



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
Departamento de Química Analítica
Laboratório de Química Ambiental



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

***Ocorrência de interferentes endócrinos e
produtos farmacêuticos nas águas superficiais
da bacia do rio Atibaia.***

Aluna: Cassiana Carolina Montagner Raimundo

Orientador: Wilson de Figueiredo Jardim

Campinas, 20 de julho de 2007.

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

R133o	Raimundo, Cassiana Carolina Montagner. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia / Cassiana Carolina Montagner Raimundo. -- Campinas, SP: [s.n], 2007. Orientador: Wilson de Figueiredo Jardim. Dissertação - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. 1. Interferentes endócrinos. 2. Produtos farmacêuticos. 3. Rio Atibaia. 4. Águas superficiais. I. Jardim, Wilson de Figueiredo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.
-------	---

Título em inglês: Occurrence of endocrine disrupters and pharmaceuticals products in surface waters in the Atibaia river basin

Palavras-chaves em inglês: Endocrine disrupters, Pharmaceutical products, Atibaia river, Surface waters

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na Área de Química Analítica

Banca examinadora: Wilson de Figueiredo Jardim (orientador), Susanne Rath (IQ-UNICAMP), Gisella de Aragão Umbuzeiro (CETESB-SP)

Data de defesa: 20/07/2007

***A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.***

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Sergio e Penha
e ao meu querido irmão Rodrigo,
por todo carinho e incentivo.
Por me fazer acreditar sempre,
que todo o esforço valeria à pena.*

*Ao meu amado marido Ivo,
por todo amor, cumplicidade e afeto.
Por me mostrar que a vida é muito mais
simples do que se pode imaginar.*

AGRADECIMENTOS

Em especial ao Wilson, pela orientação, respeito e amizade. Muito obrigada por essa oportunidade.

Aos amigos do LQA Cláudia, Nívea, Débora, Cris, Amanda, Márcia, Gi, Matheus, Alói, Ju, Fer e Anderson pelo companheirismo nesses anos todos de convivência. Em especial ao Marco pela amizade e por ter realizado comigo todas as coletas desse trabalho, mesmo aquelas em que era preciso acordar muuuito cedo.

Aos professores do IQ, que durante os anos de graduação e mestrado, se dedicaram a me ensinar Química. Em especial a Susanne Rath e Bel Jardim por participarem das bancas. Foi um enorme prazer poder contar com a presença de vocês nesses momentos importantes.

Ao pessoal da CPG, pela competência no trabalho burocrático. E a todos os funcionários do Instituto.

As minhas grandes amigas da graduação, Lara e Jana, presentes de Deus, que mesmo de longe, me trazem força e incentivo.

Ao meu amigo Lúcio que sempre esteve ao meu lado admirando meu trabalho. A Elaine, Gabi e Luana que apesar de não entenderem nada de química, também puderam estar presente no dia da defesa me prestigiando. E a todos os meus amigos e amigas que ao longo da minha vida estiveram presentes trazendo-me alegrias inúmeras.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A Deus por me privilegiar com a conclusão de mais uma etapa importante da minha vida.

Muito Obrigada!

CURRICULUM VITAE

1. Formação Acadêmica

PÓS GRADUAÇÃO: Mestrado na área de Química Ambiental desenvolvido no departamento de Química Analítica do Instituto de Química da UNICAMP sob a orientação do Prof. Dr. Wilson F. Jardim. Período: 2005 / 2007.

SUPERIOR: Bacharelado em Química pela Universidade Estadual de Campinas. Período: 2001 / 2004.

MÉDIO: Escola Técnica Estadual Bento Quirino. Técnico em contabilidade. Período: 1996 / 1998.

FUNDAMENTAL: Escola Estadual de Primeiro Grau Prof. Dr. Carlos Araújo Pimentel. Período: 1988 / 1995.

2. Produção científica

2.1. Iniciação científica

- “Estudo das propriedades físico-químicas e magnéticas da água”, desenvolvido no departamento de Físico-química do Instituto de Química da UNICAMP sob a orientação do Prof. Dr. Fernando G. Faigle. Período: 2002 / 2003.
- “Determinação de mercúrio atmosférico na área urbana de Campinas, utilizando Espectroscopia de Absorção Atômica do Vapor Frio”, desenvolvido no departamento de Química Analítica do Instituto de Química da UNICAMP sob a orientação do Prof. Dr. Wilson F. Jardim. Período 2003 / 2005.
- “Desenvolvimento de tecnologias simples e econômicas para a desinfecção e descontaminação de águas usadas para o consumo humano principalmente em comunidades rurais da América Latina”, desenvolvido no departamento de Química Analítica do Instituto de Química da UNICAMP sob a orientação do Prof. Dr. Wilson F. Jardim. Período: 2004 / 2006. Projeto OEA-AE 141/2001 (Prêmio Mercosul de Ciência e Tecnologia 2006, categoria Integração).

2.2. Trabalhos científicos apresentados em congressos internacionais

- “A remoção de carbono orgânico dissolvido (COD) e de microorganismos presentes em águas naturais usando fotocatalise heterogênea com luz solar”, autores: C.C.Montagner e W.F.Jardim; apresentado no “Encuentro sobre uso y resultados de la aplicación de las tecnologías DSAUI, RAOS y FH em zonas rurales de países de América Latina”, realizado em Buenos Aires, Argentina, em 2004. Apresentado em forma de painel.
- “Aplicação da fotocatalise heterogênea com luz solar na desinfecção de águas naturais”, autores: C.C.Montagner e W.F.Jardim; apresentado no Simpósio Solar Safe Water “O desafio de la provisión de água potable segura: tecnologias para la región de Latinoamérica”, realizado em Puerto Iguazú, Misiones, Argentina, em 2005. Apresentado na forma de painel.

2.3. Trabalhos científicos apresentados em congressos nacionais

- “Atividade bactericida e algicida da fotocatalise heterogênea usando TiO_2 e luz solar”, autores: C.C.Montagner e W.F.Jardim; apresentado na 28º RASBQ de 2005. Painel AB-154.
- “Quantificação de deposição total de mercúrio em Campinas (SP) usando a técnica CVAFS”, autores: C.C.Montagner e W.F.Jardim; apresentado na 29º RASBQ de 2006. Painel AB-032.
- “Determinação de fármacos e de compostos interferentes endócrinos em águas superficiais da sub-bacia do rio Atibaia”, autores: C.C.Montagner, M.A.F.Locatelli e W.F.Jardim; apresentado no III Encontro Nacional de Química Ambiental, em Cabo Frio (RJ) em 2006. Painel premiado com Menção Honrosa.
- “Ocorrência de compostos interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia”, autores: C.C.Montagner e W.F.Jardim; apresentado na 30º RASBQ de 2007. Painel AB-044.
- “Compostos orgânicos xenobióticos em água potável: um novo cenário envolvendo a situação dos sistemas de água e esgoto no Brasil”, autores: C.C.Montagner, F.F.Sodré, G.Ghiselli e W.F.Jardim; apresentado na 30º RASBQ de 2007. Painel AB-045.

2.4. Publicações

2.4.1. Artigo aceito para publicação:

- “Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais na região de Campinas (SP)”, autores: F.F.Sodré, C.C.Montagner, M.A.F.Locatelli e W.F.Jardim foi aceito para publicação na Edição Especial do Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology (JBSE) em 03 de abril de 2007.

2.4.2. Capítulos de Livros

- “Aplicación de la FH em la desinfección de aguas usadas para consumo doméstico em la comunidad de Riacho da Serra em São José do Sabugi, PB, Brasil.” autores: W.F.Jardim e C.C.Montagner. Livro: Resultados finales del ProyectoOEA/AE141: investigación, desarrollo, validación y aplicación de tecnologías solares para la potabilización de agua en zonas rurales aisladas de América Latina y el Caribe, editora: M.I.Litter, 2006, ISBN: 978-987-22574-4-6.
- “Ocorrências de interferentes endócrinos em águas superficiais”, autores: W.F.Jardim, M.A.F.Locatelli, C.C.Montagner e F.F.Sodré; Laboratório de Radioisótopos Eduardo Penna Franca, RJ, 2006.

2.4.3. Outros

- “Aplicação da fotocatalise heterogênea na desinfecção de água e ar”, autores: C.C.Montagner, M.P.Paschoalino e W.F.Jardim; Caderno Temático 04 disponível *on line* desde fevereiro de 2005 no endereço: <http://lqa.iqm.unicamp.br>
- “Interferentes endócrinos no ambiente”, autores: F.F.Sodré, C.C.Montagner, M.A.F.Locatelli e W.F.Jardim; Caderno Temático 05 disponível *on line* desde abril de 2007 no endereço: <http://lqa.iqm.unicamp.br>

RESUMO

OCORRÊNCIA DE INTERFERENTES ENDÓCRINOS E PRODUTOS FARMACÊUTICOS NAS ÁGUAS SUPERFICIAIS DA BACIA DO RIO ATIBAIA.

Aluna: Cassiana C. M. Raimundo

Orientador: Wilson F. Jardim

Alguns compostos orgânicos denominados interferentes endócrinos estão sendo encontrados em águas superficiais e vêm chamando a atenção da comunidade científica. Nessa classe de compostos, destacam-se os hormônios (17β -estradiol, 17α -etinilestradiol, estrona, progesterona, levonorgestrel), os plastificantes (dietilftalato e dibutilfitalato), os surfactantes (4-nonilfenol e 4-octilfenol) e o bisfenol A. Além disso, alguns produtos farmacêuticos, tais como paracetamol, ácido acetil salicílico, diclofenaco e ibuprofeno, também têm sido encontrados em diversos compartimentos ambientais. Considerando o estado de degradação das águas superficiais do Estado de São Paulo, em especial os rios da bacia do Atibaia responsável pelo abastecimento público da RMC, essa dissertação apresenta uma avaliação da ocorrência dos 14 compostos citados acima, além da cafeína que foi usada como traçador de atividade antrópica, nos corpos d'água dessa região. A determinação foi baseada em métodos já estabelecidos, os quais foram convalidados e, envolveram as etapas de extração e concentração de 1 L de amostra usando SPE e análise por HPLC empregando os detectores de DAD e fluorescência. Foram realizadas quatro campanhas amostrais no período entre fevereiro de 2006 e janeiro de 2007 sendo duas no período de alta pluviosidade e duas no período de estiagem. Dos 15 compostos determinados 12 foram encontrados em pelo menos uma amostra. As concentrações variaram entre os compostos e nas diferentes épocas do ano, sendo a maior, encontrada no ribeirão Anhumas na 2ª campanha amostral ($127 \mu\text{g L}^{-1}$ para a cafeína). Os compostos determinados com maior frequência foram a cafeína, dibutilftalato, bisfenol A e 17β -estradiol, e as maiores concentrações foram determinadas em regiões com elevada densidade populacional e durante os períodos de estiagem. O ibuprofeno, dietilftalato e estrona, não foram encontrados nessas matrizes considerando os limites de detecção de 51, 33 e 16 ng L^{-1} , para os três compostos respectivamente.

Palavras-chave: *interferentes endócrinos, produtos farmacêuticos, rio Atibaia, águas superficiais, Região Metropolitana de Campinas, SPE-HPLC-DAD/FL.*

ABSTRACT

OCCURRENCE OF ENDOCRINE DISRUPTERS AND PHARMACEUTICAL PRODUCTS IN SURFACE WATERS IN THE ATIBAIA RIVER BASIN.

Author: Cassiana C. M. Raimundo

Advisor: Wilson F. Jardim

Numerous organic compounds called endocrine disruptors have been found at low levels in surface waters. Several compounds such as hormones (17β -estradiol, 17α -ethinylestradiol, estrone, progesterone and levonorgestrel), phthalates (diethylphthalate and dibutylphthalate), surfactants (4-octylphenol and 4-nonylphenol), bisphenol A, among others are included in this class. Some pharmaceutical products, such as paracetamol, acetyl salicylic acid, diclofenaco and ibuprofen have also been detected in surface waters. Due to the degradation of the surface water quality in the State of São Paulo, especially the Atibaia river which is used for public supply to the Campinas Metropolitan Region, this work presents an updated evaluation of the occurrence of 14 compounds mentioned above, as well as caffeine, used as a chemical tracer of human activity. The determination of these compounds was accomplished using established methods, including solid phase extraction (SPE) of 1 L of sample, followed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) equipped with DAD and fluorescence detector. In order to evaluate spatial and temporal variations, four sampling campaigns were carried out from February/2006 - January/2007, involving two dry and two wet seasons sampling series. From the 15 targeted compounds, 12 of them were found at least in one of the samples analyzed. Highest concentrations were found in Anhumas river in second sampling campaign ($127 \mu\text{g L}^{-1}$ of caffeine). Compounds more frequently found were caffeine, dibutylphthalate, bisphenol A and 17β -estradiol. Highest concentrations were associated to populational density and in the dry season. Ibuprofen, diethylphthalate and estrone not found considering the limit of detection of 51, 33 e 16 ng L^{-1} , respectively.

