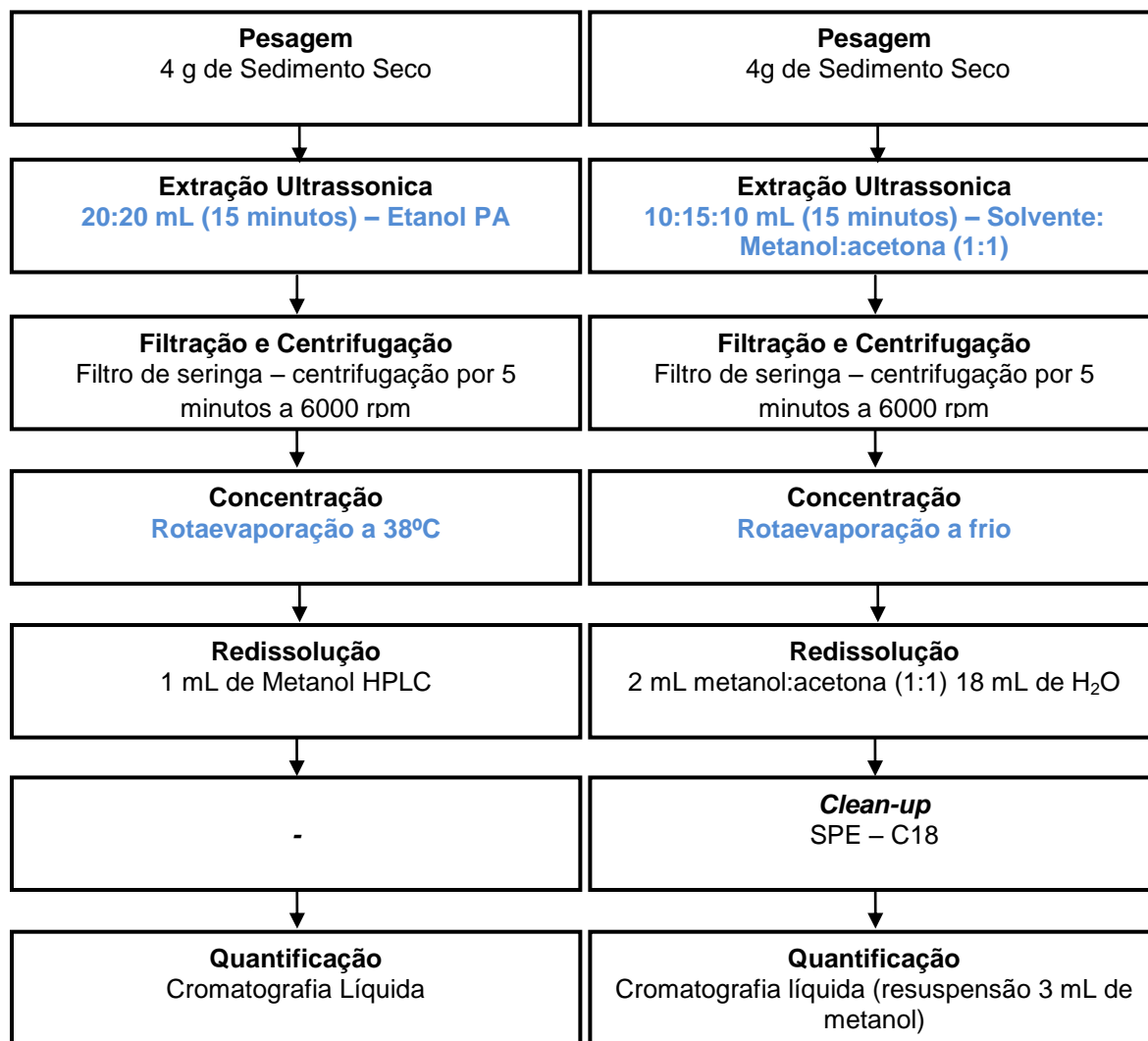


Figura 10: Procedimento de extração descrito por Falone³ (a) e Petrovic³⁴ (b), com adaptações.

3.5.1- Extração

Em uma balança analítica foram pesadas massas de aproximadamente 4,0 g de amostra previamente seca de sedimento, que estava armazenado à temperatura aproximada de -20°C em ambiente escuro. A amostra foi transferida para um tubo de vidro com tampa, e nele foram adicionados 15,0 mL de Etanol PA Merck. A suspensão foi tampada, agitada e então levada ao banho ultrassônico Branson 5210, por 15 minutos, Figura 11.

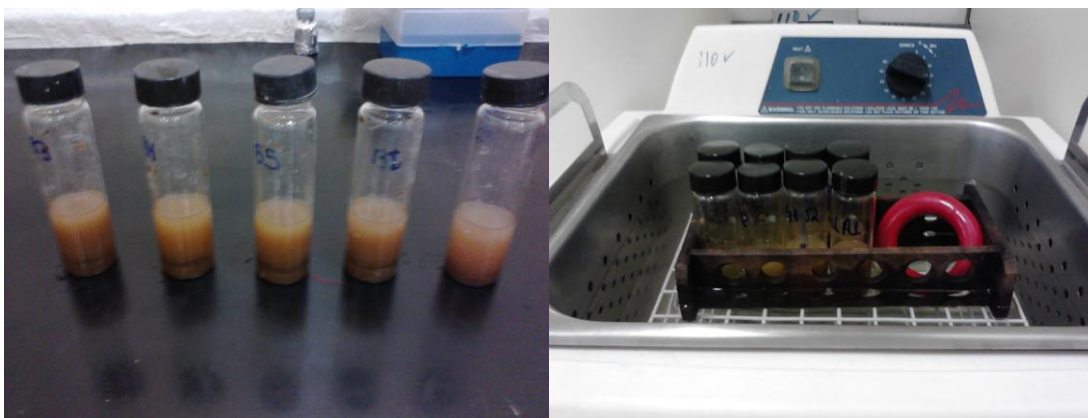


Figura 11: Etapas do processo de extração das amostras de sedimentos, etapa de sonificação.

O extrato foi mantido em repouso por 10 minutos para que houvesse a decantação do sedimento ao fundo do tubo, logo após o extrato foi transferido a tubos de plástico e então levados a um Centrifugador Excelsa 2 Fanem LTDA, por um período de 5 minutos a uma rotação de 6000 rpm para total decantação das partículas de sedimento da amostra. Este procedimento de extração foi repetido duas vezes, Figura 12.

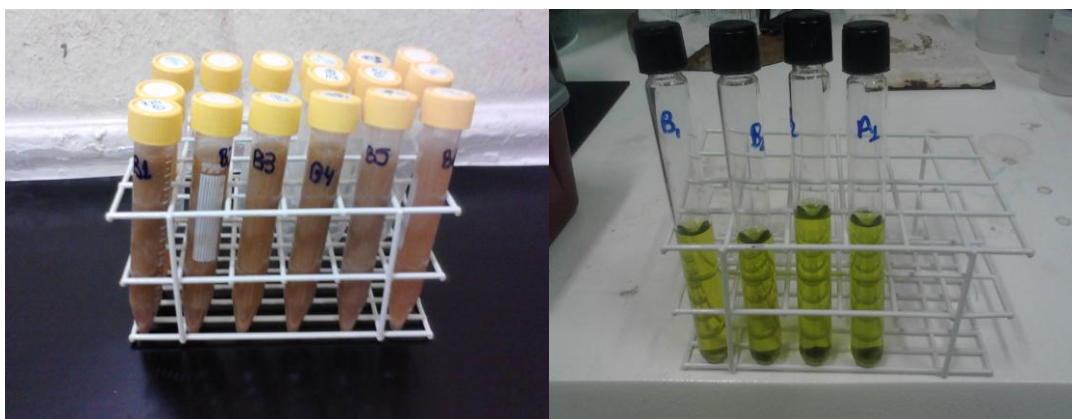


Figura 12: Extrato antes e após o processo de centrifugação.

Os extratos centrifugados foram filtrados com o auxílio seringas adaptadas com filtros de seringas, PTFE não estéril 33mm x 0,45 μ m, diretamente em balões de fundo chato e seguiram para secagem no evaporador Quimis, a temperatura de 38°C até a total secura da solução, Figura 14.

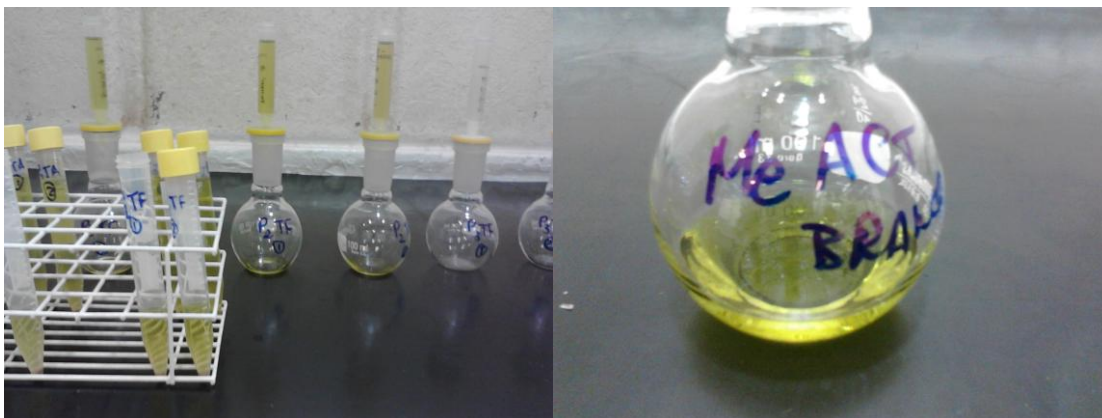


Figura 13: Filtração em filtros de seringa e armazenagem para rotaevaporação.

3.5.2- Concentração do extrato

A concentração do analito foi feita em um evaporador rotativo com aquecimento a 30°C, levemente aquecido, com rotação branda, pois, o hormônio 17 α metiltestosterona é bastante sensível a altas temperaturas. Na etapa seguinte os extratos foram ressuspensos com metanol grau cromatográfico com um volume de 3,0 mL, e então armazenados em *vials*, utilizados em amostradores automáticos em cromatógrafo, para enfim serem realizadas a detecção e quantificação em cromatógrafo líquido. As amostras foram injetadas de forma automática, à temperatura ambiente e com volume de injeção de 5 μ L.

Para a realização das análises foram utilizados solventes grau cromatográfico: metanol JT Baker (grau cromatográfico), acetonitrila (grau cromatográfico) JT Baker e acetona PA Merk, Etanol PA Merk. Para as etapas de adaptação e verificação da melhor metodologia foi utilizado o padrão sólido do hormônio 17 α metiltestosterona em solução de Metanol grau cromatográfico.

O preparo do padrão foi feito com metanol, 1,0 mg de padrão sólido e avolumado em um balão de volumétrico de 10 mL. A solução estoque resultante de 100 μ g/mL, foi armazenada em freezer com temperatura na faixa de 0°C, em frasco âmbar selado com parafilme e envolto em papel alumínio.

3.5.3- Detecção e Quantificação Analítica

O extrato já com o analito disponível e armazenado em um *vial* foi levado ao Cromatógrafo Líquido-CL com detecção UV/VIS Varian 920-LC, com sistema de injeção automático, para análise quantitativa. As condições cromatográficas foram otimizadas considerando-se critérios como sensibilidade e seletividade cromatográficas. Os parâmetros utilizados foram: teor da fase móvel (percentagem de volumes de solventes de diferentes polaridades), fluxo da fase móvel, comprimento de onda do ultravioleta, (sendo que o hormônio 17 α metiltestosterona absorve apenas no ultravioleta), e tempo de corrida.



Figura 14: Cromatógrafo líquido com detecção UV/VIS- Varian 920-LC.

Os parâmetros cromatográficos utilizados para validação e quantificação do método estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 4 – Parâmetros cromatográficos do CL-UV/VIS para a determinação de 17 α metiltestosterona em amostras de sedimentos, utilizados na validação e determinação da MT nas amostras de sedimento.

	Parâmetro
Coluna	Coluna <i>Phenomenex C18</i> , 10 cm, ID 46 μ m
Fase Móvel	Metanol/água 80/20 (v/v)
Fluxo	0,6 ml/mim
Comprimento de onda	242 nm

Após a análise cromatográfica as amostras foram quantificadas utilizando métodos de regressão linear da curva analítica dos padrões preparados em concentrações definidas, como descritas na sessão de validação da metodologia.

3.6- Identificação espectroscópica da 17 α metiltestosterona

Foram realizadas análises de identificação espectroscópica em UV/VIS Agilent 8453 para seleção do comprimento de onda ao qual a molécula melhor absorve, infravermelho no FT/IR 4100 Jasco e Ressonância Magnética Nuclear RMN (marca) para verificação da estrutura. A seleção do comprimento de onda que melhor absorve na faixa do UV foi utilizada no cromatógrafo líquido.

3.7- Estabilidade do hormônio 17 α metiltestosterona

Para estudo da estabilidade, foi realizada a análise de uma curva analítica por um período de sete dias, foram preparados padrões analíticos com concentrações de 0,25; 0,5; 0,75; 1 e 1,25 $\mu\text{g/mL}$. As análises foram realizadas em dois comprimentos de onda, 242 nm e 254 nm. O primeiro por ser o mais sensível para a técnica cromatográfica com detecção UV/VIS, usado para quantificação do hormônio, e o segundo por apresentar após um determinado período de tempo um segundo pico, crescente com o passar do tempo.