Keywords: *endocrines disrupters, pharmaceutical products, Atibaia River, surface waters, Campinas Metropolitan Region, SPE-HPLC-DAD/FL.*

ÍNDICE

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xxiii
LISTA DE TABELAS	xxv
LISTA DE FIGURAS	xxvii
CAPÍTULO 1: CONTAMINATES EMERGENTES	1
1.1. FÁRMACOS	4
1.2. CAFEÍNA	5
1.3. INTERFERENTES ENDÓCRINOS	7
1.3.1. ESTROGÊNIOS NATURAIS	10
1.3.2. ESTROGÊNIOS SINTÉTICOS	11
1.3.3. FITOESTROGÊNIOS	12
1.3.4. XENOESTROGÊNIOS	13
1.3.4.1. FTALATOS	14
1.3.4.2. ALQUILFENÓIS	15
1.3.4.3. BISFENOL A	15
1.4. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E ESTROGENICIDADE	16
1.5. FONTES, DESTINO E COMPORTAMENTO NO AMBIENTE	23
CAPÍTULO 2: A REGIÃO METROPOLITANA DE CAMPINAS E A SITUAÇÃO DE SANEAMENTO BÁSICO	29
OBJETIVOS	34
CAPÍTULO 3: EXPERIMENTAL	35
3.1. PRIMEIRA ETAPA: MÉTODO ANALÍTICO	35
3.1.1. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	37
3.1.2. EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS	38
3.1.2.1. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	38
3.1.2.2. EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	40

3.2. SEGUNDA ETAPA: VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	41
3.2.1. CONFORMIDADE DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO	42
3.2.2. ESTABILIDADE	42
3.2.3. SELETIVIDADE	43
3.2.4. CURVA ANALÍTICA	43
3.2.5. LINEARIDADE E SENSIBILIDADE	44
3.2.6. PRECISÃO	44
3.2.7. EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	44
3.3. TERCEIRA ETAPA: CAMPANHAS AMOSTRAIS	45
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
4.1. PRIMEIRA ETAPA: MÉTODO ANALÍTICO	55
4.1.1. SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA	55
4.1.2. DETECÇÃO POR FLUORESCÊNCIA	62
4.1.3. EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS	64
4.1.3.1. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	64
4.1.3.2. COMPARAÇÃO ENTRE SPE E LLE	65
4.2. SEGUNDA ETAPA: VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	67
4.2.1. CONFORMIDADE DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO	67
4.2.2. ESTABILIDADE	69
4.2.3. SELETIVIDADE	69
4.2.4. CURVA ANALÍTICA	73
4.2.5. LINEARIDADE E SENSIBILIDADE	74
4.2.6. PRECISÃO	76
4.2.7. EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	77
4.3. TERCEIRA ETAPA: CAMPANHAS AMOSTRAIS	82
4.3.1. FÁRMACOS	82
4.3.2. CAFÉINA	84
4.3.3. INTERFERENTES ENDÓCRINOS	87
4.3.4. OUTROS PARÂMETROS DOS RIOS DA RMC	94
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	99
REFERÊNCIAS	101

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AAS: Ácido Acetil Salicílico

ACN: Acetonitrila

AGRITEMPO: Sistema de Monitoramento Agrometeorológico

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPC: Bifenilas Policloradas

CAS: Chemical Abstracts Service

CETESB: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

CPFL: Companhia Paulista de Força e Luz

CV: Coeficiente de Variação

DAD: Detector por Arranjo de Diodos

ETA : Estação de Tratamento de Água

ETE: Estação de Tratamento de Esgoto

EU: Union European

FL: Detector de Fluorescência

FM: Fase Móvel

HPA: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC: Inclinação da curva analítica

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IPCS: International Programme on Chemical Safety

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

k': Fator de retenção

K_{ow}: Coeficiente de partição octanol/água

LD: Limite de detecção

LLE: Extração Líquido-Líquido

LQ: Limite de Quantificação

M: Massa Molar

N: Número de pratos

pK_a: constante de dissociação ácida

PNSB: Pesquisa Nacional de Saneamento Básico do IBGE

PVC: Cloreto de Polivinila

R: Resolução

RCM: Região Metropolitana de Campinas

REPLAN: Refinaria do Planalto Paulista

s_a: Estimativa de desvio padrão no intersepto com o eixo y

SAAE: Sociedade Autônoma de Água e Esgoto

SANASA: Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A

SEMA: Secretaria Especial do Meio Ambiente

SPE: Extração em Fase Sólida

Tf: Fator alargamento dos picos cromatográficos

TOC: Carbono Orgânico Total

t_R: tempo de retenção

UGRHI: Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos

USEPA: United States Environmental Protection Agency

USFDA: United States Food and Drug Administration

WHO: World Health Organization

Φ: Constante de solubilidade em água

λ_{máx}: Comprimento de onda máximo

17α-EE2: 17α-etinilestradiol

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Estrutura e propriedades físico-químicas dos compostos estudados em função de suas classes.	18
Tabela 2:	Principais fontes dos contaminantes emergentes nas águas superficiais.	24
Tabela 3:	Excreção diária (μg) de 17β -estradiol, estrona, estriol e 17α -EE2 por seres humanos e a meia vida desses compostos.	25
Tabela 4:	Proporção de municípios, por condição de esgotamento sanitário, segundo as grandes regiões.	32
Tabela 5:	Nome IUPAC, pureza, marca e número CAS dos compostos determinados.	36
Tabela 6:	Descrição dos três procedimentos de SPE avaliados nesse trabalho para a extração simultânea dos 15 compostos de interesse.	39
Tabela 7:	Descrição dos pontos de amostragem e seus respectivos códigos de monitoramento da CETESB.	52
Tabela 8:	Gradientes de eluição da fase móvel constituída por acetonitrila (ACN) em solução de HCl pH 3 e vazão $0,8 \text{ mL min}^{-1}$.	59
Tabela 9:	Tempo de retenção (t_R) dos quinze compostos e seus respectivos comprimentos de onda empregados para a quantificação.	61
Tabela 10:	Conformidade do sistema cromatográfico para determinação dos quinze compostos de interesse por HPLC-DAD.	68
Tabela 11:	Conformidade do sistema cromatográfico para determinação de bisfenol A, 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol por HPLC-FL.	69
Tabela 12:	Faixa de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação dos doze compostos determinados por HPLC-DAD.	73
Tabela 13:	Faixa de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação dos 3 compostos determinados por HPLC-FL.	74
Tabela 14:	Coeficiente de correlação (r) obtido para os 12 compostos determinados por HPLC-DAD em cada campanha amostral.	74
Tabela 15:	Coeficiente de correlação (r) obtido para os 3 compostos determinados por HPLC-FL em cada campanha amostral.	75
Tabela 16:	Sensibilidade das curvas analíticas dos três compostos: bisfenol A, 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol obtidas por DAD e FL.	76

Tabela 17:	Porcentagem de recuperação dos compostos extraídos por SPE em duas amostras de 1 L cada enriquecida com 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada composto.	80
Tabela 18:	Classificação dos compostos orgânicos analisados considerando-se suas funções e características estruturais.	81
Tabela 19:	Concentração de cafeína, em $\mu\text{g L}^{-1}$, determinada nas amostras durante as quatro campanhas de amostragem.	85
Tabela 20:	Concentração de dibutilftalato ($\mu\text{g L}^{-1}$) encontrada durante as quatro campanhas de amostragem.	89
Tabela 21:	Concentração de bisfenol A (ng L^{-1}) nas amostras durante as quatro campanhas de amostragem.	90
Tabela 22:	Concentração de 17 β -estradiol (ng L^{-1}) nas amostras durante as quatro campanhas de amostragem.	91
Tabela 23:	Concentração de 17 α -etinilestradiol (ng L^{-1}) nas amostras durante as quatro campanhas de amostragem.	93
Tabela 24:	Carbono Orgânico Total (TOC) (valores em mg C L^{-1}) nas amostras analisadas nas campanhas amostrais.	94
Tabela 25:	Parâmetros físico-químicos das amostras medidas <i>in situ</i> durante as coletas da quarta campanha amostral, realizada em janeiro de 2007.	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	O sistema endócrino humano.	8
Figura 2:	Estrutura básica dos esteróides.	9
Figura 3:	Biossíntese do hormônio 17β -estradiol a partir do colesterol.	10
Figura 4:	Rotas potenciais de exposição de hormônios humanos no ambiente.	26
Figura 5:	Região Metropolitana de Campinas em função da densidade populacional.	29
Figura 6:	Classificação das 22 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado de São Paulo.	31
Figura 7:	Precipitação úmida diária e datas das campanhas amostrais.	45
Figura 8:	Localização dos pontos de amostragem na UGRHI 5.	46
Figura 9:	Ponto de amostragem P1: rio Atibaia/Atibaia no município de Atibaia à esquerda na primeira campanha (alta pluviosidade) e a direita na terceira campanha (estiagem).	47
Figura 10:	Ponto de amostragem P2: rio Atibaia/Sousas no município de Campinas.	47
Figura 11:	Ponto de amostragem P3: ribeirão Pinheiro a 100 m de sua foz no rio Atibaia.	48
Figura 12:	Ponto de amostragem P4: rio Atibaia/captação à esquerda na primeira campanha (alta pluviosidade) e a direita na terceira campanha (estiagem).	48
Figura 13:	Ponto de amostragem P5: ribeirão Anhumas à esquerda na primeira campanha (alta pluviosidade) e a direita na terceira campanha (estiagem).	49
Figura 14:	Ponto de amostragem P6: rio Atibaia/Paulínia.	49
Figura 15:	Ponto de amostragem P7: rio Atibaia/Represa, na Represa de Salto Grande no município de Americana à esquerda na terceira campanha (estiagem) e a direita na quarta campanha (alta pluviosidade).	50
Figura 16:	Ponto de amostragem P8: rio Atibaia/Foz, no município de Americana a 200 m de seu aporte no rio Piracicaba.	50

Figura 17:	Ponto de amostragem P9: rio Capivari à esquerda na primeira campanha (alta pluviosidade) e a direita na terceira campanha (estiagem).	51
Figura 18:	Ponto de amostragem P10: rio Jundiaí no município de Indaiatuba.	51
Figura 19:	Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD com absorção em 200 nm e FM isocráticas de 35, 45, 50 e 70 % ACN em água para uma mistura padrão dos 8 compostos 1: cafeína, 2: bisfenol A, 3: 17 β -estradiol, 4: 17 α -EE2, 5: estrona, 6: diclofenaco, 7: ibuprofeno e 8: progesterona.	56
Figura 20:	Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD com absorção em 200 nm e FM isocrática 50 % ACN em água, à direita sem o ajuste de pH e a esquerda com o pH 3, para uma mistura padrão dos 8 compostos 1: cafeína, 2: bisfenol A, 3: 17 β -estradiol, 4: 17 α -EE2, 5: estrona, 6: diclofenaco, 7: ibuprofeno e 8: progesterona.	57
Figura 21:	Cromatograma de uma solução contendo quinze compostos em metanol obtido por HPLC-DAD com absorção em 200 nm. 2: paracetamol, 3: cafeína, 4: AAS, 5: bisfenol A, 6: 17 β -estradiol, 7: 17 α -EE2, 8: estrona, 9: dietilftalato, 10: levonorgestrel, 11: diclofenaco, 12: ibuprofeno, 13: progesterona, 14: dibutilftalato, 15: 4-octilfenol e 16: 4-nonilfenol.	60
Figura 22:	Cromatograma de uma solução contendo quinze compostos estudados em metanol obtido por HPLC-FL com excitação em 230 nm e emissão em 310 nm aplicando o programa de eluição de FM adotado.	63
Figura 23:	Cromatograma obtido por HPLC-FL com excitação em 230 nm e emissão em 310 nm para uma solução contendo 1 mg L ⁻¹ de bisfenol A (t_R = 6,5 min), 17 β -estradiol (t_R = 7,1 min) e 17 α -EE2 (t_R = 8,0 min) empregando FM isocrática contendo 50 % de ACN em solução ácida pH 3 e vazão de 0,8 mL min ⁻¹ .	63
Figura 24:	Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD para amostras do rio Atibaia empregando os três métodos de SPE.	64
Figura 25:	Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD para amostras do rio Jundiaí empregando extração em fase sólida (SPE) e extração líquido-líquido (LLE).	66
Figura 26:	Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD para amostras de água mineral empregando extração em fase sólida (SPE) e extração líquido-líquido (LLE).	66

Figura 27:	Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD para uma amostra padrão contendo $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada um dos 15 compostos, e duas amostras do rio Capivari, sendo uma amostra natural e uma na qual foi adicionado $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada um dos 15 compostos. 1: tempo morto, 2: paracetamol, 3: cafeína, 4: AAS, 5: bisfenol A, 6: 17β -estradiol, 7: 17α -EE2, 8: estrona, 9: dietilftalato 10: levonorgestrel, 11: diclofenaco, 12: ibuprofeno, 13: progesterona, 14: dibutilftalato, 15: 4-octilfenol e 16: 4-nonilfenol.	70
Figura 28:	Cromatogramas obtidos por HPLC-FL para uma amostra padrão contendo $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada um dos 15 compostos e duas amostras do rio Capivari, sendo uma amostra natural e uma na qual foi adicionado $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada um dos 15 compostos. 1: bisfenol A, 2: 17β -estradiol, 3: 17α -EE2.	70
Figura 29:	Espectros de absorção no UV para a cafeína e o dibutilftalato presentes em (a) solução padrão 5 mg L^{-1} e (b) amostra do ribeirão Anhumas.	71
Figura 30:	Espectro de absorção no UV obtido pelo detector DAD para treze dos quinze compostos analisados.	72
Figura 31:	Curvas analíticas obtidas com soluções-padrão para os quinze compostos empregando o detector DAD à esquerda e, dos três compostos empregando FL.	75
Figura 32:	Repetibilidade dos resultados obtidos para uma solução-padrão contendo 5 mg L^{-1} de cada um dos quinze compostos expressa por meio do coeficiente de variação (CV) para um número de (a) seis repetições realizadas no mesmo dia e, (b) dez repetições realizadas em três dias diferentes.	77
Figura 33:	Teste de recuperação para onze compostos empregando-se extração em fase sólida e determinação cromatográfica por HPLC-DAD. As letras a, b, c e d representam volumes da amostra de 250, 500, 750 e 1000 mL.	78
Figura 34:	Mapa referente a UGRHI 5 onde estão inseridos os rios em estudo e as concentrações de cafeína presentes nos dez pontos amostrais determinadas na terceira campanha (barra vermelha) e quarta campanha (barra verde).	86
Figura 35:	Concentração dos quatro compostos determinados com mais frequência nos rios estudados em todas as campanhas de amostragem.	88

CAPÍTULO 1

CONTAMINANTES EMERGENTES

A água é hoje reconhecida como um dos bens naturais mais importantes do planeta. A preocupação com o uso, destino e principalmente estado de degradação tem mobilizado pessoas de todas as áreas quanto a sua preservação.

O Brasil é um país privilegiado quanto ao seu volume de recursos hídricos, porém cerca de 73 % da água doce disponível encontra-se na bacia Amazônica que é habitada por menos de 5 % da população brasileira (Setti *et al.*, 2001). A idéia de abundância serviu durante muito tempo como suporte à cultura do desperdício da água disponível e, até os dias de hoje, não há um planejamento de saneamento básico e ambiental adequados que preserve esses recursos.

Os problemas de escassez hídricas no Brasil decorreram, principalmente, da combinação do crescimento exagerado das demandas localizadas e da degradação da qualidade das águas. Este quadro é consequência do aumento desordenado dos processos de urbanização, industrialização e expansão agrícola, verificados a partir de 1950. A mobilização da população do campo para a cidade e a industrialização, além de exercerem aumento significativo na demanda das águas dos mananciais, também exigiram o crescimento do parque gerador de energia elétrica que, por sua vez, implicou na necessidade de construções apreciáveis de aproveitamentos hidrelétricos. Adicionalmente, o aumento da população demandou por mais produção de alimentos, o que proporcionou o avanço da agricultura irrigada.

Ao longo da década de 70 e mais acentuadamente na década de 80, a sociedade começou a despertar para as ameaças a que estava sujeita se não mudasse o comportamento quanto ao uso de seus recursos hídricos. Neste período várias organizações não governamentais foram criadas e comissões interministeriais, como a SEMA (Secretaria Especial do Meio Ambiente), foram instituídas para encontrar meios de aprimorar nosso sistema de uso múltiplo dos recursos hídricos e minimizar o risco de

comprometimento de sua qualidade, principalmente no que se refere às futuras gerações. Mesmo assim, em 1995 foi feita uma estimativa do desperdício de água no Brasil a qual alcançou 45 % do volume ofertado naquele ano (Setti *et al.*, 2001).

No mundo, os problemas de escassez de água acentuaram-se a partir dos anos 30 quando surgiu um novo período da história que ficou definido como “Era Tecnológica” que se refere ao período subsequente à Primeira Guerra Mundial, quando o interesse militar passou a ser fator determinante no desenvolvimento de novas rotas sintéticas e na produção de novos compostos. Após a Segunda Guerra Mundial, a produção e o uso indiscriminado de pesticidas marcaram o início de um período de desenvolvimento acelerado das atividades industriais. Foi observado até mesmo um retorno parcial dos investimentos massivos em tecnologia militar, principalmente por meio da aplicação de muitas tecnologias intermediárias na melhoria dos bens de consumo (de Moura, 2000). Houve uma demanda crescente da sociedade por produtos industrializados o que motivou ainda mais o desenvolvimento tecnológico, sendo que muitos compostos inovadores, tais como produtos farmacêuticos e alimentícios, foram produzidos e distribuídos para consumo no mundo todo. Nesta época, entretanto, os avanços industriais eram promovidos sem qualquer tipo de cuidado com relação a possível contaminação ambiental.

A partir de 1970, o interesse da comunidade acadêmica e a criação de órgãos de proteção ambiental, como a USEPA (*United States Environmental Protection Agency*), promoveram um aumento no número de pesquisas no mundo todo envolvendo monitoramento dos compostos, definidos como xenobióticos, em diversos compartimentos ambientais. Inúmeros trabalhos foram publicados alertando para a possibilidade de que muitos fármacos e seus metabólicos poderiam estar presentes no ambiente em concentrações-traço (Daughton, 2002). Com isso, pareceu crescer o interesse dos setores público e privado no que diz respeito aos assuntos ambientais, que acabou sendo refletido no número crescente de organizações governamentais e não-governamentais que hoje debatem esses problemas, estabelecem normas e condutas a serem seguidas e discutem a importância das práticas de minimização e remediação de resíduos e substâncias químicas potencialmente poluentes.

Atualmente, existem cerca de 11 milhões de substâncias químicas registradas no CAS (*Chemical Abstracts Service*). Nos Estados Unidos e Japão, cerca de 100.000 compostos são produzidos deliberadamente e utilizados para diversos fins. Apenas nos Estados Unidos são registrados de 1.200 a 1.500 substâncias químicas por ano. No planeta, aproximadamente 3.000 compostos são produzidos em larga escala atingindo quantidades superiores a 500.000 kg por ano. Destes, menos de 45 % foram submetidos a algum tipo de ensaio toxicológico básico e menos de 10 % foram estudados quanto aos efeitos tóxicos sobre organismos em desenvolvimento (Mello-da-Silva e Fruchtengarten, 2005).

Dentre os compostos classificados como contaminantes emergentes estão incluídos alguns fármacos de diferentes classes como: analgésicos, antiinflamatórios, drogas psiquiátricas, antilipêmicos, antibióticos (de uso humano e veterinário), contrastes de raio X, hormônios e esteróides, além de componentes presentes em protetores solares, produtos de higiene pessoal como fragrâncias contendo grupos nitro e ftalatos, inseticidas repelentes e anti-sépticos, bem como os surfactantes amplamente utilizados no consumo doméstico.

Dentre estes, destacam-se alguns compostos chamados interferentes endócrinos, que são substâncias com propriedades que podem provocar alterações no sistema endócrino de animais e humanos. Eles constituem uma classe de substâncias não definidas pela sua natureza química, mas pelo seu efeito biológico. São compostos orgânicos hormonalmente ativos que podem causar distúrbios no sistema endócrino mesmo em baixas concentrações. O interesse no estudo destas substâncias é relativamente recente e foi motivado a partir de observações sobre a ocorrência de anormalidades no sistema endócrino de animais submetidos à exposição a alguns compostos orgânicos. Alterações crônicas no desenvolvimento e na reprodução de várias espécies presentes em diferentes compartimentos ambientais têm sido atribuídas à ocorrência de uma grande variedade de substâncias químicas, principalmente em sistemas aquáticos naturais. Mesmo em concentrações-traço, alguns compostos exógenos, sintéticos ou naturais, têm sido detectados em amostras de águas superficiais em todos os continentes do planeta, principalmente em função da atividade antrópica.

Os seres humanos estão expostos aos contaminantes emergentes principalmente por meio da ingestão de alimentos como: frango, peixes, carnes bovina e suína, legumes e verduras; e água contaminada e, em menor proporção pelo contato via derme e inalação dos mesmos.

1.1. FÁRMACOS

Nas últimas décadas houve um aumento significativo em todo o mundo no consumo de medicamentos, principalmente aqueles vendidos sem prescrição médica. Desde então, muitos produtos farmacêuticos têm sido encontrados em diversos compartimentos ambientais com o auxílio de técnicas analíticas mais sensíveis, capazes de determinar concentrações de até ng L^{-1} . Atualmente, muitos grupos de pesquisas e órgãos ambientais vêm estudando não apenas os níveis de concentração desses compostos no meio, mas a sua origem, destino e seus efeitos adversos, principalmente à biota.

Dentre os principais fármacos, como relação à suas abundâncias, destacam-se o ibuprofeno, o diclofenaco, o paracetamol e o ácido acetil salicílico (AAS). O ibuprofeno é um agente não-esteróide, analgésico, antipirético e antiinflamatório, usado no combate à febre e para aliviar dores em geral. É a terceira droga mais utilizada no mundo, porém no Brasil seu consumo não é tão elevado. Pode ser encontrado em duas formas enantioméricas, mas seu efeito farmacológico é dado exclusivamente à forma *S*, ainda que seja administrado como uma mistura racêmica. Algumas pesquisas mostraram que no organismo humano e de outros mamíferos pode ocorrer a inversão quiral da forma enantiomérica *R* (inativa) para a forma *S* (ativa). Embora esta última seja excretada em maior quantidade que a forma *R*, estudos mostraram que ela degrada mais rapidamente quando presente em efluentes domésticos e águas superficiais (Buser *et al.*, 1999).

O diclofenaco é um dos antiinflamatórios mais prescritos no Brasil. Pode ser encontrado também nas formas sódica e potássica. É bastante persistente em condições naturais e aos processos de tratamento de esgoto convencionais. Tem sido

detectado em mais de 50 % dos efluentes municipais da Alemanha em concentrações de aproximadamente $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (Ravina *et al.*, 2002; Heberer, 2002).

O paracetamol (acetoamidofenol) e o AAS são populares agentes analgésicos e antitérmicos, usados para alívios de dores e febre. O paracetamol tem sido encontrado em afluentes de estações de tratamento de esgoto e em menor concentração em águas superficiais de diversos países. Embora facilmente biodegradado no meio aquático, o AAS foi detectado em 22 dos 49 afluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) analisados na Alemanha em concentrações de até $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$, e nos rios em concentrações até $0,34 \mu\text{g L}^{-1}$ (Ternes, 1998).

Depois de administrada, muitas drogas são transformadas em um ou mais metabólitos e excretadas através da urina e fezes em uma mistura contendo o fármaco que não foi metabolizado pelo organismo e seus metabólitos. No caso do ibuprofeno, por exemplo, apenas 15 % do que foi ingerido, é eliminado na forma original, enquanto que 26 % são excretados nas formas hidroxibuprofeno e 43 % como carboxibuprofeno (Weigel *et al.*, 2004).

Nas ETE há três destinos possíveis para qualquer fármaco individual: (1) pode ser biodegradado, ou seja, mineralizado a gás carbônico e água, como por exemplo, o AAS; (2) pode sofrer algum processo metabólico ou ser parcialmente degradado, como o ibuprofeno; (3) ou pode ser persistente como o diclofenaco. Pouco se conhece sobre as rotas dos fármacos no ambiente, mas sabe-se que os esgotos domésticos e hospitalares são as principais fontes de contaminação, sobretudo de matrizes aquáticas. Para esses compostos não foi observada atividade estrogênica, mas a maneira como a concentração deles no meio vem aumentando é preocupante.

1.2. CAFEÍNA

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina), pertence ao grupo de compostos químicos chamados *metil-xantinas*, presentes em cerca de 60 espécies de plantas no mundo. Produtos alimentícios como café, chás, cola, chocolate e guaraná apresentam concentrações variadas de cafeína, além deles, também pode ser encontrada no

tabaco, em alguns condimentos, além de remédios do tipo analgésico, medicamentos contra a gripe e inibidores de apetite. As xantinas são substâncias capazes de estimular o sistema nervoso, produzindo um estado de alerta de curta duração (Gardinali e Zhao, 2002).

A média de consumo global era de 70 mg por pessoa por dia em 1991, mas estima-se que o uso tenha aumentado consideravelmente nos últimos anos, tendo proporções diferentes entre os diversos países. Por exemplo, o consumo de cafeína na Austrália aumentou de 190 para 410 mg por pessoa por dia só no ano de 1995. Nos Estados Unidos, na Suíça e na Inglaterra são consumidos 210, 300 e 440 mg por pessoa por dia (Buerge *et al.*, 2003). O Conselho da Associação Médica dos EUA em Assuntos Científicos (*American Medical Association on Scientific Affairs*) recomenda consumo moderado de cafeína em até 250 mg ao dia (Gardinali e Zhao, 2002). A cafeína está incluída na lista da USEPA dos compostos químicos produzidos em maior volume no mundo.

A absorção da cafeína pelo organismo humano é muito rápida, assim como a sua distribuição, passando rapidamente para o sistema nervoso central. Toda a ação da cafeína no corpo depende da forma de preparo do produto, da quantidade utilizada e das condições do organismo que a consome, podendo o efeito variar de indivíduo para indivíduo. O corpo humano não necessita de cafeína, embora o seu consumo moderado não esteja associado a nenhum risco à saúde, exceto em algumas situações especiais. Mulheres grávidas, crianças, pessoas com problemas cardíacos ou portadores de úlceras estomacais devem reduzir o consumo ou mesmo suprimi-lo.

Um benefício atribuído ao consumo da cafeína está relacionado à sua capacidade de estimular a lipólise (quebra das moléculas de gordura no organismo), o que, teoricamente, favoreceria o emagrecimento. Porém, essa ação ocorre a um custo elevado para o organismo, com mobilização dos depósitos de gordura fazendo aumentar os níveis da mesma no sangue. Com isso, pode haver elevação do colesterol sanguíneo e, conseqüentemente, aumento do risco de infarto. A cafeína é também diurética, ou seja, aumenta a excreção urinária fazendo com que o organismo perca mais água. Conseqüências negativas do consumo excessivo de produtos à base de

cafeína dizem respeito à interação dessa substância com a absorção de importantes nutrientes, principalmente o ferro, o aumento da frequência cardíaca (taquicardia) e o estímulo da secreção do ácido clorídrico no estômago (o que aumenta o risco de úlceras).