3.8- Validação da Metodologia

A validação da metodologia foi realizada seguindo os parâmetros estabelecidos pelo documento do INMETRO DOQ-CGCRE-008, a respeito de Orientação Sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. Segundo este documento, o procedimento de validação é necessário para se demonstrar que o método analítico utilizado, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida. A validação da metodologia se torna necessária, pois, o método utilizado foi adequado às condições de análise laboratoriais. Os parâmetros analisados ou figuras de método analítico foram, sensibilidade, linearidade, tendência/recuperação, limite de detecção e quantificação, seletividade e precisão/repetitividade.

3.8.1- Seletividade

Para o teste de seletividade foram realizadas 7 replicatas de uma amostra adicionada de padrão analítico para uma posterior recuperação de 0,75 µg/mL e 7 replicatas de amostras controle (sem a presença do hormônio). Esses extratos foram analisados em triplicatas. Foi feita uma análise visual dos cromatogramas, para verificação de possíveis contaminantes e também foram realizados testes estatísticos, o teste F (*Snedecor*) de homogeneidade de variâncias e o teste t (*Student*) de comparação das médias.

3.8.2- Linearidade e sensibilidade

Para estudo da linearidade foram preparadas triplicatas do padrão nas concentrações seguintes: 0,25; 0,5; 0,75; 1 e 1,25 todos em µg/mL, todos preparados com solvente metanol grau cromatográfico. Os padrões foram preparados a partir da solução estoque na concentração de 100 µg/mL. Cada padrão foi analisado em triplicata para os cálculos de linearidade regressão linear e sensibilidade.

3.8.3- Tendência / recuperação

O teste de recuperação foi estimado pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas do analito na matriz. Para esse teste foi utilizado uma amostra branco coletada onde não havia sido utilizado a 17 α metiltestosterona. Foram analisadas três concentrações, 0,25 µg/mL; 0,75 µg/mL e 1,25 µg/mL, sendo as faixas de concentração próximas ao limite de detecção, no centro da curva analítica e a máxima concentração da curva analítica. A adição do analito a matriz (*spike*), ocorreu antes da etapa de extração, nessa etapa foi adicionada uma quantidade de analito diretamente a amostra (sedimento seco) a fim de se recuperar ao final das etapas de extração a concentração pré-estabelecidas para a tendência.

3.8.4- Limite de Detecção e Quantificação

O cálculo do Limite de Quantificação e Detecção para a metodologia de extração foi feito a partir da análise dos brancos da amostra. Foram analisadas 7 replicatas de brancos da amostra e injetadas todas em triplicatas para tratamento e

cálculos dos limites. O cálculo dos limites foi realizado considerando os valores dos brancos que são inseridos na equação de regressão linear para então previsão dos valores dos limites.

3.8.5- Precisão – Repetitividade

A repetitividade foi expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados. Esse parâmetro foi determinado por meio da análise de padrões. Foram preparadas 7 replicatas de padrões das concentrações de 0,25 µg/mL, 0,75 µg/mL e 1,25 µg/mL, todos analisados em triplicatas. Com os resultados foi calculado o desvio padrão de repetitividade.

3.9- Análises das amostras de sedimentos do CTP

Realizadas as etapas de adaptação e validação da metodologia, as amostras foram analisadas conforme demonstra o organograma final descrito na Figura 14.

Para a quantificação das amostras foram feitas curvas analíticas na mesma faixa linear utilizada para o teste de linearidade. O cálculo de concentração final do analito no extrato foi feito se considerando a massa pesada de sedimento e o fator de concentração realizado, como é expresso na equação abaixo.

Onde:

$$C_{\text{hor}} = (C_{\text{ex}} \times V_{\text{rec}}) / m_{\text{sed}}$$

C_{hor} : Concentração de hormônio do sedimento

C_{ex} : Concentração do extrato obtido com os valores de intensidade dos cromatogramas inseridos na equação de regressão linear

V_{rec} : Volume em que foi concentrado o extrato em Litros

m_{sed} : Massa do sedimento pesado em quilogramas

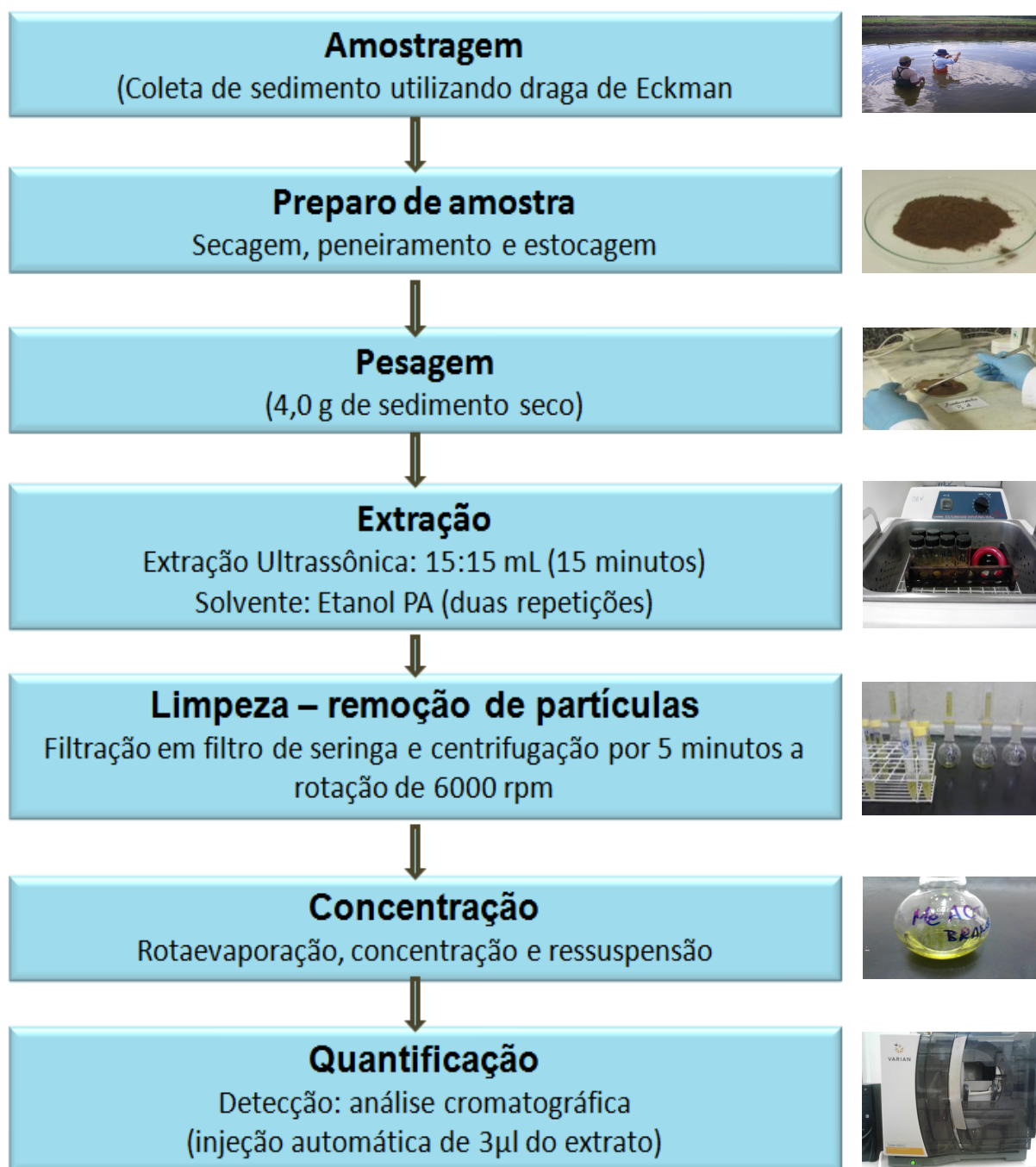


Figura 15: Principais etapas do método utilizado para a determinação de 17α-estradiol em sedimentos.

3.10 – Tratamento estatístico

Para comparação dos resultados obtidos em algumas análises foram realizados testes estatísticos. Para verificar se uns grupos de médias interdependentes são estatisticamente similares realizou-se o teste t (*Student*). O nível de significância estabelecido para as análises foi de $\alpha=0,05$, ou seja, 95%, para a realização do teste estatístico para verificação da hipótese alternativa, se houve ou não uma diferença significativa nos valores encontrados, foi necessária primeiramente realizar o teste de homogeneidade das variâncias, teste F-*Snedecor*.

Para o cálculo do teste para comparação de duas médias inicialmente é necessário realizar o teste F para verificar se as variâncias dos dados de um grupo em relação a um segundo grupo são homogêneas. O cálculo é realizado a partir da seguinte fórmula:

$$F = s_1^2/s_2^2$$

Onde:

s_1^2 = variância amostral 1

s_2^2 = variância amostral 2

Os valores encontrados no teste F, ou seja, calculados, são denominados $F_{\text{calculado}}$ e são então comparados com os valores de F_{tabelado} , que é um valor de referência que considera (n-1) graus de liberdade para cada conjunto de variância amostral.

Para o cálculo quando as variâncias são estatisticamente iguais (resultado obtido com o teste F), pode-se aplicar o teste t utilizando:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

Onde: (x_1-x_2) = a diferença das médias das duas coletas; s = desvio padrão; n= grau de liberdade.

Para o cálculo quando as variâncias não são estatisticamente iguais. Pode-se utilizar:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

Onde:

S_1 = desvio padrão do grupo amostral 1

n_1 = graus de liberdade do grupo amostral 1

S_2 = desvio padrão do grupo amostral 2

n_2 = graus de liberdade do grupo amostral 2.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização da área de estudo foi feita com a coleta de três pontos de material dragado nos tanques de piscicultura da Granja do Ipê. O número de pontos coletados e analisados para caracterização seguiram orientações da Resolução 344/2004 do CONAMA⁴⁶, para isso foram realizadas caracterizações físico-químicas (pH e CTC), caracterização física (análise granulométrica) e caracterização química (análise do composto orgânico 17 α metiltestosterona, principal objeto de estudo), como segue em discussão abaixo.

4.1- Análises física e físico-química

As características físicas, químicas e físico-químicas de um ambiente aquático refletem na composição das comunidades microbianas, bem como dos animais aquáticos. Essas análises podem ser utilizadas para propor características e especificidades dessas regiões. A análise do pH e de CTC trazem informações importantes a respeito da qualidade do sedimento relacionadas a capacidade de troca de cátions, acidez ou basicidade do mesmo, fatores que podem relacionar com a capacidade da molécula 17 α metiltestosterona, principal objeto de estudo, permanecer ou não nos sedimentos estudados. Os sedimentos por serem constituídos por diferentes substratos geoquímicos possuem alta superfície específica e com isso alta capacidade de troca de cátions em sua superfície.

4.1.1- pH

Os valores de pH encontrados para as amostras de sedimento foram na faixa de 5,0 a 6,2, o que determina uma faixa ácida para o material dragado. De acordo com a Circular nº 14 da EMBRAPA³⁸, a faixa de acidez em sedimentos de viveiros de piscicultura deve ser corrigida até atingir valores entre 7,0 e 8,0. Segundo o documento da EMBRAPA, níveis ácidos no fundo dos viveiros de aquicultura são bastante comuns, por isso é comum a necessidade de utilização de calcário para correção do pH por meio do processo de calagem^{47,48}. Ainda segundo o documento⁴⁷, é normal haver variações diárias de uma a duas unidades de pH em viveiros de piscicultura. Os níveis de pH em faixas ácidas nos sedimento podem

indicar a presença de matéria orgânica (MO) em altos graus de humificação (Cotta, 2006)²⁷. A Tabela 5 mostra os valores obtidos para as médias das triplicatas realizadas dos pontos coletados.

Tabela 5 – Resultados obtidos para valores de pH nas seis amostras durante a coleta 1 e coleta 2.

Coleta 01			Coleta 02		
Identidade	Média	Desvio Padrão	Identidade	Média	Desvio Padrão
P1TA	5,02	0,02	P1TA	5,92	0,09
P2TA	5,01	0,01	P2TA	5,95	0,03
P3TA	5,03	0,04	P3TA	6,20	0,01
P1TF	5,00	0,00	P1TF	5,97	0,02
P2TF	5,01	0,01	P2TF	6,09	0,06
P3TF	5,00	0,00	P3TF	5,93	0,01

Os resultados obtidos na coleta feita no início do período de seca, (coleta 1) demonstram que a média dos valores de pH são levemente menores em relação à segunda coleta, realizada no início do período chuvoso, onde os valores de pH das amostras foram um pouco maiores. Este fato pode estar associado a uma maior faixa de matéria orgânica no período de início da seca em relação à época da segunda coleta. Para verificação da significância desses resultados foram realizados testes estatísticos como demonstra os resultados expostos na Tabela 6.

Tabela 6 – Tratamento estatístico para valores obtidos no parâmetro pH, testes de homogeneidade (teste F) e de amostras interdependentes (teste t).

TESTE F	Dados	TESTE t	Dados
$F_{\text{calculado}}$	0,000132	$t_{\text{calculado}}$	9,20.E-10
GL	6	Graus de Liberdade	9
Intervalo de confiança	95%	Intervalo de Confiança	95%
F_{tabelado}	3,453	t_{tabelado}	1,860
$F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}} = \text{Variâncias Iguais}$		$t_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}} = \text{Aceita-se a hipótese}$	

Os resultados do teste t de *Student* para amostras independentes, mostraram que os valores obtidos para pH nas coletas 1 e 2 são estatisticamente iguais, a 95% de confiança. As pequenas diferenças podem estar associadas às diferentes condições climáticas, início de seca e início de chuva respectivamente, e ao processo de calagem⁴⁸ realizado no tanque anterior a cada coleta, posto que é

nesse processo que é feita a correção do pH do sedimento, porém os testes estatísticos mostram que essas diferenças não são significativas. Foi observado que as análises dos tanques fechado (estufa) e aberto não possuem diferenças significativas nos seus valores para esse parâmetro.