A presença deste composto no ambiente, principalmente nas águas naturais, é, sobretudo de origem antrópica. Estudos têm mostrado que uma certa porcentagem de cafeína, entre 3 e 10 %, não é absorvida pelo organismo e é excretada na urina. Em ETE a cafeína é lentamente metabolizada pela bactéria *Pseudomonas putida*. Os produtos de degradação da cafeína incluem outros derivados das xantinas. Embora a cafeína não seja considerada uma substância suspeita de causar alteração no sistema endócrino, e também não se conheça seu efeito à biota, em alguns casos foi associada com elevadas concentrações de nitratos no meio aquático (Chen *et al.*, 2002), em outros, à presença de coliformes totais, comumente usados como traçador de contaminação fecal (Piocos e de la Cruz, 2000). Sendo assim tem sido utilizada em muitos estudos, inclusive nesse trabalho, como um traçador de atividade humana.

1.3. INTERFERENTES ENDÓCRINOS

Segundo o Programa Internacional de Segurança Química (*International Programme on Chemical Safety- IPCS*), um interferente endócrino é classificado como “uma substância ou mistura exógena que altera a função do sistema endócrino e conseqüentemente causa efeitos adversos em um organismo saudável, ou em seus descendentes, ou subpopulações” (Damstra *et al.*, 2002). A USEPA propõe uma definição mais detalhada que reflete a diversidade de mecanismos envolvidos na perturbação do sistema endócrino. Segundo ela, “um interferente endócrino é um agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação de hormônios naturais que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento”.

O sistema endócrino regula, juntamente com o sistema nervoso todas as funções fisiológicas do organismo. Enquanto o sistema nervoso se comunica através de impulsos elétricos ao longo de precisos circuitos nervosos e celulares, o sistema

endócrino trabalha de um modo mais difuso, transportando informações através da circulação de um tecido para outro através dos hormônios.

Os hormônios são produzidos e secretados pelas glândulas endócrinas diretamente para a corrente sanguínea e influenciam as atividades funcionais de outras células de modo específico, sendo a influência quer de natureza excitadora, quer inibidora.

O corpo humano é constituído por nove glândulas endócrinas ilustradas na Figura 1. A glândula pineal inibe a precocidade sexual; o hipotálamo controla a produção de hormônios de outras glândulas endócrinas; a pituitária controla a ação de outras glândulas; a tireóide ajuda a controlar a produção de energia; a paratireóide distribui o cálcio entre o sangue e os ossos; o timo produz hormônios que estão relacionados com a defesa contra infecções, formação de anticorpos, formação do sistema linfático e auxilia no controle do crescimento e maturação sexual; as glândulas adrenais regulam o nível do sal e da água e secretam estimulantes; células do pâncreas controlam o açúcar do sangue e as glândulas sexuais governam a reprodução e as características sexuais secundárias (von Brandis, 1977).

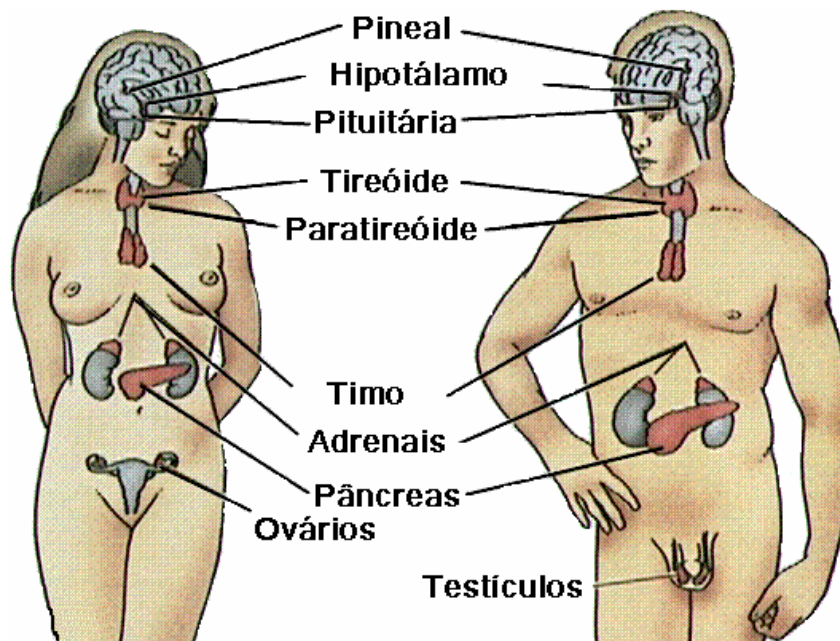


Figura 1: O sistema endócrino humano (adaptado de Farabee, 2001).

Os compostos interferentes endócrinos podem agir no sistema endócrino de diversas maneiras, eles podem imitar um hormônio natural e dessa forma se ajustarem aos sítios receptores enviando mensagens aos genes que respondem a elas gerando uma reação de atividades em cadeia alterando as funções biológicas do organismo; alguns compostos são capazes de incentivar a produção de hormônios e outros podem agir bloqueando a produção deles ao ocuparem os sítios receptores; os interferentes endócrinos podem ainda estimular a excreção dos hormônios deixando o organismo defasado ou causando a constante produção do hormônio eliminado a fim de repor aquele excretado; um outro mecanismo de ação é por meio da inativação das enzimas responsáveis pela decomposição dos hormônios para excreção, o que gera um acúmulo deles no organismo e este por sua vez, responde a uma atividade que já deveria ter sido cessada; e por fim, esses compostos podem agir destruindo ou modificando a estrutura de um hormônio natural impedindo dessa forma que eles se liguem aos sítios receptores no organismo (Birkett e Lester, 2003).

Quimicamente, os hormônios são proteínas derivadas de aminoácidos ou esteróides. Segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), os esteróides compreendem uma classe de hormônios cuja estrutura básica é formada pelo ciclo[a]fenantreno (Figura 2). Nessa estrutura podem existir ligações duplas, metilas, carbonilas e hidroxilas, dando origem a uma série de hormônios esteroidais.

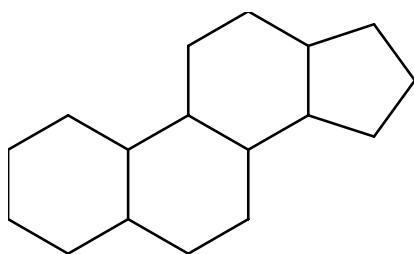


Figura 2: Estrutura básica dos esteróides.

Nos homens os hormônios predominantes são os androgênios e nas mulheres, os estrogênios. Os androgênios são uma classe de hormônios sexuais, produzidos pelas glândulas adrenais e testículos, incluem a androsterona e a testosterona, sendo responsáveis pelo desenvolvimento das características secundárias masculinas, tais como voz grave e barba. Os estrogênios são definidos como uma família de hormônios

esteróides responsáveis pelo desenvolvimento das características secundárias femininas e funções de reprodução.

Os estrogênios são classificados em quatro tipos de acordo com a sua origem: (1) os que ocorrem naturalmente no organismo; (2) os que são sintetizados para serem ingeridos como medicamento; (3) os fitoestrogênios presentes em plantas alimentícias, muitos dos quais promovem importantes benefícios à saúde e (4) os “xenoestrogênios” ou externos, sintetizados pelo homem e presentes em produtos de uso doméstico (Gutendorf e Westendorf, 2001).

1.3.1. ESTROGÊNIOS NATURAIS

Os estrogênios naturais fazem parte de um grupo de vários hormônios esteróides lipofílicos produzidos, principalmente nos ovários e nos testículos em humanos e outros vertebrados, originários do colesterol ou acetil coenzima-A (Tapiero *et al.*, 2002). Sua síntese, tanto em mulheres como em homens, ocorre também localmente em tecidos não-endócrinos tais como fígado, tecido adiposo e cérebro, através da conversão do hormônio masculino testosterona em 17 β -estradiol sob ação da enzima conversora aromatase (Figura 3).

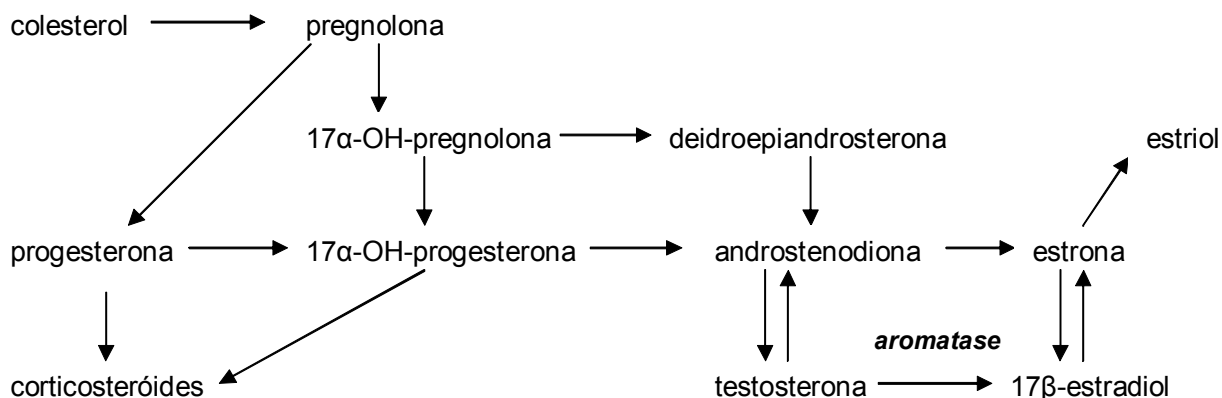


Figura 3: Biossíntese do hormônio 17 β -estradiol a partir do colesterol. Em itálico, a enzima aromatase, presente em alguns tecidos não-endócrinos (adaptado de Österlund, M.K. e Hurd, Y.L., 2001).

O estrógeno mais abundante e potente de ocorrência natural nos seres humanos é o 17 β -estradiol, seguido pela estrona e estriol (principal forma de excreção do hormônio). O 17 β -estradiol é doze vezes mais ativo que a estrona e oitenta vezes do que o estriol (Lark, 1999).

Conhecidos como hormônios femininos, os estrogênios e progestogênios possuem funções diferentes. Os estrogênios são responsáveis pelas características secundárias femininas, agem no controle da ovulação, no desenvolvimento e preparo cíclico do sistema reprodutor para a fertilização e implantação do óvulo, estimulam o crescimento dos tecidos ao promover a proliferação celular nos órgãos sexuais femininos (seios e útero), geralmente exercem influência sobre o crescimento, desenvolvimento e o comportamento (Nassif *et al.*, 2005). Atuam também nos sistemas imunológico e cardiovascular além de influir na pele, nos ossos, no fígado e mesmo no cérebro, assegurando a normalidade nos sistemas orgânicos. Os progestogênios ajudam a regular as mudanças que ocorrem durante a menstruação, influenciam no desenvolvimento das membranas fetais e glândulas mamárias durante a gestação e são conhecidos por hormônios da gravidez. O tecidos reprodutores masculinos, tais como testículos e próstata, são igualmente alvos de estrogênios, porém nos machos estes desempenham um papel secundário em relação aos androgênios. No entanto, o excesso deles pode feminilizá-los.

1.3.2. ESTROGÊNIOS SINTÉTICOS

Os estrogênios sintéticos, encontrados em produtos farmacêuticos, são estrogênios que tiveram suas estruturas moleculares alteradas. Eles têm a tendência de serem mais potentes do que os estrogênios do corpo e conseqüentemente, mais ativos.

Hormônios naturais como 17 β -estradiol e progesterona não são adequados para aplicações orais, exceto se forem ingeridos em altas concentrações, pois estes, são facilmente metabolizados e excretados pelo organismo. Esteróides sintéticos atuam no sistema endócrino e alteram a atividade fisiológica mesmo em baixas concentrações.

Hormônios naturais apresentam solubilidade em água entre 5,75 e 13,25 mg L⁻¹, enquanto os esteróides sintéticos possuem solubilidade em água entre 0,16 e 4,83 mg L⁻¹ (Tabela 1, página 16). O estrogênio sintético mais consumido é o 17 α -etinilestradiol (17 α -EE2) utilizado como contraceptivos. Os derivados do norgestrel, como o levonorgestrel, são os compostos sintéticos que possuem ação similar a progesterona e estão presentes também nas formulações das pílulas anticoncepcionais além de medicamentos usados em tratamentos de infertilidades, endometrioses e controle de câncer de mama. Além destes, o dietilstilbestrol também é um poderoso estrogênio sintético utilizado para o controle de natalidade. A exposição contínua a essas substâncias tem sido associada a efeitos alarmantes nos processos de desenvolvimento e reprodução como a feminilização de machos, decrescimento da fertilidade e hermafroditismo.

Exceto para contracepção, os tratamentos que mais utilizam estrógenos sintéticos são as terapias de reposição hormonal para controle da menopausa e no tratamento do câncer de próstata e câncer de mama em mulheres em pós-menopausa. Nestes tratamentos as mulheres ingerem diariamente entre 20 e 50 μ g de estrogênios. Em alguns anticoncepcionais orais são ingeridos até 500 μ g diários.

1.3.3. FITOESTROGÊNIOS

Plantas estrogênicas, chamadas de fitoestrôgenicas, possuem compostos que podem atuar como interferentes endócrinos com o auxílio da flora bacteriana intestinal, de enzimas, vitaminas e minerais. Em torno de vinte fitoestrôgenios foram identificados em plantas como o trigo, a aveia, cevada, arroz, maçã, cereja, batata, cenoura, ervilha, feijão, salsinha, alho e café, mas somam mais de 12.000 compostos químicos naturais. Os fitoestrogênios competem com os outros para se conectarem aos receptores estrogênicos bem como influenciam, positivamente, no metabolismo estrogênico (Lintelmann *et al.*, 2003). Como os hormônios naturais, os fitoestrogênios são facilmente metabolizados pelo organismo e distribuídos pelo sistema orgânico, em um curto espaço de tempo. As isoflavonas da soja são uma das fontes de fitoestrogênios melhor estudadas. Uma de suas formas, a genisteína, demonstrou ter atividade

citostática contra uma série de células de câncer de mama humanas *in vitro* e suprimiram tumores mamários em ratas (Lamartiniere *et al.*, 1995; Murrill *et al.*, 1996; Rowel *et al.*, 2005).

Dentre os fitoestrogênios, a genisteína é o composto encontrado em maior abundância nos corpos d'água e que está presente em maiores concentrações. Em amostras de água superficial da Alemanha foram determinados três isoflavonas: norringenina, dadizeina em concentrações de cerca de 17 ng L^{-1} , aproximadamente, e a genisteína em concentrações mais elevadas, entre 400 e 1.300 ng L^{-1} . Nesses locais foram observados efeitos prejudiciais na reprodução dos peixes, o que foi associado à alta concentração desse composto (Lintelmann *et al.*, 2003).

1.3.4. XENOESTROGÊNIOS

A expressão “xenoestrogênios” é aplicada livremente a uma série de substâncias químicas sintetizadas industrialmente que confundem os receptores celulares dos estrogênios no organismo, interferindo nas mensagens bioquímicas naturais. São assim classificados quanto a sua ação no organismo, não importando a estrutura química do composto. Dessa forma, podem ser compostos tipo estrogênios ou terem a habilidade de mimetizar ou bloquear a atividade dos hormônios naturais. Podem também alterar a forma como os hormônios e seus receptores protéicos são elaborados, metabolizados e em sua atuação. Em razão de se degradarem lentamente, ao atingirem os corpos d'água podem difundir-se passando a integrar os tecidos vivos. Atualmente estão presentes em todos os ecossistemas e em alguns organismos vivos. Dificilmente excretados, são lipossolúveis, acumulando-se nos tecidos gordurosos, no cérebro, no aparelho reprodutor e outros órgãos propiciando a bioacumulação em uma cadeia alimentar (Cunningham *et al.*, 1997). Algumas classes de compostos classificados como xenoestrogênicos e que foram estudadas nesse trabalho são os ftalatos, os alquilfenóis e o bisfenol A. Porém, alguns pesticidas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, compostos bromados usados como retardantes de chama, bifenilas policloradas, algumas dioxinas e furanos também estão incluídos nessa classificação (Jardim *et al.*, 2007).

1.3.4.1.FTALATOS

Ésteres ftalatos representam um grupo de compostos químicos que vem sendo largamente utilizados desde os anos 30 em polímeros sintéticos, especialmente no cloreto de polivinila (PVC), comumente usado em embalagens, na estocagem e preservação de alimentos e também na produção de borracha, celulose e estireno para melhorar aspectos como suavidade e flexibilidade desses materiais. Eles estão presentes em inúmeros produtos de uso doméstico tais como brinquedos, chupetas, cosméticos, produtos de higiene pessoal, bolsas de sangue e de soro, papéis de revestimento, inseticidas repelentes, objetos de decoração, etc. Há dez anos atrás, na Alemanha, já eram produzidos cerca de 400.000 toneladas por ano desses compostos, e milhões de toneladas no mundo todo (Fromme *et al.*, 2002).

Os ftalatos podem ser lixiviados das embalagens plásticas para água, bebidas, alimentos, além do sangue, nos casos em que são utilizadas bolsas plásticas nas transfusões. Porém, ainda é o aporte de efluentes industriais sem tratamento adequado, a principal fonte de contaminação dos corpos d'água. Devido ao fato de trazerem um risco potencial à saúde humana, diversos órgãos ambientais estabeleceram limites máximos na concentração desses compostos. A União Européia publicou uma lista de substâncias com evidências ou potencial interferência endócrina, e nela estão incluídos o dibutilftalato, butilbenzilftalato e di-2-etilexilftalato e, juntamente com a Organização Mundial de Saúde estabeleceram o valor máximo de $8,0 \mu\text{g L}^{-1}$ em água potável (EU Council, 2001; WHO, 2003). Para o di-2-etilexilftalato, um dos ftalatos mais produzidos e todo o mundo, a USEPA recomenda que concentrações inferiores a $6,0 \mu\text{g L}^{-1}$ possa estar presente na água tratada (USEPA, 1991).

A exposição do homem a esses compostos ocorre por meio da ingestão, principalmente os ftalatos usados como plastificantes, como é o caso do dibutilftalato e dietilftalato, da inalação e cutânea, devido à presença desses compostos em diversos produtos de higiene pessoal e cosméticos, sendo essa última, considerada a maior fonte de exposição. Quando ingeridos, os ftalatos são rapidamente metabolizados em seus respectivos monoésteres e a cadeia lipofílica é oxidada. Os monoésteres e os

metabólitos oxidados dos ftalatos podem ser conjugados aos glucuronídeos e ambos, nas formas livres e conjugados são excretados pela urina e fezes.

1.3.4.2. ALQUILFENÓIS

Os alquilfenóis são basicamente grupos alquila de diferentes tipos e tamanhos ligados a um anel aromático que contém uma ligação OH (fenóis). Os derivados mais importantes são os etoxilados e carboxilados, que possuem um grupo etoxila ou carboxila substituindo o hidrogênio do OH.

Os alquilfenóis etoxilados são surfactantes não-iônicos usados em formulações de detergentes de uso industrial e doméstico no mundo todo a mais de quarenta anos. Também são usados na produção de resinas fenólicas, como aditivos plásticos, emulsificantes, agentes umificantes e em formulações de agrotóxicos. A produção anual de alquilfenóis etoxilados no mundo alcançou 390.000 toneladas em 2002 (Lintelmann *et al.*, 2003). Possuem uma característica particular relacionada com a geração de sub-produtos durante processos de tratamento baseados na biodegradação. Os processos biológicos empregados para o tratamento de soluções contendo alquilfenóis etoxilados em ETE geram alquilfenóis mais tóxicos e mais persistentes no ambiente (Ahel *et al.*, 1994). Os compostos mais comuns dessa classe são o octilfenol e o nonilfenol, sendo também os que apresentam maior estrogenicidade. A principal fonte desses compostos para o meio aquático é proveniente do uso doméstico de surfactantes.

1.3.4.3. BISFENOL A

Bisfenóis são compostos com estrutura química de difenilalcanos hidroxilados, que contêm dois anéis aromáticos unidos por uma ligação de carbono (Tabela 1). Bisfenóis com grupo OH na posição *para*, e configuração angular, como o bisfenol A, são apropriados a fazerem ligações de hidrogênio com os sítios receptores estrogênicos.

O bisfenol A é uma substância amplamente utilizada nos processos industriais. A principal aplicação é como monômero na produção de policarbonato (71 % do que é

produzido destina-se a esse fim), e resinas-epóxi (27 %), além de aditivos de resinas de poliéster-estireno insaturadas e retardantes de chama. Em 1999 foram produzidos cerca de 2.000 milhões de toneladas e estima-se que em 2005 a produção alcançou 3.500 milhões de toneladas do produto (BKH, 2005).

Com base no alto volume de bisfenol A que é produzido mundialmente, e pelo fato de ser um produto com diversas aplicações, é provável que este aporte no ambiente por diferentes fontes. A maior contribuição é devida aos processos de produção e manufatura do bisfenol A, despejos de efluentes industriais sem tratamento adequado, e uma pequena contribuição pode ser atribuída à lixiviação dos produtos finais de consumo. São compostos persistentes à biodegradação. O tempo de meia-vida do bisfenol A em águas superficiais é de 1 a 150 dias, e em águas subterrâneas esse tempo pode dobrar. Pode ser decomposto microbiologicamente ou por meio de fotólise pela absorção de energia em 290 nm, sendo que esse potencial é aumentado em matrizes aquáticas com pH básico. Nos solos a meia vida do bisfenol A pode variar de 1 a 180 dias aproximadamente e no ar esse valor é bem menor, entre 0,7 e 7,4 horas, pois nessa matriz é rapidamente decomposto pelos radicais hidroxilas.

1.4. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E ESTROGENICIDADE

O destino e comportamento dos compostos no ambiente e nas ETE são influenciados por suas propriedades físico-químicas, as quais regem a partição na água, solo ou biota. Compostos com baixa solubilidade e alto coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}), geralmente estão presentes em tecidos gordurosos da biota, o que promove a bioacumulação na cadeia alimentar. O K_{ow} também pode determinar a sorção efetiva e a afinidade dessas substâncias pela matéria orgânica. São verificados dois mecanismos de sorção: a absorção, que trata de interações hidrofóbicas caracterizadas pelo valor de K_{ow} ; e a adsorção que está relacionada com interações eletrostática e a tendência da substância de se dissociar no meio aquoso, a qual é caracterizada pela sua constante de dissociação, pK_a . Para serem facilmente

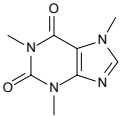
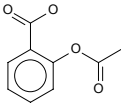
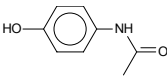
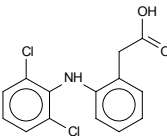
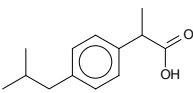
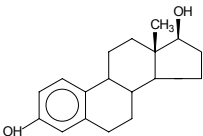
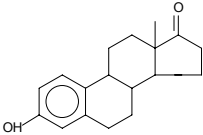
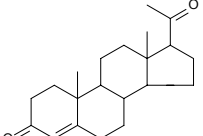
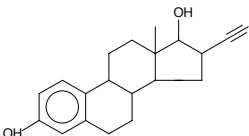
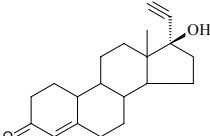
transportados pelos corpos d’água os contaminantes devem apresentar alta solubilidade em água (ϕ). A Tabela 1 apresenta as propriedades físico-químicas dos quinze compostos que foram estudados nesse trabalho.

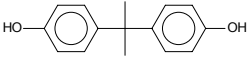
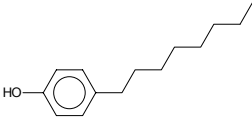
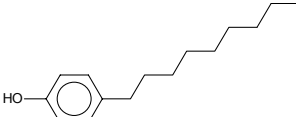
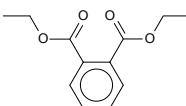
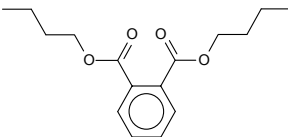
De acordo com essas propriedades, os contaminantes podem ser divididos em três grandes grupos: os lipofílicos, com alto valor de K_{ow} ; os básicos ou não-iônicos; e os compostos ácidos, que apresentam hidrofiliicidade e são iônicos. Os hormônios naturais e sintéticos, bem como os xenoestrogênios apresentam natureza lipofílica. A cafeína e o paracetamol são exemplos de compostos básicos com valores de pK_a elevados, acima de 9 e $\log K_{ow}$ entre 0,01 e 0,5, apresentam alta solubilidade em água, por isso são encontrado em maiores concentrações em matrizes aquáticas. E por fim, os fármacos ácidos, AAS, diclofenaco e ibuprofeno são compostos de natureza hidrofílica, que tendem a se dissociar mais facilmente em meio aquoso. Condições tais como, temperatura, pH, salinidade, existência de substâncias húmicas ou material particulado, influenciam significativamente na solubilidade e destino desses compostos, facilitando ou dificultando sua degradação no meio natural. Os fármacos e a cafeína dificilmente se bioacumulam, pois apresentam baixa afinidade com tecidos gordurosos.

Os valores $\log K_{ow}$ para os estrogênios livres (17β -estradiol, estrona e estriol) estão entre 2,45 e 4,01. No entanto, a esterificação com gluconídeos ou ácidos alteram drasticamente as propriedades físico-químicas desses estrogênios que, quando conjugados passam a ser mais hidrofílicos e menos ativos biologicamente podendo permanecer por mais tempo em ambientes aquáticos (Birkett e Lester, 2003).

Os alquilfenóis são compostos que possuem baixa solubilidade em água, baixa pressão de vapor ($2,9 \times 10^{-6}$ atm a 25 °C para o nonilfenol) e $\log$ de K_{ow} próximo de 4, portanto estão presentes em todas as matrizes, mas muito pouco no ar (Muller e Schlatter, 1998). Em Taiwan foram encontrados alquilfenóis em concentrações entre 61 e 370 ng L⁻¹ em matrizes aquáticas, 27 e 190 ng g⁻¹ em sedimentos e 20 e 5190 ng g⁻¹ na biota, sendo que essas concentrações variaram significativamente com a sazonalidade. No inverno obtiveram-se concentrações superiores aquelas obtidas no verão (Cheng et al., 2006).

Tabela 1: Estrutura e propriedades físico-químicas dos compostos estudados em função de suas classes.