4.1.2- Capacidade de Troca Catiônica – CTC

Em geral os cátions disponíveis podem ser considerados cátions trocáveis, razão pela qual raramente esses cátions são encontrados na forma disponíveis para troca.⁴⁸ A análise da capacidade de troca catiônica permite uma avaliação do teor de metais pseudodisponíveis na amostra, bem como um teor de acidez trocável da amostra, que é representada pela troca do metal alumínio nas interfaces do sedimento por H^+ ⁴⁸.

A capacidade de troca catiônica, portanto, é a capacidade de troca de cátions pelo sedimento ou sua capacidade de reter cátions, COTTA, 2006. Os valores encontrados para acidez trocável (H^+ Al), também são usados para determinar a CTC, com a soma dos Cátions Metálicos Trocáveis (Ca^{+2} , Mg^{+2} , K^+ , Na^+). Os resultados obtidos de capacidade de troca catiônica para as amostras de sedimentos são apresentados na tabela 7.

Tabela 7 – Resultados obtidos para valores de Capacidade de Troca Catiônica CTC nas seis amostras durante a coleta 1 e coleta 2.

Coleta 01			Coleta 02		
Identidade	Média $cmol_c.kg^{-1}$	Desvio Padrão	Identidade	Média $cmol_c.kg^{-1}$	Desvio Padrão
P1TA	12,19	0,33	P1TA	9,57	1,39
P2TA	16,60	0,23	P2TA	9,49	0,78
P3TA	15,05	0,64	P3TA	9,75	0,59
P1TF	17,86	0,57	P1TF	7,15	1,70
P2TF	10,62	0,56	P2TF	7,24	1,54
P3TF	17,31	0,46	P3TF	8,18	0,96

Os valores são descritos em $cmol_c.kg^{-1}$, expressos de acordo com os valores obtidos pelas análises de acidez trocável e metais trocáveis. Os resultados evidenciaram uma alta capacidade de troca catiônica, posto que, é reportado na literatura^{48,49} que valores de CTC maiores que $5 cmol_c.kg^{-1}$ são indicativos de alta

troca de cátions nos sedimentos. As amostras coletadas em período de início de seca forneceram relações de troca catiônica maiores em comparação ao período chuvoso. Para analisar se esses valores são estatisticamente iguais foi realizado o teste t de *Student* para comparação entre as médias das duas coletas. Os resultados obtidos também não demonstraram uma diferença significativa entre as coletas, onde foram encontrados $t_{\text{calculado}} = 0,070$ menor que o $t_{\text{tabelado}} 1,860$, para um intervalo de confiança de 95%. Foi observado que na coleta 01, realizada em início de seca houveram diferenças nos valores encontrados para os pontos entre os tanques aberto e fechados, diferenças não estatísticas, o ponto P2 do tanque fechado foi o que se mostrou mais diferenciado com valores de CTC menores.

4.1.3- Análise granulométrica

Com a realização das análises granulométricas foi possível estimar as proporções de argila e silte do sedimento uma vez que são nessas porções que se encontram uma maior concentração de matéria orgânica e por consequência de moléculas orgânicas de interesse ambiental¹⁰. As análises de granulometria puderam prever a classificaram o material com relação à sua espessura. As análises granulométricas mostram que os sedimentos dos tanques do CTP possuem característica arenosa. A Tabela 8 descreve os resultados obtidos nas análises da textura das amostras de sedimentos.

Segundo a Resolução 421/2010 do CONAMA⁴⁶, a classificação granulométrica dos sedimentos é dada conforme a Tabela 10 abaixo.

Tabela 8 – Classificação granulométrica dos sedimentos de acordo com o tamanho dos poros.

Classificação	(mm)
Areia	2 a 0,062
Silte	0,062 a 0,00394
Argila	0,00394 a 0,0002

O sedimento coletado possui uma característica bastante arenosa, a areia está presente em maior quantidade, na faixa de 2 a 0,062 mm de espessura, o que o torna o sedimento muito permeável. A segunda maior porcentagem, na fração granulométrica, possui uma espessura muito fina, sendo mais impermeável e com a

característica de apresentar uma grande quantidade de nutrientes, aspectos de solos argilosos. A maior quantidade de matéria orgânica se concentra nos solos argilosos. As duas coletas mostraram valores estatisticamente iguais, o que demonstra que não houve uma variação relacionada às diferentes épocas coletadas.

Tabela 9 – Teores de areia, silte e argila em percentagem, encontrados nos sedimentos dos tanques, resultados obtidos com as análises granulométricas.

Amostra	Leitura	T °C	Leitura	T °C	% argila+silte	% silte	% areia	% argila
P1TA Coleta 1	30,0	18	21,0	17	30,0	9,0	70,0	21,0
P2TA Coleta 1	30,0	18	21,0	17	30,0	9,0	70,0	21,0
P3TA Coleta 1	29,0	18	20,0	17	29,0	9,0	71,0	20,0
P1TF Coleta 1	25,0	18	18,0	17	25,0	7,0	75,0	18,0
P2TF Coleta 1	26,0	18	20,0	17	26,0	6,0	74,0	20,0
P3TF Coleta 1	23,0	18	16,5	17	23,0	6,5	77,0	16,5
P1TA Coleta 2	29,5	19	20,5	20	29,5	9,0	70,5	20,5
P2TA Coleta 2	28,0	19	20,5	20	28,0	7,5	72,0	20,5
P3TA Coleta 2	28,5	19	22,0	20	28,5	6,5	71,5	22,0
P1TF Coleta 2	23,0	19	17,0	20	23,0	6,0	77,0	17,0
P2TF Coleta 2	23,5	19	17,5	20	23,5	6,0	76,5	17,5
P3TF Coleta 2	20,0	19	15,0	20	20,0	5,0	80,0	15,0

4.2- Otimização e adaptações do método

Os primeiros resultados obtidos na etapa de adaptação do método foram relativos à verificação da presença da MT no material dragado, bem como sua possível faixa de concentração. As primeiras análises realizadas foram conforme o procedimento descrito na Figura 9 e os parâmetros cromatográficos conforme a Tabela 3.

O cromatograma da Figura 16 (a) ilustra o cromatograma do padrão utilizado para construção da curva analítica para cálculo de recuperação da extração e na Figura 16 (b) o cromatograma do extrato e evidencia o pico da 17 α metiltestosterona no tempo de retenção em 8,92 minutos. Comprovando a sua presença no sedimento.

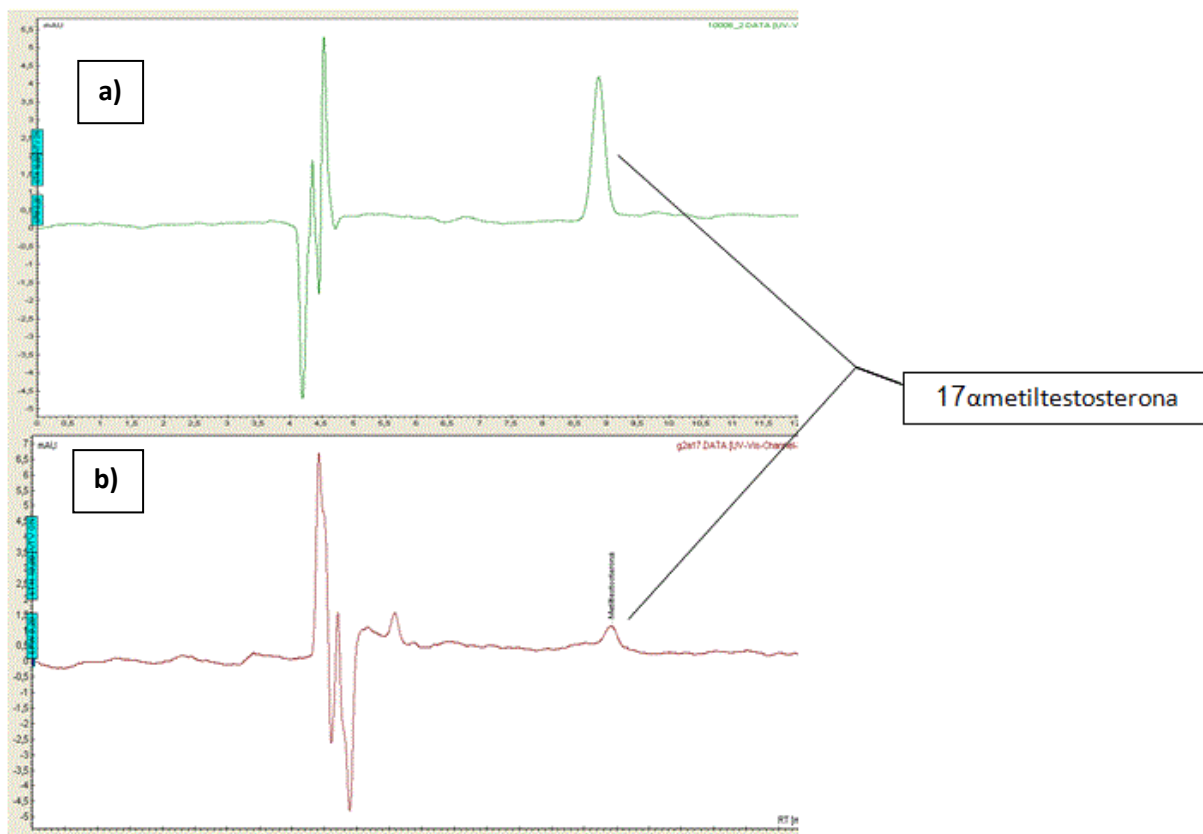


Figura 16: a) Cromatograma do padrão analítico (1,25 ug/mL) utilizado para construção da curva analítica; b) Cromatograma do extrato do sedimento contendo MT.

Os cromatogramas acima evidenciam que este método preliminar tinha potencial para uma determinação qualitativa do hormônio, porém os cálculos de recuperação do método para as amostras controle adicionada do padrão analítico, não foram satisfatórios, alcançando resultados na faixa de recuperação média de 40,25% de eficiência.

Devido a problemas técnicos com a coluna utilizada nestes testes demonstrados acima, a coluna de 15 cm foi substituída por uma de 10 cm, sendo então necessária uma nova adaptação da metodologia cromatográfica. A escolha da fase móvel foi feita seguindo a literatura⁵⁰. Foi testada a fase móvel acetonitrila/água, na proporção 65/35 (% v/v). Também foi testada fase móvel com metanol/água tamponada com pH 7,2 (tampão fosfato) 80:20 (% v/v), porém os melhores resultados obtidos foram utilizando a fase móvel metanol/água 80/20 (% v/v) sem presença do tampão.

Para a escolha do melhor comprimento de onda para a análise no cromatógrafo líquido, foram realizadas análises espectroscópicas na faixa do ultra violeta. Como resultado, foi observado que o comprimento de onda máximo para o

analito 17 α metiltestosterona dissolvido em metanol cromatográfico foi de 242 nm, como mostra o espectro de sobreposição de concentrações na faixa de. 0,1ug/mL, 0,2 ug/mL, 0,3 ug/mL, 0,4 ug/mL e 0,5 ug/mL.

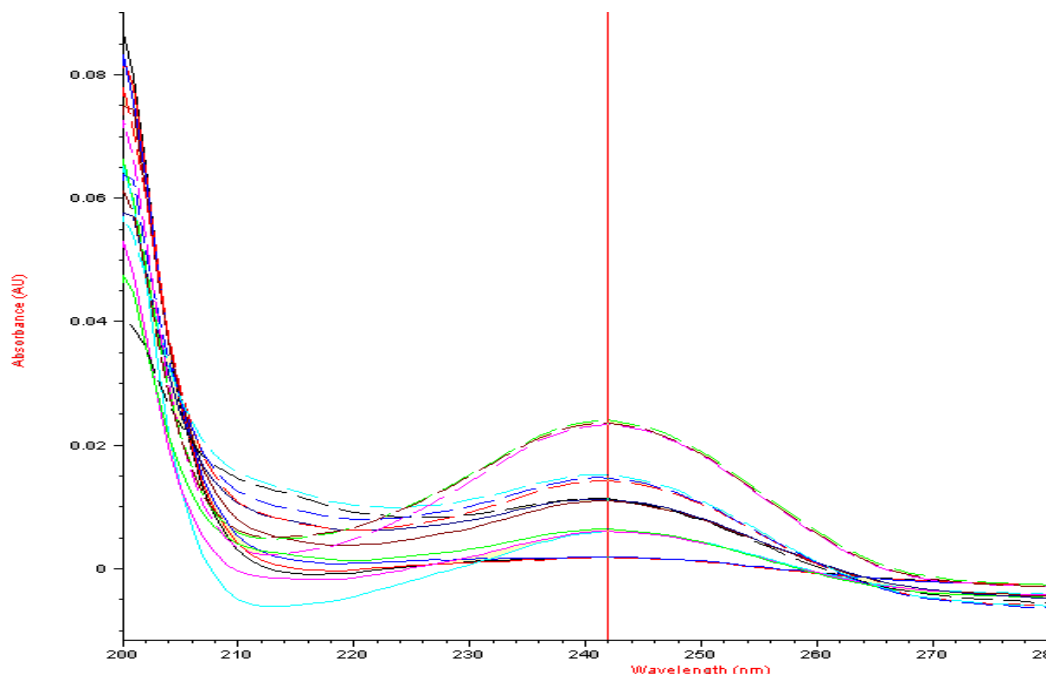


Figura 17: Espectro de UV/VIS obtido experimentalmente da 17 α metiltestosterona com concentração na faixa de. 0,1ug/mL, 0,2 ug/mL, 0,3 ug/mL, 0,4 ug/mL e 0,5 ug/mL.