Compostos	Estrutura	Fórmula	M (g mol⁻¹)	pK_a	Log K_{ow}	φ_{sat} à 25 °C (mg L⁻¹)
Cafeína		C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194,19	10,0	0,01	21.700
Fármacos						
AAS		C ₉ H ₈ O ₄	180,16	3,5	1,19	3.300
Paracetamol		C ₈ H ₉ NO ₂	151,16	9,4	0,46 - 0,49	NE
Diclofenaco		C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	296,15	4,0 - 4,2	4,50 - 4,80	2,4
Ibuprofeno		C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206,29	4,9 - 5,7	3,50 - 4,50	21
Hormônios naturais						
17β-Estradiol		C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272,38	10,5 - 10,7	2,69 - 4,01	12,9
Estrona		C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270,37	10,3 - 10,8	2,45 - 3,43	12,4
Progesterona		C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314,46	- -	3,62	5,6 - 8,8
Hormônios sintéticos						
17α-etinilestradiol		C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296,41	10,4	3,67 - 4,15	0,5
Levonorgestrel		C ₂₁ H ₂₈ O ₂	312,45	NE	NE	2,1
continua						

continuação						
Compostos	Estrutura	Fórmula	M (g mol ⁻¹)	pK _a	Log K _{ow}	φ _{sat} à 25 °C (mg L ⁻¹)
Xenoestrogênios						
Bisfenol A		C ₁₅ H ₁₆ O ₂	228,29	10,2	2,5 - 3,3	120
4-Octilfenol		C ₁₄ H ₂₂ O	206,32	NE	4,02 - 4,22	19
4-Nonilfenol		C ₁₅ H ₂₄ O	220,35	10,7	4,36 - 4,60	6,0
Diethylftalato		C ₁₂ H ₁₄ O ₄	222,24	--	2,35	400
Dibutilftalato		C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278,34	--	4,57	13

Fontes: Hilton e Thomas, 2003; López de Alda e Barceló, 2001; The Merck index, 1997; Roberts e Thomas, 2006; Kolpin *et al.*, 2002; Carballa *et al.*, 2005; López de Alda *et al.*, 2003; López de Alda e Barceló, 2001; Gardinali e Zhao, 2002; Fatoki e Noma, 2002; Mozaz *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2003; Lintelmann *et al.*, 2003; Muller e Schlatter, 1998. Nota: NE – valor não encontrado na literatura.

A toxicidade dos alquilfenóis aumenta com o decréscimo no tamanho da cadeia alquímica. Dessa forma, o octilfenol e o nonilfenol são os compostos que apresentam o maior potencial estrogênico. Para os derivados etoxilados, foi verificado que a toxicidade aumenta com o decréscimo da cadeia etoxila. Os alquilfenóis etoxilados são facilmente biodegradados em estações de tratamento de esgoto e produtos tóxicos como o *p*-nonilfenol e *p*-nonilfenol etoxilados são formados, os quais apresentam atividade estrogênica. O produto da degradação tem a hidrofobicidade aumentada comparada aos precursores, no qual valores de log de K_{ow} entre 3,9 e 6,0 são encontrados. Devido a esse aumento no coeficiente de partição octanol-água os metabólitos mostram uma tendência à bioacumulação nos organismos. Algas, peixes, patos, mexilhão e caranguejo, todos bioacumulam nonilfenol e derivados (Lintelmann *et al.*, 2003).

O bisfenol A é distribuído entre ar, água, solo, sedimento e compartimentos da biota. Por possuir alta solubilidade em água (120 mg L^{-1}), baixa pressão de vapor ($5,32 \times 10^{-6} \text{ Pa}$ a 25°C) e baixa constante de Henry ($10^{-5} - 10^{-6} \text{ Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$) apresenta moderada partição entre água e ar. Com base nos valores de log de K_{ow} (2,5 e 3,3) pode-se esperar que haja adsorção pelos materiais particulados, além de serem lipofílicos e terem o potencial de bioconcentração.

Desde 1936 tem sido reportada a atividade estrogênica do bisfenol A (Dodds e Lawson, 1936). Recentemente, estudos *in vitro* investigaram a estrogenicidade desse composto que se mostrou capaz de estimular a síntese e proliferação de células cancerígenas, desalojando o 17β -estradiol do seu sítio receptor. Outros estudos realizados em ratos mostraram que baixas concentrações de bisfenol A, cerca de $2 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ em doses diárias, foram suficientes para provocarem efeitos nos órgãos sexuais e com doses diárias de $20 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ houve redução no número de espermatozóides dos ratos. Pesquisas realizadas em peixes da espécie *Pimephales promelas*, expostos a concentrações entre 1 e $1280 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de bisfenol A, mostraram uma redução na fertilidade desses animais, a qual aumentou com o passar das gerações (Lintelmann *et al.*, 2003).

Em muitos estudos, a estrogenicidade dos compostos xenoestrogênios é comparada àquela do hormônio natural 17β -estradiol (Lintelmann *et al.*, 2003). No caso dos ftalatos, a toxicidade aguda é relativamente baixa e a estrogenicidade dos compostos dessa classe é cerca de seis a sete ordens de magnitude menores que o 17β -estradiol. Porém, estudos ecotoxicológicos têm mostrado que alguns produtos da degradação podem apresentar maior atividade estrogênica do que o composto original (Rao e Schwetz, 1982). No entanto, o que preocupa e vem sendo alvo de pesquisas são os efeitos de sinergismo, principalmente com o 17β -estradiol, que pode ser o responsável pelo aumento do potencial estrogênico desses compostos no ambiente. Os valores de log K_{ow} para os compostos dessa classe aumentam com o aumento no tamanho da ramificação e valores entre 1,4 e 13 são encontrados para o dimetilftalato e bis-1-octilftalato, respectivamente, o que lhes confere caráter lipofílico, podendo dessa forma, serem biomagnificados ao longo da cadeia trófica (Fatoki e Noma, 2001). O

potencial estrogênico relativo dos diferentes ftalatos foi classificado na seguinte ordem: butilbenzilftalato > dibutilftalato > diisobutilftalato > dietilftalato > diisonilftalato.

Um biomarcador bastante usado para avaliar a exposição de alguns tipos de organismos à substâncias com atividade estrogênica é a determinação de níveis de vitelogenina no plasma sanguíneo de um organismo. Vitelogenina é uma proteína que desempenha um importante papel no sistema reprodutivo de vertebrados ovíparos fêmeas. É sintetizada no fígado, regulada por estrogênio e transportada através do sangue para os ovários, onde serão incorporadas aos óvulos promovendo seu crescimento. O gene do vitelogenina também está presente em organismos machos, mas sob condições normais não é expresso, possivelmente regulado pela baixa concentração de estrogênio no sangue. O aumento de vitelogenina no plasma de um organismo é considerado uma evidência da exposição às substâncias com atividade estrogênica. Tem sido observado que alguns organismos aquáticos respondem com o aumento na síntese de vitelogenina como resposta à exposição a determinadas concentrações de estrogênios. Um experimento com tartarugas da espécie *Chrysemys picta*, mostrou que as tartarugas fêmeas expostas a estrogênios respondem com altos níveis de vitelogenina no plasma, levando a alterações no sistema reprodutivo desses animais. Outros estudos em laboratório mostraram que vários xenoestrogênios tais como bisfenol A e os alquilfenóis, possuem a capacidade de estimular a produção de vitelogenina, principalmente em peixes, onde esse tipo de ensaio é comumente realizado (Bila e Dezotti, 2003). No entanto, esses estudos podem refletir a exposição a vários compostos e não apenas um único, o que melhor representa o ambiente natural. Foi dessa forma que a presença de interferentes endócrinos em águas naturais foi apontada como o principal aspecto responsável pelo aumento na população de peixes fêmeas em rios da Inglaterra. Em 1986, Wester e Canton demonstraram que a feminilização de peixes ocorreu devido à ação de alguns compostos orgânicos presentes na água, como por exemplo o β -hexaclorocicloexano, por meio da indução à produção de vitelogenina em peixes machos.

O impacto dos interferentes endócrinos sobre algumas espécies de seres vivos somente é observado quando os organismos são continuamente expostos. Nos exemplos citados anteriormente, todos os efeitos adversos à biota foram causados

devido à exposição crônica aos xenoestrogênios. Isto significa que os efeitos destas substâncias podem surgir mesmo quando um organismo é exposto a concentrações baixas, porém por um período de tempo longo.

Um dos exemplos mais conhecidos no meio científico é o episódio envolvendo a contaminação de crocodilos no lago Apopka (Flórida/EUA), na década de 80. Na ocasião, alguns pesquisadores notaram que a população desses animais estava diminuindo ano a ano. Estudos subsequêntes demonstraram que a exposição contínua à alguns praguicidas, mesmo em concentrações baixas, sobre os ovos da espécie interferiu no desenvolvimento do sistema reprodutor dos animais, tornando-os inférteis (Sumpter e Johnson, 2005).

Pouco se sabe sobre os riscos à saúde humana provocados pela exposição a essas substâncias classificadas como interferentes endócrinos. Uma evidência dos possíveis efeitos que esses compostos provocariam em seres humanos foi observado entre os anos 50 a 70 com mulheres grávidas que tomaram dietilstilbestrol, que é um estrogênio sintético prescrito para evitar aborto espontâneo e promover o crescimento do feto. A maioria das filhas dessas mulheres nasceu estéril e algumas desenvolveram um tipo raro de câncer vaginal. Nos filhos, provocou anormalidade nos órgãos sexuais, baixa contagem de espermatozóides e tendência a desenvolverem câncer nos testículos (Birkett e Lester, 2003).

Um outro estudo recente (Swan *et al.*, 2007) mostrou que a fase embrionária humana é muito mais suscetível à ação dos interferentes endócrinos em comparação ao indivíduo adulto. Foi evidenciado que os hormônios empregados como promotores do crescimento do gado, assim como os praguicidas utilizados para a melhoria da pastagem foram responsáveis pela redução da taxa de espermatozóides em homens gerados por mulheres que ingeriram muita carne vermelha durante a gravidez. Observou-se ainda que os filhos de mães que consumiram carne vermelha em uma frequência de mais de sete vezes por semana, apresentaram redução de 25 % no número de espermatozóides gerados e, cerca de 18 % dos indivíduos apresentaram subfertilidade, considerando-se o limite estabelecido pela Organização Mundial de Saúde.

Segundo a USEPA, atualmente, existem diversas substâncias químicas suspeitas de causar efeitos adversos à saúde humana os quais estão relacionados a alterações no sistema endócrino, incluindo efeitos no sistema reprodutivo feminino, como a diferenciação sexual, aumento do risco de câncer de mama e de vagina, ovários policísticos e endometriose; e no sistema reprodutivo masculino são associados efeitos como a redução na produção de espermatozóides, aumento do risco de câncer testicular e de próstata, infertilidade e alterações nos níveis hormonais da tireóide. (USEPA, 1997).

1.5. FONTES, DESTINO E COMPORTAMENTO NO AMBIENTE.

Fontes pontuais são definidas como entrada direta dos poluentes no ambiente, sendo facilmente identificadas e diagnosticadas e, por este motivo, possível de se estabelecer medidas de controle ou, em alguns casos, ações que visem punir os responsáveis pelo descarte de resíduos que não se enquadram à legislação vigente. Estas fontes estão, geralmente, associadas ao descarte de efluentes a partir de estações de tratamento de efluentes industriais, estações de tratamento de esgoto, fossas sépticas e ao próprio esgoto bruto. Ao contrário das fontes pontuais, as fontes difusas, são aquelas cuja origem não pode ser facilmente identificada. Emissões difusas ocorrem em extensas áreas e, associadas à chuva e ao escoamento que dela resulta, chegam aos corpos de água de forma intermitente. As principais fontes que contribuem para o aporte de contaminantes de maneira difusa são as deposições atmosféricas úmida e seca, a lixiviação de compostos do solo e a drenagem de águas pluviais em ambientes rurais e urbanos. As fontes difusas podem afetar direta ou indiretamente a qualidade dos corpos d'água, porém a sua contribuição é muito pequena quando comparadas às fontes pontuais. Estas últimas são as principais responsáveis pela presença de diversos contaminantes no meio. A Tabela 2 apresenta as principais fontes de contaminação de águas superficiais incluindo rios, córregos, lagos, estuários e mar e os prováveis contaminantes que delas provém.

Tabela 2: Principais fontes dos contaminantes emergentes nas águas superficiais (adaptado de Birkett e Lester, 2003).

Fontes	Tipo de fontes	Compostos emergentes provavelmente presentes
Esgoto doméstico	pontual	hormônios naturais e sintéticos, alquilfenóis, ftalatos, bisfenol A, fármacos, cafeína
Esgoto industrial	pontual	alquilfenóis, ftalatos, bisfenol A, pesticidas, BPC, HPA, retardantes de chama
Efluente industrial	pontual	ftalatos, bisfenol A, pesticidas, BPC, HPA, retardantes de chama, dioxinas
Desflúvio agrícola	difusa	pesticidas, HPA
Desflúvio pecuário	difusa	hormônios naturais e sintéticos, antibióticos, fármacos veterinários
Desflúvio urbano	difusa	pesticidas e HPA, retardantes de chama
Deposição atmosférica	difusa	HPA, BPC, pesticidas, dioxinas, furanos, retardantes de chama
Natural	difusa	HPA, estrogênios naturais e ftoestrogênios

Hormônios naturais e sintéticos são excretados diariamente pela urina e em menor proporção pelas fezes. Apesar de possuírem meia vida relativamente curta (cerca de 2 à 6 dias), os estrógenos naturais são continuamente lançados no ambiente, o que lhes concede um caráter de persistência. Embora, grande parte dos estrógenos sejam metabolizados e excretados na forma inativa, conjugada com glucuronídeos e sulfatos, a ação de enzimas produzidas por bactérias comumente encontradas em áreas de despejo de efluentes facilmente os biotransformam em compostos biologicamente ativos e passíveis de desencadear efeitos principalmente a biota. Vários organismos excretam quantidades diferentes de hormônios dependendo da idade, do estado de saúde, da dieta ou do estado de gestação (Johnson *et al.*, 2000). A Tabela 3 mostra uma estimativa das taxas de excreção diárias dos principais estrógenos naturais e do 17 α -etinilestradiol em seres humanos. Estrogênios naturais e sintéticos, bem como os fármacos e a cafeína surgem no ambiente devido, principalmente, às deficiências no serviço de água e esgoto. Seja pela falta de coleta, seja pela ineficiência do método de tratamento. Se fizermos uma estimativa baseada nos dados da Tabela 3, podemos concluir, por exemplo, que são lançados diariamente cerca de meia tonelada de 17 β -estradiol por dia nos esgotos de todo o Brasil.

Tabela 3: Excreção diária (μg) de 17β -estradiol, estrona, estriol e 17α -EE2 por seres humanos e a meia vida desses compostos (Johnson *et al.*, 2000).

Excreção ($\mu\text{g dia}^{-1}$)	<i>17β-estradiol</i>	<i>Estrona</i>	<i>Estriol</i>	<i>17α-etinilestradiol</i>
Homens	1,6	3,9	1,5	
Mulheres em menstruação	3,5	8,0	4,8	
Mulheres em menopausa	2,3	4,0	1,0	
Mulheres em gestação	259	600	6000	
Mulheres	-	-	-	35

A Figura 4 ilustra as rotas de exposição de hormônios, como exemplo, para diversos compartimentos ambientais. Os solos e sedimentos são outras matrizes onde é possível encontrar essas substâncias, principalmente aquelas que possuem afinidade ao material particulado. A remoção destes contaminantes emergentes do esgoto bruto depende tanto dos processos empregados nas estações de tratamento, quanto das características físico-químicas de cada composto (Tabela 1, página 18). A natureza hidrofóbica de alguns interferentes endócrinos, estimada com base nos valores de K_{ow} , favorece a ocorrência de reações de adsorção no material particulado em suspensão. Assim, em estações de tratamento de água ou esgoto, por exemplo, é esperado que técnicas de separação mecânica, como a sedimentação, promovam uma remoção significativa de vários compostos orgânicos, além do enriquecimento do lodo de esgoto com estas substâncias. Na maioria das estações de tratamento convencionais, os principais mecanismos de remoção de compostos orgânicos envolvem (1) a adsorção em sólidos suspensos, (2) a associação dos compostos com ácidos graxos e óleos, (3) a biodegradação aeróbica ou anaeróbica, (4) a degradação química por processos de hidrólise ou nitrificação e (5) a volatilização. Entretanto, muitos interferentes endócrinos apresentam características físico-químicas que favorecem a sua permanência no efluente final, sem que haja remoção significativa dos compostos. O bisfenol A, por exemplo, é bastante solúvel em água e a sua remoção por processos convencionais de tratamento é, relativamente, baixa (cerca de 55 %); já o dietilftalato, apresenta porcentagem de remoção de aproximadamente 95 % neste mesmo processo (Birkett e Lester, 2003).

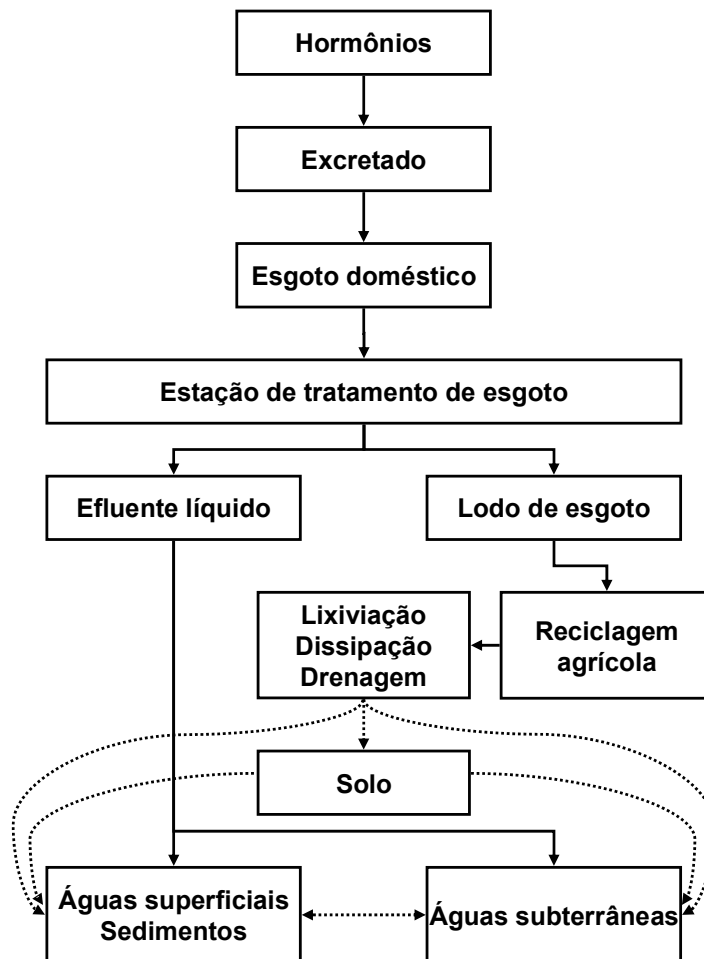


Figura 4: Rotas potenciais de exposição de hormônios humanos no ambiente (adaptado de Lintelmann *et al.*, 2003).

A fotodegradação ocorre naturalmente em matrizes aquáticas através da incidência de luz solar. É um processo radicalar onde as condições do meio interferem na eficiência da degradação. No entanto, não pode ser considerada a principal maneira de remoção dos contaminantes do ambiente, pois com exceção do AAS, os demais compostos orgânicos dificilmente são fotodegradados.

Além das estações de tratamento convencionais, têm sido encontrados na literatura diversos trabalhos envolvendo a degradação química ou biológica de contaminantes emergentes. Técnicas envolvendo Processos Oxidativos Avançados têm mostrado a degradação de compostos em laboratório, embora em matrizes naturais, as características do meio influenciam na eficiência de degradação. O diclofenaco, que é

parcialmente removido nas ETE e dificilmente biodegradado, pode ser mineralizado via fotofenton usando um reator com lâmpada que emite em 254 nm (Ravina *et al.*, 2002).

Contudo, o estado de degradação das águas superficiais destinadas ao abastecimento público comprometem a qualidade da água potável servida à população. Países como Canadá, Estados Unidos, Espanha e Alemanha vêm determinando alguns desses compostos tais como 4-nonilfenol, bisfenol A, 17 β -estradiol, estrona e 17 α -EE2, em água potável em concentrações entre 0,5 ng L⁻¹ e 16 ng L⁻¹ para 17 α -EE2 e nonilfenol, respectivamente. No Brasil concentrações cerca de 1000 vezes maiores foram determinadas para bisfenol A, 17 β -estradiol e 17 α -EE2, além de outros compostos como a cafeína, dietilftalato e dibutilftalato em concentrações de 400-3.800 ng L⁻¹, 130 -230 ng L⁻¹ e 330-1750 ng L⁻¹, respectivamente (Ghiselli, 2006).

Em um estudo recente realizado em Portugal, foram determinados seis ftalatos (dimetilftalato, dietilftalato, dibutilftalato, butilbenzilftalato, 2-etilexilftalato e bisoctilftalato) em amostras de águas de torneira e mineral. Na água de torneira todos os seis ftalatos foram encontrados, em concentrações entre 30 ng L⁻¹ para o butilbenzilftalato e 520 ng L⁻¹ para o dibutilftalato. Em águas minerais, apenas o dimetilftalato estava abaixo do limite de detecção de 8 ng L⁻¹. Os outros cinco ftalatos foram encontrados em concentrações menores que as determinadas em água de torneira, entre 20 ng L⁻¹ para o butilbenzilftalto e 350 ng L⁻¹ para o dibutilftalato As concentrações do dietilftalato encontradas foram de 190 e 40 ng L⁻¹ para a água de torneira e mineral, respectivamente (Serôdio e Nogueira, 2006).

CAPÍTULO 2

A REGIÃO METROPOLITANA DE CAMPINAS E A SITUAÇÃO DE SANEAMENTO BÁSICO

A Região Metropolitana de Campinas (RCM) é constituída por dezenove municípios. São aproximadamente 2,3 milhões de pessoas que ocupam 3.673 km² do território paulista, conforme ilustrado na Figura 5. Campinas é o maior município, possui área territorial de 796 km² e uma população de 1.059.420 habitantes de acordo com o senso populacional de 2006 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), sendo que 98 % destes vivem na área urbana cuja extensão é de 389 km² o que representa densidade populacional próxima a 2.000 hab/km².

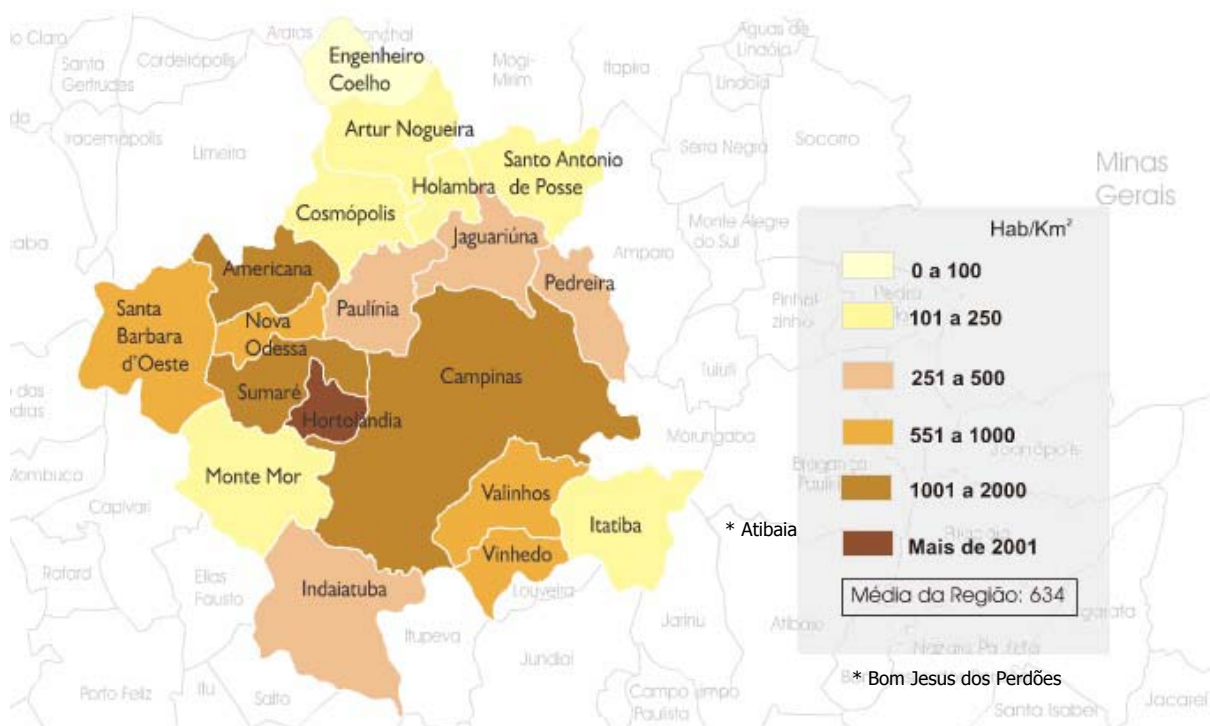


Figura 5: Região Metropolitana de Campinas em função da densidade populacional (CETESB, 2007).

Na RMC o rio Atibaia é considerado um dos mais importantes mananciais com vistas ao abastecimento público. A Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A (SANASA), empresa responsável pelo gerenciamento das águas e dos esgotos do município de Campinas utiliza, durante a captação, 95 % das águas do rio Atibaia e 5 % do rio Capivari (CETESB, 2007; SANASA, 2007).

O Atibaia é um rio de média vazão (cerca de $12 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) formado pela confluência dos rios Atibainha e Cachoeira entre os municípios Atibaia e Bom Jesus dos Perdões, atravessa as cidades de Atibaia e Itatiba antes de chegar à Campinas, depois passa por Paulínia e, em Americana forma o rio Piracicaba a partir de sua confluência com o rio Jaguari. Do rio Atibaia também provém água para o abastecimento público de 90% da população da cidade de Atibaia.

O Capivari é um rio de baixa vazão (cerca de $1,2 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) tem sua nascente na cidade de Louveira, atravessa a cidade de Campinas depois se desenvolve pelos municípios de Monte Mor, Capivari, Rafard e Mombuca, percorrendo cerca de 180 km dentro do Estado de São Paulo e, deságua na margem direita do rio Tietê, assim como os rios Piracicaba e Jundiaí.

Os rios Atibaia e Jaguari pertencem à bacia do Rio Piracicaba, que juntamente com as bacias dos rios Capivari e Jundiaí, formam a Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos 05 (UGRHI-5) do Estado de São Paulo de acordo com a Lei Estadual Nº 9.034 de 1994. A UGRHI está estruturada no conceito de bacia hidrográfica, onde os recursos hídricos convergem para um corpo d'água principal (Figura 6).