Inicialmente, o padrão do hormônio foi injetado e a detecção foi feita para os comprimentos de onda descritos na literatura, 254 nm e 232 nm, porém os melhores resultados de sensibilidade do pico cromatográfico foram no comprimento de onda de 242 nm e em seguida 254 nm, com isso, a detecção foi feita nos dois comprimentos de onda, 242 nm e 254 nm já que o equipamento permite trabalhar com dois comprimentos de onda. O comprimento de onda 242 nm foi utilizado para quantificar o analito na amostra e o segundo, 254 nm para a realização de testes de estabilidade do padrão analítico.

A otimização dos parâmetros cromatográficos viabilizou o estudo do comportamento do analito na matriz da amostra bem como nas soluções preparadas. As condições de análise otimizadas foram, portanto: fluxo de 0,6 mL/min; fase móvel metanol/água 80/20 (% v/v); comprimento de onda 242 nm; tempo de corrida 3 minutos e coluna C18 *Phenomenex* 10 cm, 4,6 mm.

A troca da coluna de 15 cm para uma coluna de 10 cm teve como consequência a diminuição no tempo de análise, passando de 12 minutos para apenas 3 minutos, reduzindo também a quantidade de solventes orgânicos utilizados. O cromatograma da Figura 18 ilustra o pico da 17 α metiltestosterona (1,25 μ g/mL) em solução de metanol grau cromatográfico com os novos parâmetros.

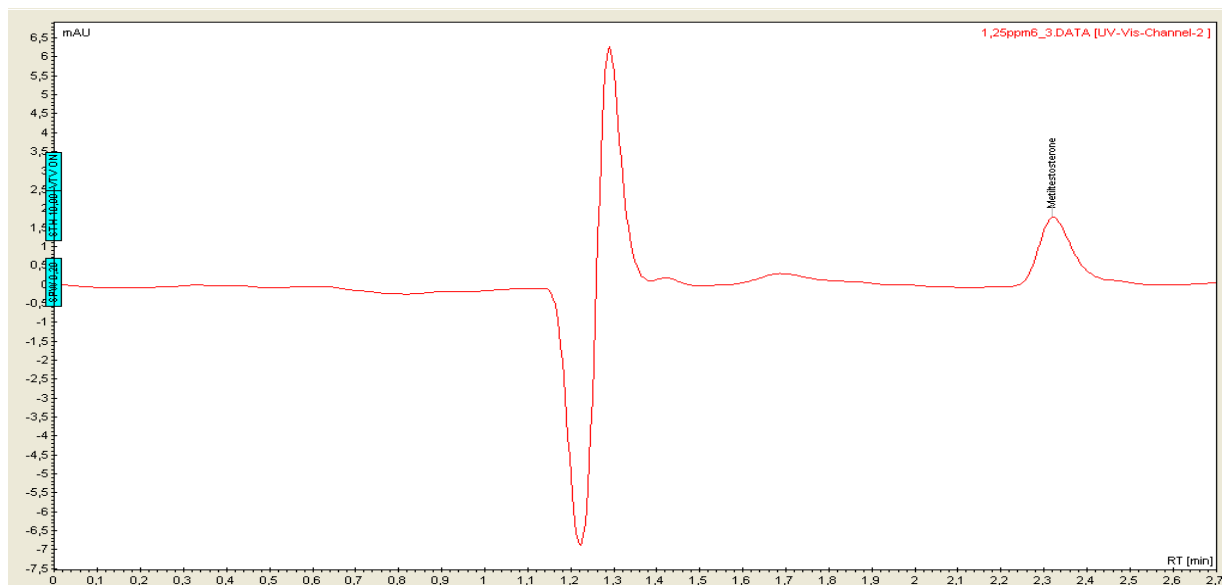


Figura 18: Cromatograma do padrão analítico do hormônio 17 α metiltestosterona em coluna C18 de 10 cm na faixa de 1,25 μ g/mL

Após se estabelecerem as metodologias, foram realizados novos testes de extração para a quantificação do hormônio. Os procedimentos analíticos utilizados para escolha do método seguiram as orientações da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, do inglês *United States Environmental Protection Agency*). As metodologias que mostraram melhores resultados foram as propostas por Petrovic (Metodologia 2) e Falone (Metodologia 1), como descreve a Tabela 10.

Tabela 10 – Valores médios de concentração recuperada nos teste de extração, que foram realizadas com as metodologia 1 e 2.

	CONCENTRAÇÃO (média triplicata µg/mL)	Recuperação (média triplicata µg/mL)
Metodologia 1	1,926	96,32
Metodologia 2	1,492	74,60
	CONCENTRAÇÃO (média triplicata) (mg/Kg)	
Amostra tanque (Mt. 1)	0,73	-
Amostra tanque (Mt. 2)	0,68	-

As duas metodologias utilizam extração ultrassônica, porém o que as diferencia é o solvente de extração. Etanol é o solvente utilizado na metodologia 1 e na metodologia 2 a amostra é extraída com a mistura metanol/acetona (1:1). A metodologia 2 possui uma etapa de *clean-up* com SPE em C18, etapa que não é realizada no outro procedimento estudado. Nas duas metodologias foram feitas adaptações no procedimento original para as análises.

O processo de escolha da melhor metodologia foi realizado com a análise de triplicatas das amostras controle, amostras sem a exposição ao hormônio e adicionadas do padrão analítico, a fortificação foi realizada para uma recuperação de 2,0 µg/mL no extrato analisado. O mesmo procedimento foi repetido duas vezes em dias diferentes para confirmação dos resultados. Observou-se que, os níveis de recuperação para a metodologia 1 foram superiores à metodologia 2. A Figura 19 ilustra os cromatogramas das duas extrações obtidas na mesma faixa de concentração. As recuperações evidenciam, portanto, uma melhor recuperação para o metodologia 1.

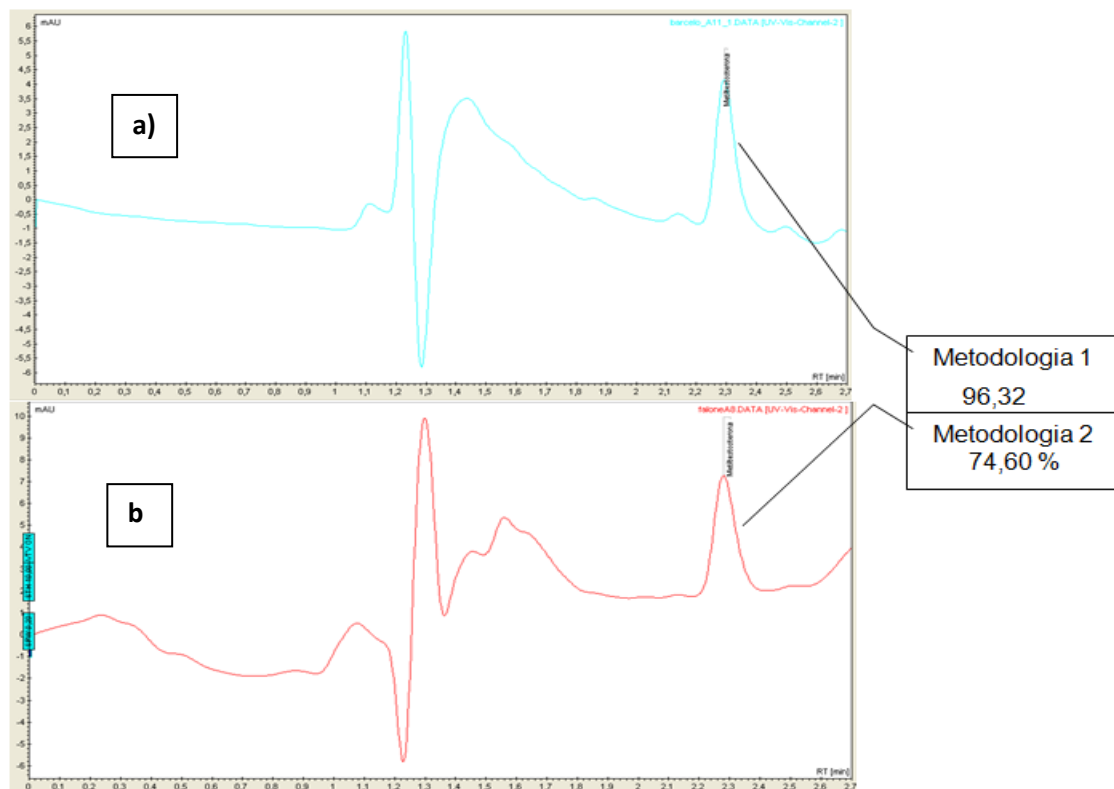


Figura 19: Cromatograma de extratos das análises realizadas conforme os métodos 1 (a) e método 2 (b).

Para a aplicação nas determinações analíticas, foram feitas algumas adaptações na metodologia 1, originalmente proposta por Falone. A massa utilizada foi reduzida de 20,0 g para 4,0 g de amostra. Essa modificação se deu porque foi verificado que uma menor massa apresentava menores quantidades de interferentes. Como consequência, o volume de solvente extrator também foi reduzido de 20,0 mL para 13,0 mL o que reduz a utilização de solventes no procedimento de extração.

A etapa de filtração foi realizada com auxílio de filtro de seringa específico para solventes orgânicos, pois o sedimento apresenta partículas muito finas, e durante a utilização de papel quantitativo foi observada a passagem de material particulado. A ressuspensão das amostras foi feita com metanol grau cromatográfico.

Considerando todos os testes realizados, a melhor metodologia obtida experimentalmente foi a metodologia 1, conforme mostra o gráfico na Figura 20, esta metodologia obteve maiores fatores de recuperação além de ter sido mais prática, por não ser necessário realizar extração em fase sólida, que requer materiais mais

dispendiosos e um tempo maior de análise. É uma metodologia que se destaca também por não utilizar solventes tão tóxicos, o etanol solvente da extração é relativamente mais seguro de se trabalhar do que a mistura metanol/acetona.

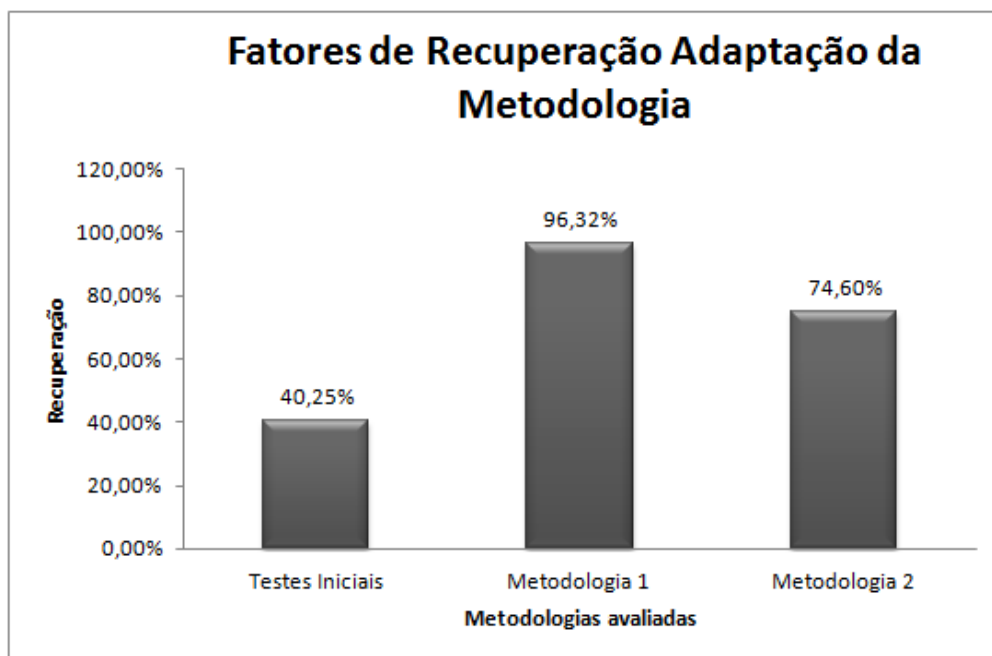


Figura 20: Percentagens de recuperação para as metodologias testadas para extração da MT em sedimento.

4.3- Identificação espectroscópica

Para a identificação espectroscópica da 17 α -metiltestosterona, foram obtidos espectros de Infravermelho e de Ressonância Magnética Nuclear, com o objetivo do estudo da estrutura molecular do analito com a de um posterior estudo de degradação do composto e suas possíveis modificações estruturais. O espectro de infravermelho foi realizado utilizando um FT/IR com ATR, e é apresentado na Figura 21.

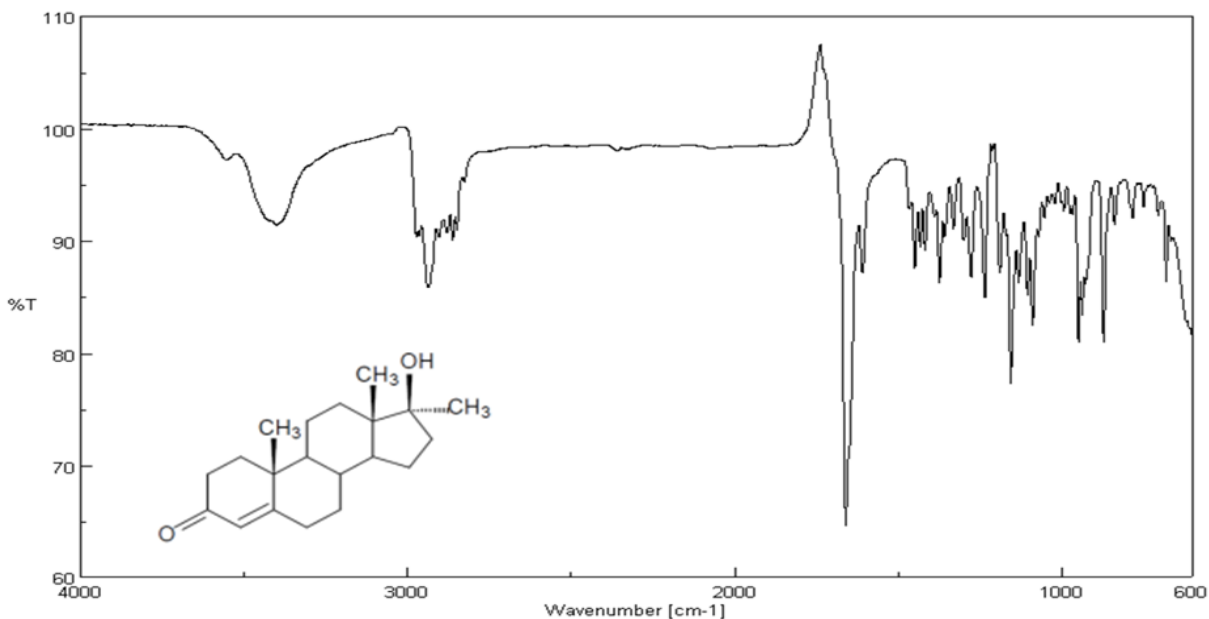


Figura 21: Espectro de Infravermelho obtido experimentalmente da 17ametiltestosterona realizado com o padrão sólido.

O espectro no infravermelho do hormônio, realizado com o hormônio sólido, demonstra as principais características das funções orgânicas presentes na molécula. O pico na faixa de 1660 cm^{-1} é relacionado às carbonila presente na molécula e a banda bem característica na faixa de 3400 cm^{-1} é característica do grupo hidroxila da molécula. Essas observações permitem prever pequenas alterações na estrutura da molécula como, por exemplo, a perda da carbonila, por um processo de aromatase, que é a transformação do hormônio andrógeno em estrógeno, ou seja, a formação de um de seus metabólitos.

Como as técnicas de infravermelho são insuficientes para prever a estrutura completa de uma molécula, foram realizados experimentos de Ressonância Magnética Nuclear, os espectros de RMN que possibilitou um estudo mais aprofundado da estrutura molecular do analito. Foram obtidos espectros de RMN de carbono e hidrogênio. Realizados em um equipamento de 300 MHz, como mostra as Figuras 22 e 23.

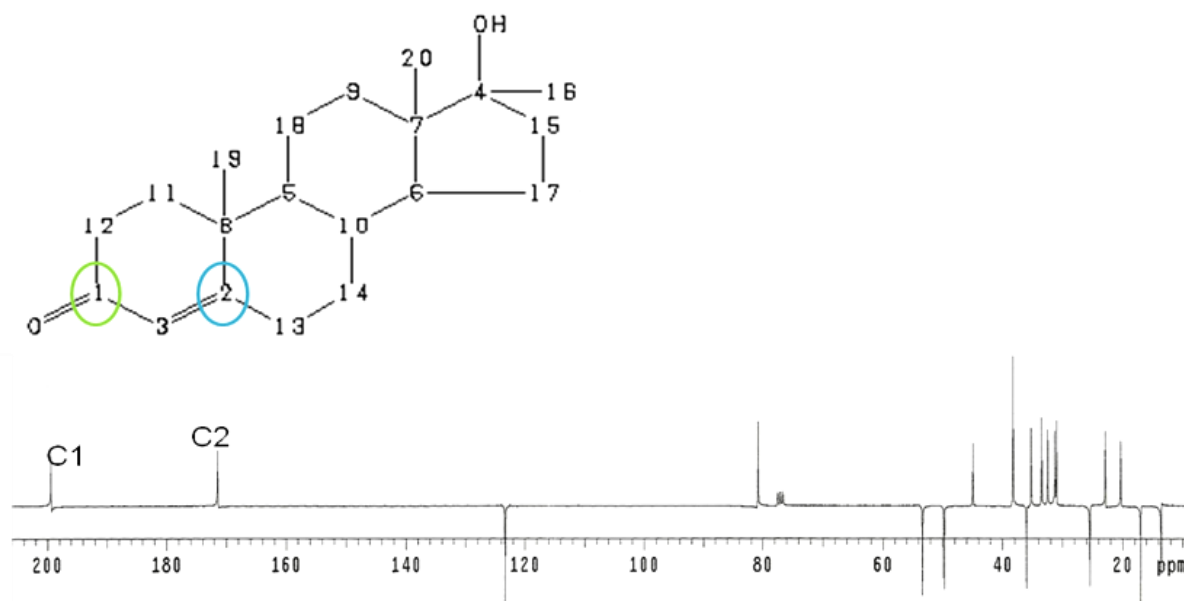


Figura 22: Espectro de RMN de carbono obtido experimentalmente da 17 α metiltestosterona.

O espectro de carbono acima, evidencia principalmente os carbonos ligados à hidroxila, que corresponde ao carbono 4 localizado em aproximadamente 81ppm, e os carbonos 1 e 2, que estão ligados mais deslocados devido a insaturação na carbonila para o carbono 1 e para o carbono 2 para a ligação C=C entre os carbonos 3 e 2.

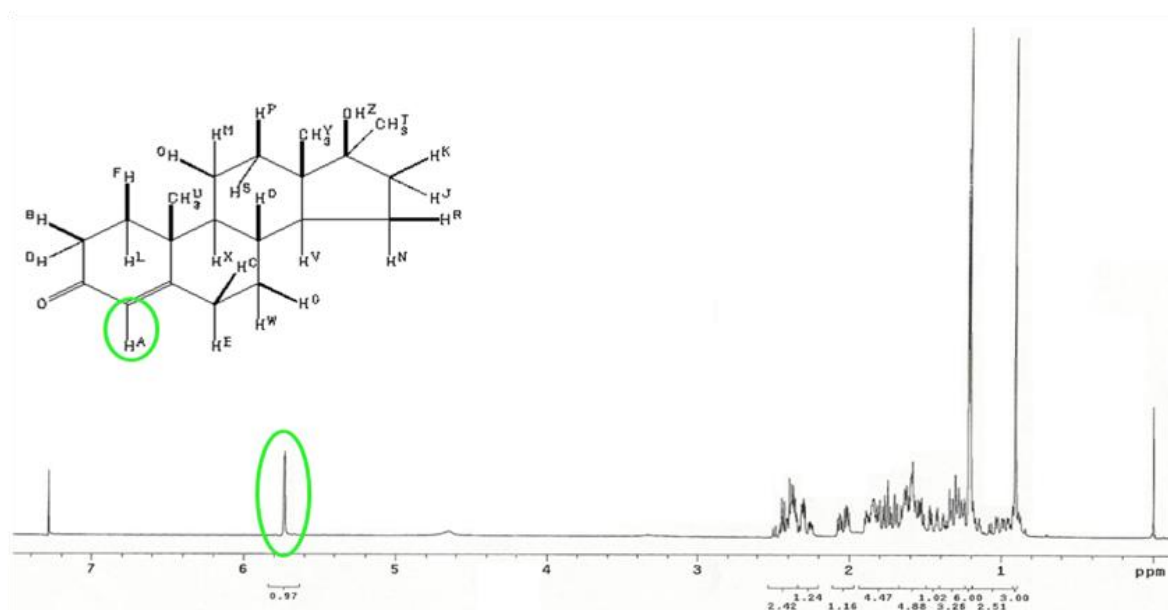


Figura 23: Espectro de RMN de Hidrogênio obtido experimentalmente da 17 α metiltestosterona.

Os espectros de RMN trouxeram informações importantes a respeito da estrutura molecular da 17 α metiltestosterona. Em um estudo feito por Yamada e colaboradores em 2007, foram demonstradas as estruturas moleculares propostas dos metabólitos da 17 α metiltestosterona e mestanolona. Conforme ilustra a Figura 24, estes metabólitos perdem suas carbonilas e há a formação de outros grupos hidroxilas nas estruturas dos metabólitos sugeridos. Uma proposta de verificação da presença ou não desses metabólitos seria a análise por RMN, pois seria facilmente verificada a perda da carbonila do hormônio.

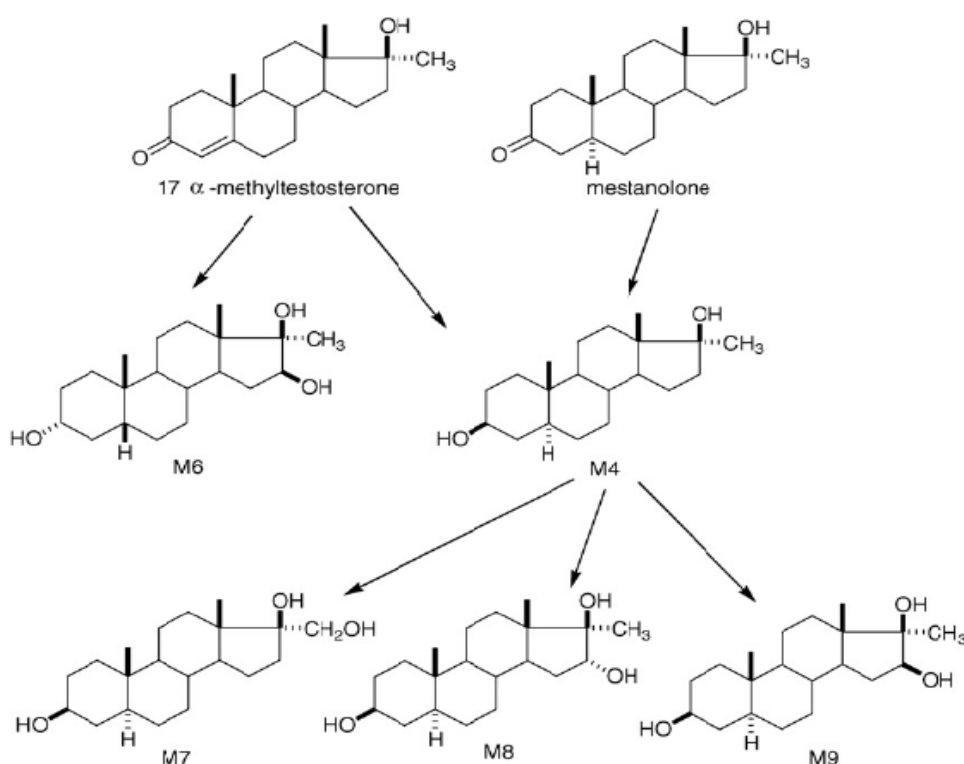


Figura 24: Metabólitos do hormônio 17 α metiltestosterona (Adaptado Yamada et al, (2007))

4.4 - Estabilidade de padrão analítico da 17 α metiltestosterona e do analito disponível nas amostras

O hormônio 17 α metiltestosterona é muito instável, sendo facilmente degradado à exposição à luz e altas temperaturas.^{51,52} A fim de se verificar a estabilidade dos padrões analíticos e sua possível degradação foram realizados testes de estabilidade, conforme descrito nos materiais e métodos. O objetivo desses testes foi verificar a possível formação de um composto de degradação e avaliar o pico do hormônio nos comprimentos de onda de 242 nm e 254 nm.

Os resultados para os dois comprimentos de onda demonstraram que, a partir do terceiro dia de leitura, foi observado nos padrões à formação de um segundo pico no cromatograma, essa observação foi bastante perceptível para os cromatogramas no comprimento de onda 254 nm.

As análises mostraram que, para o comprimento de onda 242 nm a formação desse pico foi menor. A observação das alturas dos picos da curva analítica por um período de 7 dias consecutivos mostrou que a altura do pico no tempo de retenção de 10,36 min a partir do terceiro dia sofria aumento em sua área. Para realização desse teste foram utilizadas as condições cromatográficas expressas na Tabela 4. A concentração que foi utilizada como parâmetro para as comparações das áreas foi a de 0,75 µg/mL, que corresponde à concentração no meio da curva analítica utilizada na validação da metodologia.

Tabela 11 – Taxa de crescimento do pico em 10,36min, observado na Figura 25 (a), durante o período de uma semana.

Dia de análise	taxa de crescimentos do segundo pico
	%
Dia 0	-
Dia 3	5,55
Dia 5	16,64
Dia 7	44,81

Os cromatogramas dos padrões analisados a partir do terceiro dia de análise são demonstrados na Figura 25. Esses cromatogramas são da mesma amostra, apenas realizados em dias diferentes, o que comprova que há a formação de um composto degradado, provavelmente fruto da degradação do analito após um período de tempo, mesmo mantido em freezer e sobre proteção de luminosidade. Esses testes foram repetidos por três vezes para verificar se os resultados se repetiam.

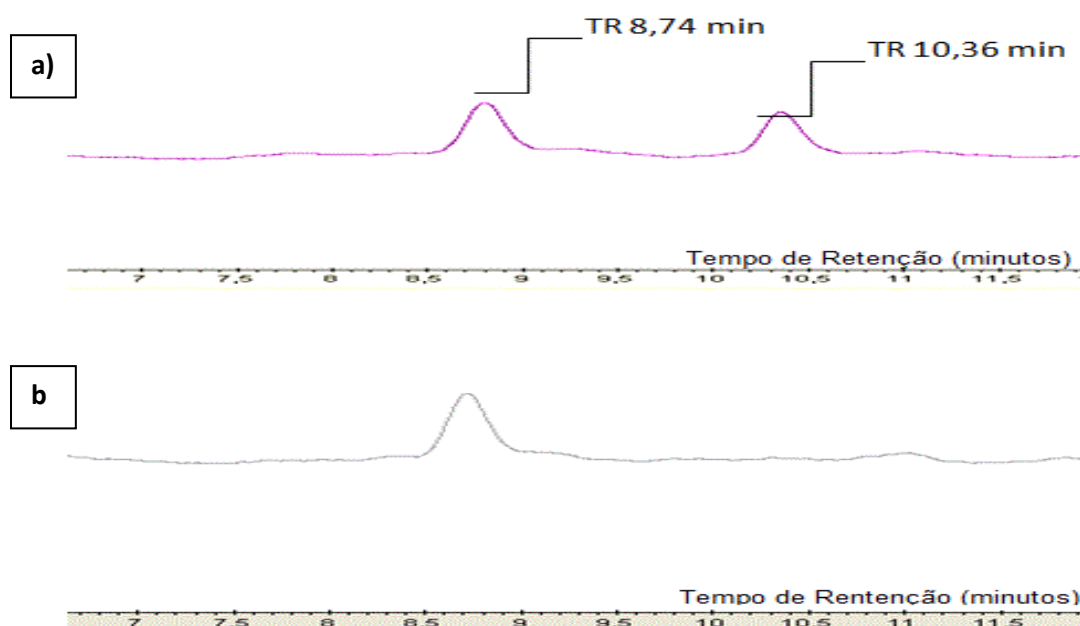


Figura 25: Cromatogramas do padrão da MT (a) uma semana após o preparo, acondicionado em freezer e (b) preparado no mesmo dia de análise.

Estudo realizado por Amaral (2012) descreve a degradação eletroquímica da MT, onde foi observado maiores taxas de degradação eletroquímica do hormônio em pH ácido, na faixa de 3, e temperatura aproximadamente 25°C. Esse trabalho mostra a importância desses estudos de degradação para fins de descontaminação de ambientes muito contaminados com o hormônio. Porém, é interessante também o estudo da degradação do hormônio para estabelecimento de metodologias analíticas e procedimentos rotineiros de análises, pois essas informações irão permitir ao analista o conhecimento das condições ideais de análise e prevenir resultados não confiáveis.

4.5- Validação da Metodologia

Para validação da metodologia utilizada neste trabalho, os ensaios foram feitos com dois tipos de matriz, sedimento controle (sedimento branco) – sem a presença do hormônio – e sedimento tratado com o hormônio – adicionado do hormônio. Para cálculo dos parâmetros de validação foram utilizadas as áreas dos picos obtidos nos cromatogramas. A metodologia foi validada seguindo os critérios da Norma de Validação de Métodos de Ensaio Químicos do INMETRO³⁸. Para os testes foram utilizados os padrões analíticos de concentrações iguais a 0,250 µg/mL;

0,500 µg/mL; 0,750 µg/mL; 0,100 µg/mL e 1,250µg/mL. As figuras de mérito investigadas foram seletividade, linearidade, sensibilidade, recuperação, limite de detecção e quantificação e precisão.

4.5.1- Seletividade

Para avaliação da seletividade, foram analisados extratos brancos (sem a presença do hormônio) e extratos fortificados com o hormônio. Nos extratos brancos não foram verificados picos de compostos no tempo de retenção do hormônio, apenas sinais característicos do solvente utilizado. Esses cromatogramas dos extratos de amostras que não continham o hormônio foram comparados aos cromatogramas de amostras de tanques onde é feito a aplicação do hormônio (Figura 26).

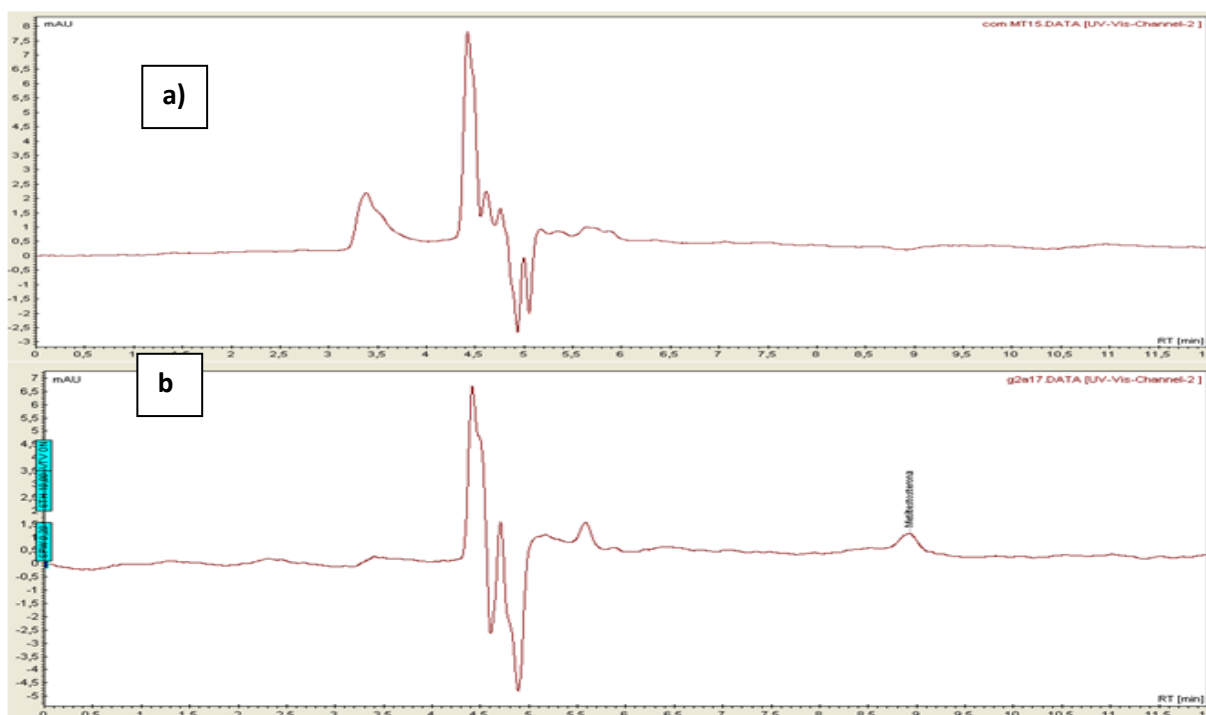


Figura 26: Cromatograma (a) do extrato do ponto controle coletado, sem a presença de MT (ponto controle). Cromatograma (b) extrato do ponto controle fortificado com MT.

De acordo com a figura acima, pode-se observar que não houve co-eluição de interferentes com analitos alvos pelo método aplicado. Outra forma de verificação da seletividade é a realização dos testes F de homogeneidade de variâncias e teste t comparação de médias interdependentes. Os resultados obtidos nos ensaios foram obtidos utilizando n=6 e 95% de confiança, conforme descrito no item 3.8.

Tabela 12 – Dados para o teste de seletividade (teste F, n=6). Adição de padrão na matriz de sedimento e sem matriz. Tabela com os resultados dos valores calculados para o nível de concentração 0,750 µg/mL. Considerando $F_{\text{tabelado}} = 4,28$ e $t_{\text{tabelado}} = 1,812$.

Concentração (µg/mL)	Matriz com analito	Sem matriz	F_{calculado}	T_{calculado}
0,750	0,198	0,199	1,640	0,730

Os valores de $F_{\text{calculado}}$ foram comparados com o valor $F_{\text{tabelado}} = 4,28$ (6 graus de liberdade e 95% de confiança), e foi observado que o valor calculado é menor que o valor tabelado, assim, estatisticamente a matriz não interfere na precisão das medidas para a análise do hormônio. Do mesmo modo, os resultados do teste t (*Student*) foram comparados ao valor de $t_{\text{tabelado}} = 1,812$ e foi observado que o valor calculado é menor que o valor tabelado, o que significa que a matriz utilizada no ensaio não afeta os ensaios para quantificação do hormônio.

4.5.2- Linearidade e sensibilidade

A linearidade da curva analítica foi estudada para verificar se o método analítico produz resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras. Para isso, foram analisados os padrões analíticos preparados em solvente metanol, grau cromatográfico, na faixa de 0,250 µg/mL a 1,250µg/mL.

A figura 27 mostra uma curva analítica típica que foi utilizada para obtenção da equação da reta para o hormônio, que apresentou coeficientes de correlação (r^2) superiores a 0,99.

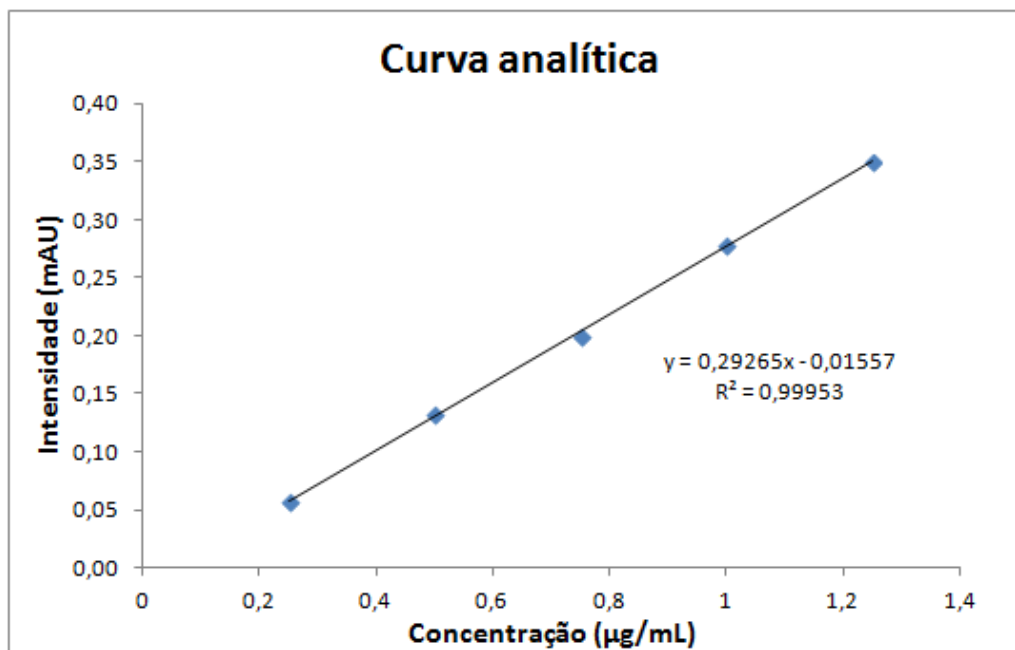


Figura 27: Curva analítica para expressar a linearidade do método.

4.5.3- Limite de Detecção e Quantificação

Para o cálculo do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram utilizados os valores do branco da amostra. Foram analisadas 7 replicatas, feitas em triplicata cada uma. Os cálculos foram feitos seguindo as fórmulas: LD= média dos valores dos brancos + 5x desvio padrão dos brancos; LQ= média dos valores dos brancos + 10x desvio padrão. Os valores obtidos para o LD e o LQ são mostrados na Tabela 13. Pode-se observar que os resultados obtidos são bons, satisfatórios para as análises a serem realizadas nas amostras de sedimentos.

Tabela 13 – Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos para a metodologia de extração e quantificação do hormônio 17 α metiltestosterona.

Hormônio	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
17 α metiltestosterona	0,125	0,184

4.5.4 – Tendência/recuperação

Os testes de recuperação foram feitos baseados na adição de uma quantidade do padrão na amostra. O padrão foi adicionado às amostras em três níveis de concentrações, 0,25µg/mL 0,75µg/mL e 1,25µg/mL. A recuperação foi

calculada seguindo a equação descrita no item 2.8.3. A Tabela 14 apresenta as recuperações obtidas para a extração dos sedimentos controles. Pode-se observar que as faixas de recuperação encontradas foram muito boas, sendo que os valores encontrados estão acima de 90% de recuperação, valores muito bons para amostras de sedimentos.

Tabela 14 – Percentagem de recuperação obtida para extração dos sedimentos controles fortificados com padrão para recuperação nos três níveis de concentração, 0,25µg/mL, 0,75µg/mL e 1,25µg/mL

Níveis de Concentração	Desvio Padrão	Concentração (µg/mL)	Recuperação (%)
0,25	0,005	0,248	99,19
0,75	0,007	0,727	96,95
1,25	0,024	1,148	91,87

Os valores médios obtidos de recuperação obtidos foram superiores a 90% para os três níveis de concentração estudados, o que comprova a eficiência da metodologia para extração e quantificação do hormônio nas amostras de sedimento.

4.5.5- Precisão (repetitividade) e exatidão

Para o teste de precisão foram avaliados os resultados de repetitividade, expressa através da precisão intermediária, onde foram utilizados os valores de desvio padrão e o coeficiente de variação para expressar esses resultados. Os valores de áreas obtidas para os padrões de 0,25 (µg/mL), 0,75 (µg/mL) e 1,25 (µg/mL) possuem precisão e exatidão adequados (Tabela 15). O desvio padrão relativo (variância) entre as triplicatas apresentou valores inferiores a 10%, indicando que as medições da área das amostras extraídas nas três faixas de concentração possuem precisão adequada, ou seja, é repetitiva.

Tabela 15 – Precisão estimada em valores de Desvio Padrão e CV.

Concentração verdadeira (ug/mL)	Concentração encontrada (ug/mL)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
0,250	0,248	0,005	1,853
0,750	0,727	0,007	0,914
1,250	1,148	0,024	2,076

A exatidão do método foi expressa em termos do coeficiente de variação (CV). Onde foram obtidos valores de 1,853%; 0,914% e 2,076% para as concentrações 0,25; 0,75 e 1,25 µg/mL respectivamente. Esses demonstram que o método proposto é exato, sendo que os valores de Coeficientes de Variação não se mostraram muito altos, e considerando que para amostras ambientais a níveis traços se consideram valores de CV até 20%⁴⁶.

4.6 - Análises das amostras de sedimentos do CTP

A legislação brasileira⁵³ que regula sobre padrões de potabilidade de água não cita teores máximos e mínimos nem a presença do hormônio 17ametiltestosterona, nem mesmo a legislação que regula sobre padrões da qualidade de sedimentos de água doce⁴⁶.

Em razão dos sedimentos aquáticos possuírem a característica de deposição e acumulação de contaminantes em seu interior, característica que os torna um potencial latente de degradação continuada, mesmo que não sejam encontradas concentrações previstas na legislação vigente da qualidade da água desses contaminantes na coluna d'água e sua biota⁵⁴, é interessante analisar o teor do hormônio 17ametiltestosterona em sedimentos de piscicultura.

As análises realizadas foram as dos sedimentos coletadas nos tanques do Centro de Tecnologia em Piscicultura, foram as mesmas amostras às quais foram feitas as análises de pH, Capacidade de Troca Catiônica e granulométrica. Os sedimentos foram analisados conforme a metodologia adaptada e validada seguindo os parâmetros descritos pela literatura^{3,31,32,33,34}.

Os resultados obtidos para quantificação do hormônio foram obtidos utilizando as seguintes equações de regressão linear:

$$\text{Coleta 01: } y = 0,2894x - 0,0105$$

$$\text{Coleta 02: } y = 0,3019x - 0,0118$$

Onde os valores das áreas obtidas nos cromatogramas foram substituídos por y na equação, para que as concentrações de MT fossem encontradas em x e expressos em µg/mL.

A concentração de MT nos sedimentos foram expressos em massa de MT (μg) por massa de sedimento (mg) para os cálculos foram utilizadas as concentrações dos extratos.

Na Figura 28 é ilustrado um cromatograma de uma das amostras dos tanques de piscicultura, onde se verifica a presença do hormônio 17 α -metiltestosterona.

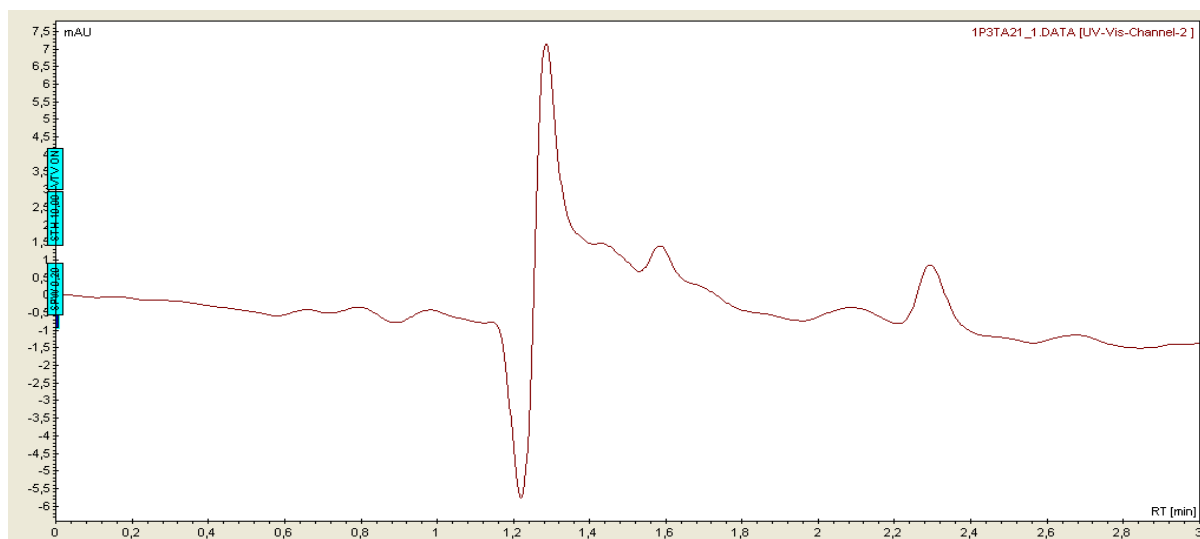


Figura 28: Cromatograma da amostra P3TA obtido no LC Varian 920 UV/VIS.

Os resultados das análises estão descritos nos gráficos representados nas Figuras 29 e 30, que mostram as concentrações da MT nas duas coletas realizadas.

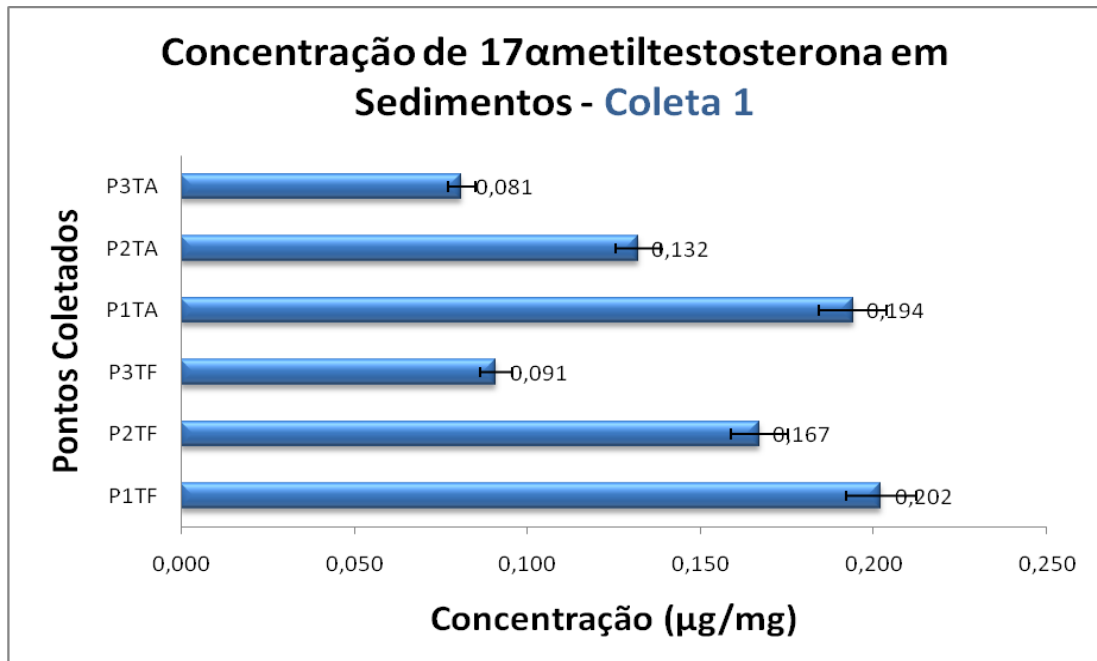


Figura 29: Concentração de MT nos sedimentos coletados nos tanques de piscicultura do CTP (Coleta 1).

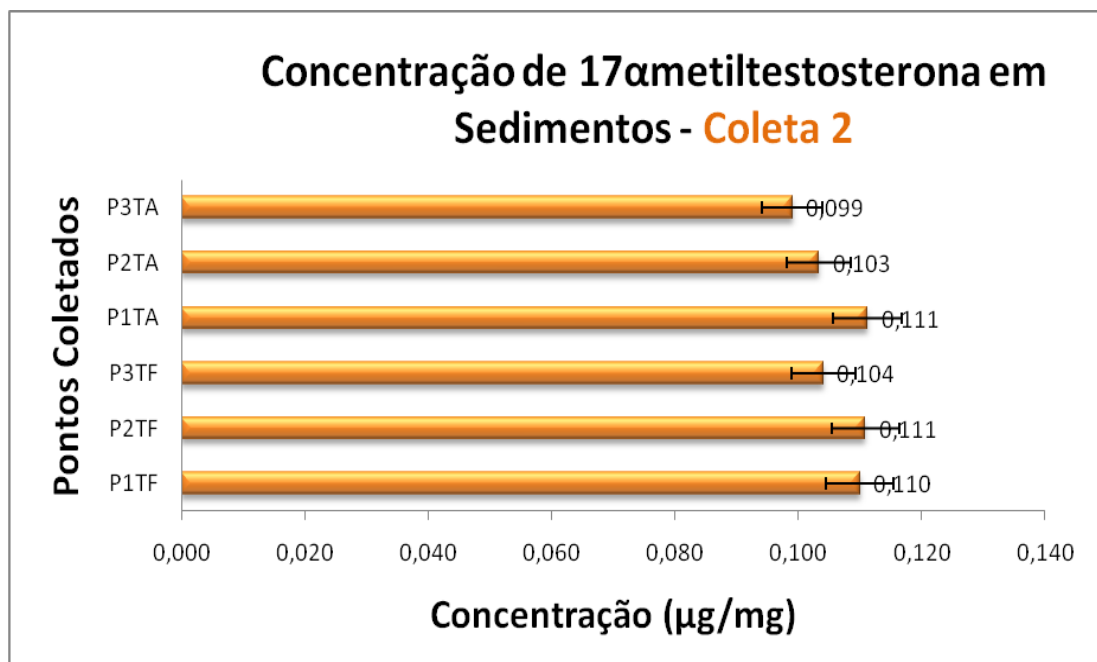


Figura 30: Concentração de MT nos sedimentos coletados nos tanques de piscicultura do CTP (Coleta 2).

Os resultados das análises mostraram que há uma concentração do hormônio nos sedimentos e que o nível de concentração no material dradago nos tanques foi em média de 0,126 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de MT nos sedimentos. Considerando as duas coletas

realizadas em períodos distintos não se podem perceber diferenças estatisticamente significativas, para isso foram realizados os testes F e teste *t Student*.

Para a comparação entre os pontos de coleta é possível observar que as maiores taxas de hormônio estão em geral localizadas nos pontos P1, ou seja, localizados no início dos tanques de reprodução, como mostra a Figura 7, e as menores taxas de hormônio são localizadas no Ponto P3, ponto mais próximo às saídas de água do tanque.

A deposição do hormônio no sedimento se dá principalmente pelas características adsortivas desse material. A faixa de 0,126 mg em cada kg de sedimento do tanque chega a ser alta levando-se em consideração que, toda a fração desse hormônio encontrado é oriundo do que foi administrado na ração dos peixes, sendo que foi avaliado o sedimento do tanque em que nunca foi administrado o hormônio e não recebe efluentes dos tanques de piscicultura. Nesse sedimento não foi verificado a presença de MT. A Figura 31 mostra que não houve a verificação do pico do hormônio em 2,3 minutos.

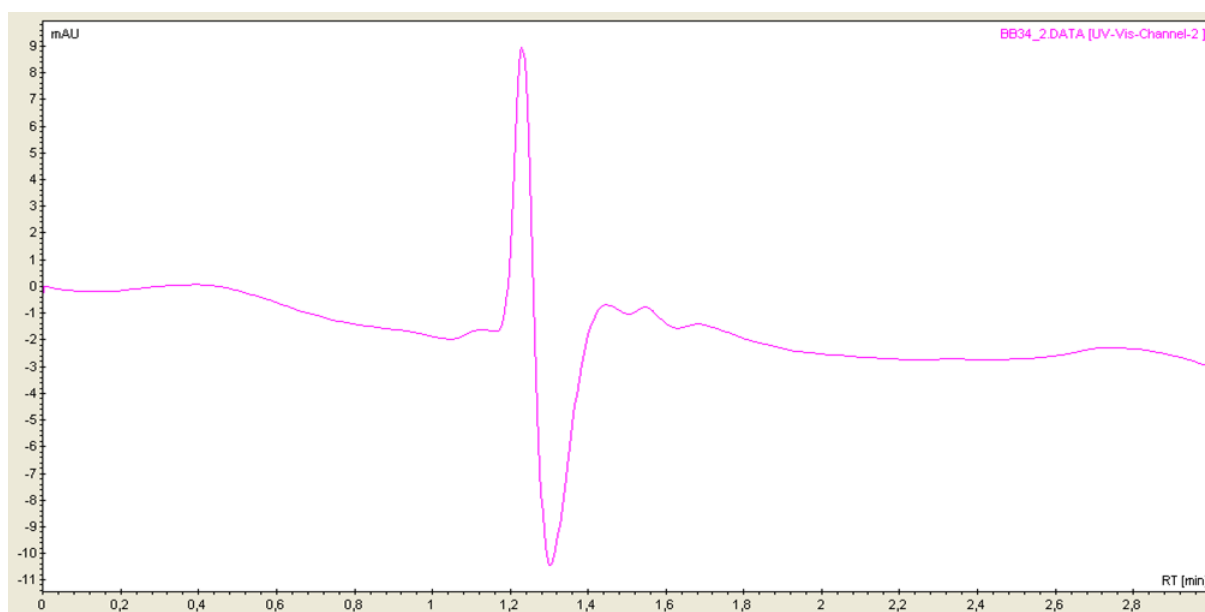


Figura 31: Cromatograma de sedimento dos tanques que nunca haviam sido manipulados MT, obtido no LC Varian 920 UV/VIS.

Green e Teichert-Coddington (2007) em seu estudo ressaltam que, grande parte do hormônio administrado nos tanques de masculinização fica retida no sedimento e que outra grande parte é degradada por meio de fotodegradação.

Kubitza (2009)⁵¹ relata que 95% da MT consumida nos tanques de produção de alevinos são eliminadas nas fezes dos peixes. E que esse hormônio então se deposita nos sedimentos e matéria orgânica.

No estudo realizado por Falone (2007)³, em análise de tanques de piscicultura localizados no município de Socorro-SP, também foi observada uma deposição do hormônio nos sedimentos. As faixas de concentração encontradas em seu trabalho foram de 0,10 a 0,20 µg/mg de MT nos sedimentos. Nesse trabalho foram analisados também reservatórios onde não era administrado o hormônio, porém recebia efluentes de tanques onde era feita a aplicação do hormônio. Foi observada também uma deposição da MT nesses tanques.

Todos esses resultados comprovam o fato da MT se depositar nos sedimentos e a possibilidade de haver um transporte deste pelos efluentes dos tanques de piscicultura, o que comprova a necessidade de bacias de tratamento dos efluentes de locais onde é administrado o hormônio.

Um estudo feito por Amaral (2012)⁵⁵ sobre a degradação eletroquímica do hormônio foi abordado um sistema de tratamento dos efluentes de sistemas de piscicultura onde são administrados a MT, e com isso é proposto um sistema de degradação eletroquímica do hormônio nesses efluentes. Um projeto que pode vir a minimizar as concentrações do hormônio nos sedimentos e com isso diminuir os possíveis efeitos adversos que ela venha a causar no sistema aquático ou até mesmo ao ser humano.

CONCLUSÕES

As amostras coletadas nas duas estações do ano (sendo a primeira coleta realizada no início de período seco e a segunda no início do período chuvoso) foram utilizadas para realização das análises físicas, físico-químicas, químicas e para determinação de MT, seco e acondicionado.

Com a realização das análises físico-químicas foi verificado que o pH dos tanques se encontravam na faixa de 5 a 6. Valores um pouco baixos para viveiros de piscicultura, porém a literatura descreve que certas variações no pH em tanques de piscicultura são consideradas normais. Os resultados de Capacidade de Troca Catiônica evidenciaram que há uma grande troca nesses sedimentos, podendo ser caracterizada por grande teor de matéria orgânica presente. O sedimento foi caracterizado como arenoso (cerca de 70%) a segunda maior proporção foi de argila (cerca de 26%), sendo que é nessa faixa do sedimento que pode haver a deposição de compostos orgânicos bem como alguns metais na superfície.

Para a quantificação do hormônio o método foi adaptado de acordo com as condições do laboratório e de análise. A detecção e quantificação foram feitas por cromatografia líquida com detecção de UV/VIS e os parâmetros cromatográficos também foram definidos de forma a obterem bons resultados de seletividade.

A metodologia de extração foi validada seguindo os critérios de validação do documento para validação de ensaios analíticos do INMETRO. Os resultados obtidos para as figuras de mérito na validação foram satisfatórios, sendo a metodologia adequada para determinação de MT. O método se mostrou de simples execução e com bons limites de detecção e quantificação para as amostras estudadas, não sendo necessário aplicar técnicas de adição padrão.

Os resultados das análises das amostras reais de tanques mostraram que há uma deposição do hormônio nos tanques de piscicultura onde é administrado o hormônio. A MT encontrada é oriunda das aplicações na ração, uma vez que as análises de sedimentos de tanques em que não havia sido administrado o hormônio não evidenciaram a presença do hormônio. Com isso, é interessante se analisar também os sedimentos dos locais onde é feito o tratamento desses efluentes, lagoa de decantação, bem como do rio onde é o destino final dessas águas a fim de se verificar se há uma acumulação também em locais fora do ambiente de piscicultura.

PERSPECTIVAS

A utilização do hormônio 17 α metiltestosterona na piscicultura traz grandes benefícios econômicos para seus produtores. Com isso, sua utilização torna-se essencial em viveiros de reprodução. Devido o hormônio utilizado na piscicultura ser um anabólico esteroide é importante que sejam realizados estudos sobre o seu risco potencial causado aos seres vivos.

Para isso, é necessário que sejam realizados mais estudos sobre a atuação da MT no meio ambiente em diversas regiões, com diferentes tipos de solos, e diferentes tipos de sedimentos.

Como perspectivas seria interessante às análises da água dos tanques, bem como os reservatórios onde são escoados os rejeitos dos tanques de piscicultura. Também seria interessante analisar os sedimentos dos rios onde as águas são escoadas para enfim verificar se há uma contaminação. Dentre as análises realizadas nesses sedimentos, seria interessante não só a análise do hormônio, mas também análises de teores de matéria orgânica e níveis de eutrofização, posto que os efluentes liberados pela piscicultura sejam muito ricos em nutrientes.

O estudo sobre a reutilização dos sedimentos dos tanques também pode ser uma perspectiva para trabalhos futuros, a fim de se verificar se há algum efeito nas plantas nativas às quais estão sendo expostas aos sedimentos dos tanques, já que estes são usados para fins de enriquecimento da terra como fonte de matéria orgânica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] SHIMADA, K.; MITAMURA, K.; HIGASHI, T. *J. Chromatogr. A.* **2001**, 935, 141.
- [2] LISE, M. L. Z. et al. *Revista da Associação Médica Brasileira* **1999**, 45, 364.
- [3] FALONE. *Tese de Doutorado.* **2007**. 179p.
- [4] CHU. P.S.; et al., *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 3193.
- [5] YASUI, G. S. *Zootecnia Trop.* **2007**, 25, 307.
- [6] MOZETO, A. A.; UMPUZEIRO, G. de A.; JARDIM, W. de F.. *Método de Coleta, Análises Físico-Químicas e Ensaio Biológicos e Ecotoxicológicos de Sedimentos de Água Doce*. Cubo: São Paulo, Brasil, 2006.
- [7] ALEGRE. G. F. *Dissertação de Mestrado.* 2009. 121p.
- [8] SROGI, K., *Environ. Chem. Lett.* **2009**, 5, 169.
- [9] TERNES, T. A.; *Water Res.* **1998**, 32, 3245.
- [10] BAIRD, C.; *Química Ambiental*, 2ª ed.; Bookman: Porto Alegre, Brasil, 2002.
- [11] SILVAX, M. R. C., Estudo de Sedimentos da Bacia Hidrográfica do Mogi-Guaçu, com ênfase na determinação de metais. *Dissertação de Mestrado*. Instituto de Química de São Carlos: Universidade de São Paulo, São Carlos, **2002**, p113.
- [12] FAWELL, J. K. et al., S.; *Water Res.* **2001**, 35, 1240.
- [13] ALMEIDA, F.V. *Bases Técnico-Científicas para o Desenvolvimento de Critérios de Qualidade de Sedimentos Referentes a Compostos Orgânicos Persistentes*; Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas: Campinas. (SP), **2003**, p. 114.
- [14] MOZETO, A. A.; UMPUZEIRO, G. de A.; JARDIM, W. de F.; *Método de Coleta, Análises Físico-Químicas e Ensaio Biológicos e Ecotoxicológicos de Sedimentos de Água Doce*, Cubo, São Paulo, Brasil, 2006.
- [15] PORTELA, C. M. S.; AREZON, A.; RAYA-RODRIGUES, M.T. *J. Brazilian Soc. Ecotoxicology*, **2006**, 1, 119.
- [16] ZAMBONI, A. J. *Dissertação de Mestrado*. Escola de Engenharia de São Carlos - USP. São Carlos. **1993**.
- [17] BILA, D. M. e DEZOTTI, M. *Quim. Nova* **2003**, 26, 523.
- [18] LOPES, L. G; MARCHI, M. R. R. de; SOUZA, J. B. G. de, MOURA, J. A. de. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos* **2008**, 13, 123.

- [19] LOPES, L. G.; MARCHI, M. R. R. de; SOUZA, J. B. G. de, MOURA, J. A. de. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos* **2008**, 13, 123.
- [20] HUET, M. *Tratado de piscicultura*. 2ª ed.; Mundi-Prensa: Madrid, Espanha, 1978.
- [21] PHELPS, R.P., SALAZAR, G.C., ABE, V., ARGUE, B. *Aquac. Res.* **1995**, 26, 293
- [22] MAINARDES-PINTOREV, C. S.R., *Rev. bras. zootec.* **2000**, 29, 654.
- [23] SANCHEZ L.E.F. HAYASHI C. *Acta Sci*, **2001**, 23, 871.
- [24] WASSERMANN L.G.J. e AFONSO, L.O.B. *Aquac. Res.* **2003**, 34, 65.
- [25] DIAS-KOBERSTEIN, T. C. R., *Rev. Acad.* **2007**, 5, 391.
- [26] NEUMANN, E.; KOBERSTEIN, T. C. R. D.; BRAGA, F. M. de S. *R. Bras. Zootec.* **2009**, 38, 973.
- [27] COTTA, J. A. O., REZENDE M. O. O., PIOVANI, M.R.. *Quim. Nova*, **2006**, 29, 40.
- [28] HOMKLIN, S.; ONG, S. K., LIMPIYAKORN, T. *Chemosphere* **2011**, 82, 1401.
- [29] QUEIROZ, J. F. de; BOEIRA, R. C.; SILVEIRA M. P. *Coleta e Preparação de Amostras de Sedimentos de Viveiros de Aqüicultura*. Comunicado Técnico 17. Jaguariúna, SP, Ago., **2004**.
- [30] MOZETO, A. A.; *Manejo da qualidade da água e da dinâmica do sedimento e do particulado da represa do Guarapiranga e do rio Grande*, RMSP, UFSCAR: São Carlos, **1996**.
- [31] GOMES et al. *Trends Anal. Chem.* **2004**, 23, 10.
- [32] ALDA e BARCELÓ. *J. Chromatogr. A* **2001**, 938, 145.
- [33] TERNES. T. A.. *Trends Anal. Chem.* **2001**, 20, 419.
- [34] PETROVIC M., ELJARRAT E., ALDA M. J. L. de, BARCELO D. *Trends Anal. Chem.* **2001**, 20, 637.
- [35] APVMA. *Guidelines for the validation of analytical methods for active constituent, agricultural and veterinary chemical products*. Austrália, **2004**. 9p.
- [36] RIBANI, Marcelo, et al.. *Quim. Nova* **2004**, 27, 771.
- [37] BRITO, N. M., et al. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente* **2003**, 13, 129.
- [38] INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia. DOQ-CGCRE-008 – Revisão 04 – Jul/2011. Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos, Rio de Janeiro, **2011**.

- [39] CASSIANO, Neila Maria, *et al.* *Quim. Nova* **2009**, 32, 1021.
- [40] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO/IEC 17025:2001. Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, **2001**.
- [41] BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de **2003**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União – DOU*, Brasília, 2003.
- [42] CHUI, Q. S. H.; Zucchini, R. R.; Lichtig, J.; *Quim. Nova* **2001**, 24, 374.
- [43] BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; *Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*, Editora da Unicamp: Campinas, **2001**.
- [44] AMARANTE Jr., O. P. de; *et al.* Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. *Cad. Pesq.*, v. 12, p. 116-131, **2001**.
- [45] Bouyoucos (**1926**) (granulometria de solos)
- [46] [37] Resolução CONAMA Nº 344/2004 - "Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos mínimos para a avaliação do material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras, e dá outras providências". - Data da legislação: 25/03/**2004** - Publicação DOU nº 087, de 07/05/2004, págs. 56-57 Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=445>> acesso em: 30 de maio de 2013.
- [47] QUEIROZ, J. F. de; BOEIRA, R. C.. Calagem e Controle da Acidez dos Viveiros de Aquicultura. *Circular Técnica nº14*. EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agrícola.
- [48] Apostila sobre piscicultura Disponível em: <<http://www.slideshare.net/AqOrnamental/apostila-de-piscicultura-prof-dr-manuel-vasquez-vidal-jr>> Acesso em: 20 maio de 2012.
- [49] RIBEIRO *et al.* *Acta Sci. Anim. Sci.* **2005**, 27, 399.
- [50] KAKLAMANOS, G.; THEODORIDIS, G.; DABALIS, T. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 8072.
- [51] KUBITZA, F. Uso da metiltestosterona: a piscicultura nas mãos do MPA. *Panorama da aquicultura*. Vol. 19, nº116 Novembro/Dezembro, **2009**.
- [52] MARWAH, A.; MARWAH, P., LARDY, H. *J. Chromatogr. B* **2005**, 824, 107.

- [53] CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005 – *dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamentos de efluentes, e dá outras providências*. Brasília, DOU de 18/03/2005.
- [54] SILVA, W. L.. Sedimentos: geoquímica, amostragem, estocagem e tratamento. Geoquímica ambiental. UNICAMP. São Paulo, **200**-?.
- [55] AMARAL, B. R.; *Dissertação de Mestrado*. USP, **2012**.