A UGRHI-5 onde está localizada a RMC, é composta por 57 municípios, e compreende mais de 11 % da população do Estado e, de acordo com os dados do Plano Estadual dos Recursos Hídricos 2004-2007, 94 % dos habitantes vivem na área urbana. Nessa UGRHI são coletados 84 % do esgoto produzido enquanto que o índice de tratamento é da ordem de 27 % do esgoto gerado. Possui uma área de drenagem de 14.178 km^2 , sendo que os principais rios constituintes são os Capivari e Capivari-mirim; rio Jundiaí, Jundiaí-mirim e Pirai; rios Atibaia, Corumbataí, Jaguari e Piracicaba. Inclui também quatro reservatórios: Atibainha, Cachoeira, Jaguari e Salto Grande em

Americana. Este último é o mais importante, formado pelas águas do rio Atibaia, abrange áreas dos municípios de Americana, Nova Odessa e Paulínia. Ao lado da barragem situa-se a Usina Hidrelétrica Americana, da Companhia Paulista de Força e Luz (CPFL). A represa inunda área de aproximadamente 13 km², o perímetro mede 62 km e o volume total de água é de cerca de 106 milhões m³.

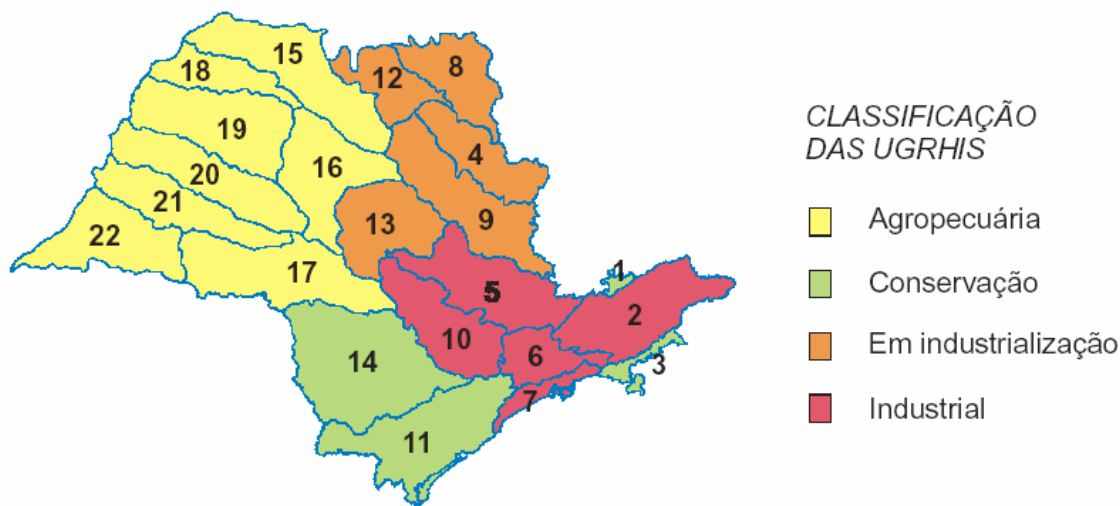


Figura 6: Classificação das 22 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado de São Paulo (CETESB, 2007).

A UGRHI-5 situa-se em um território caracterizado por alta densidade populacional e pela presença de acentuado desenvolvimento industrial sendo as principais atividades a agroindústria e indústrias químicas, têxteis, metalúrgicas e de eletrônica. Na área rural destaca-se a cultura de cana-de-açúcar, laranja, pinus e de eucalipto destinada principalmente à agroindústria presente nessa região. Os corpos d'água são destinados ao abastecimento público e industrial; afastamento de efluentes industriais e domésticos; irrigação; geração de energia e recreação.

SANEAMENTO BÁSICO

Segundo a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (PNSB), desenvolvida pelo IBGE no ano de 2000, a situação de esgotamento sanitário nos municípios brasileiros está longe de serem consideradas satisfatórias. A Tabela 4, apresentada na PNSB, mostra que 47,8 % dos municípios no Brasil não têm coleta de esgoto. O norte é a

região que possui a maior proporção de municípios sem coleta (92,9 %) e o sudeste a menor proporção (7,1 %). O total de municípios que têm apenas serviço de coleta superam a proporção daqueles que coletam e tratam o esgoto, 32 % e 20,2 %, respectivamente. Porém no sudeste, a região do país com a maior proporção de municípios com esgoto coletado e tratado, apenas um terço deles apresenta uma condição adequada de esgotamento sanitário.

Tabela 4: Proporção de municípios, por condição de esgotamento sanitário, segundo as grandes regiões (IBGE, 2002).

Grandes Regiões	<i>Proporção de municípios, por condição de esgotamento sanitário (%).</i>		
	<i>Sem coleta</i>	<i>Só coletam</i>	<i>Coletam e tratam</i>
Brasil	47,8	32	20,2
Norte	92,9	3,5	3,6
Nordeste	57,1	29,6	13,3
Sudeste	7,1	59,8	33,1
Sul	61,1	17,2	21,7
Centro-Oeste	82,1	5,6	12,3

Fonte: IBGE, Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 1989/2000.

Entre 1989 e 2000, o serviço de saneamento nos municípios cresceu em apenas 10 %, e os esforços das entidades se voltaram para a ampliação do tratamento de esgoto coletado. Apesar disso, a PNSB apontou que dos 52,2 % dos municípios que recebem algum tipo serviço de esgotamento sanitário, 66,2 % não dão qualquer tipo de tratamento ao esgoto produzido, que é despejado *in natura* nos corpos de água ou no solo, comprometendo a qualidade da água utilizada para o abastecimento, irrigação e recreação. Do total de municípios brasileiros que não tratam o esgoto sanitário coletado, a grande maioria, 84,6 % despeja o esgoto nos rios, sendo os municípios das regiões norte e sudeste os que mais se utilizam dessa prática, 93,8 % e 92,3 %, respectivamente (IBGE, 2002).

Na RMC todos os municípios são atendidos com serviços de saneamento básico como rede de distribuição de água, rede coletora de esgoto, limpeza e drenagem

urbana e coleta de lixo, porém apenas 15 % do esgoto coletado recebem tratamento. Neste caso, aproximadamente 280 mil m³ de esgoto bruto são descartados diariamente nos rios da região (IBGE, 2002).

Em Campinas, a SANASA atende atualmente 83,7 % da população urbana com coleta de esgoto sanitário, mas apenas 8 % desses despejos são tratados em pequenas estações. A grande maioria da carga dos esgotos sanitários, mesmo aquela coletada e afastada pela rede pública vem sendo lançada em córregos e ribeirões que atravessam a área urbana, comprometendo os demais usos da água disponíveis para a população assentada a jusante, e a qualidade ambiental da região (SANASA 2007).

A preocupação com o estado de degradação dos rios é fundamental para garantir a qualidade da saúde pública da população, pois são deles, rio Atibaia e Capivari que provém a água destinada ao abastecimento público de Campinas. São rios que se enquadram como Classe 2 de acordo com CONAMA 357 de 17/03/2005 nos locais de captação de água, porém de acordo com a SANASA a qualidade da água bruta está adequada para o tratamento de água adotado pela empresa nesses locais, sem riscos a saúde.

Segundo a SANASA, a água distribuída é produzida em cinco estações de tratamento. Todas as ETA são do tipo convencional, utilizando-se processos físico-químicos para a potabilização, abrangendo as unidades de clarificação (floculadores, decantadores e filtros), de desinfecção (cloradores e amoníadores) e de polimento (correção de pH e fluoretação).

A fragilidade das políticas públicas e a precariedade dos serviços de saneamento no país, somada ao crescimento populacional desordenado nas grandes cidades têm sido considerados os principais aspectos responsáveis pela diminuição da qualidade das águas de rios lagos e reservatórios. Além disso, a escassez de recursos financeiros e a inexistência de um planejamento baseado em critérios ambientais, conduziram a um quadro em que, o lançamento de esgoto doméstico não tratado em conjunto com cargas industriais remanescentes, vem causando sérios impactos aos sistemas aquáticos superficiais (CETESB, 2007).

OBJETIVOS

Diante da crescente preocupação quanto ao estado de degradação dos corpos d'água pertencentes às bacias hidrográficas dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí, em especial à bacia do rio Atibaia e sua possibilidade de sustentar o desenvolvimento equilibrado da RMC, a presente dissertação tem como objetivo principal avaliar a ocorrência de quinze compostos nesse recurso hídrico, sendo quatro fármacos: paracetamol, AAS, diclofenaco e ibuprofeno, selecionados pela sua abundância no meio; dez compostos orgânicos classificados como interferentes endócrinos pertencentes a diferentes classes como os hormônios naturais (17β -estradiol, estrona e progesterona), hormônios sintéticos (17α -etinilestradiol e levonorgestrel), plastificantes (dietilftalato e dibutilfitalato), surfactantes (4-nonilfenol e 4-octilfenol) e o bisfenol A; e a cafeína usada como um traçador de atividade antrópica.

Para isso foi convalidado, com base em métodos já descritos na literatura, um procedimento analítico para a extração, concentração e quantificação destes compostos utilizando Extração em Fase Sólida (SPE) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), empregando os detectores de arranjo de diodos (DAD) e fluorescência (FL).

CAPÍTULO 3

EXPERIMENTAL

O trabalho experimental foi dividido em três etapas. Na primeira etapa do trabalho foi adaptado, a partir da literatura pertinente, um procedimento para a determinação dos compostos escolhidos para monitoramento, utilizando SPE-HPLC-DAD/FL. A segunda etapa do trabalho consistiu da validação do método empregado, e na terceira etapa foram analisadas amostras de água superficial dos rios da RMC em quatro campanhas amostrais.

3.1. PRIMEIRA ETAPA: MÉTODO ANALÍTICO

Inicialmente foi adaptado, um procedimento para a separação e quantificação dos quinze compostos escolhidos empregando HPLC-DAD/FL, depois disso, foram avaliados métodos de extração dos analitos da amostra baseados em SPE e LLE.

Devido às baixas concentrações dos compostos de interesse encontrados em ambientes aquáticos naturais, foram adotados procedimentos para reduzir contaminações originadas durante as etapas de amostragem, preservação e pré-tratamento. Desta forma, foram empregados procedimentos fundamentados no uso de técnicas limpas em todas as etapas envolvidas na realização deste trabalho. Todos os materiais e vidrarias foram primeiramente lavados com água corrente, detergente e escova. Em seguida, foram enxaguados exaustivamente com água destilada e água deionizada (Milli-Q, Millipore) e, finalmente, submetidos à limpeza final com álcool e acetona. As vidrarias não-volumétricas, tais como frascos de coleta, funis de separação, entre outros, foram transferidas para secagem em mufla a 400 °C por 4 horas como forma de eliminar resíduos orgânicos. Toda a vidraria volumétrica foi deixada por, no mínimo, 48 h em solução de Extran 8 % (v/v). Durante todo o processo de limpeza, a vidraria foi colocada em bandejas limpas ou em folhas de papel alumínio. Além disso, o manuseio e as etapas de preparo de amostra, incluindo filtração extração e concentração dos analitos, foram realizados em “sala limpa” devidamente adequada

para análises de compostos orgânicos em concentrações-traço. A sala contém sistema de manutenção da qualidade do ar interior, apresentando os níveis de contaminantes e particulados dentro dos limites estabelecidos por norma para a atividade exercida.

A Tabela 5 traz informações sobre os padrões analíticos usados para os 15 compostos determinados nesse trabalho.

Tabela 5: Nome IUPAC, pureza, marca e número CAS dos compostos determinados.

Compostos	Número CAS^a	Marca	Pureza	Nome IUPAC^b
Cafeína	58-08-2	Aldrich	99	3,7-diidro,1,3,7-trimetil-1H-purino-2,6-diona
Fármacos				
Ácido acetilsalicílico	50-78-2	Sigma	99.5	ácido 2-(acetiloxi)-benzóico
Paracetamol	103-90-2	Sigma	98+	4-acetoamidofenol
Diclofenaco	15307-79-6	Sigma	99	2-[(2,6-diclorofenil)amino]benzeno-acetato de sódio
Ibuprofeno	15687-27-1	Sigma	98+	α - metil-4-(isobutil)fenilacetato de sódio
Estrogênios naturais				
17 β -estradiol	50-28-2	Aldrich	97	estra-1,3,5(10)-trieno-3,17 β -diol
Estrona	53-16-7	Aldrich	99+	3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17-ona
Progesterona	57-83-0	Aldrich	98	pregn-4-eno-3,20-diona
Estrogênios sintéticos				
17 α -etinilestradiol	57-63-6	Aldrich	98	19-norpregna-1,3,5(10)-trien-20-ino-3,17 α -diol
Levonorgestrel	797-63-7	Aldrich	99+	(17 α)13 β etil-17 β hidroxi-18,19dinorpregn-4en-20in-3-ona
Xenoestrogênios				
Bisfenol A	80-05-7	Aldrich	97	4,4'-isopropilidenodifenol
Dietilftalato	84-66-2	Aldrich	99.5	di-n-etilftalato
Dibutilftalato	84-74-2	Sigma	99	di-n-butilftalato
4-octilfenol	1806-26-4	Aldrich	99	4-n-octilfenol
4-nonilfenol	104-40-5	Riedel-de Haën	99.9	4-n-nonilfenol

^a CAS: Chemical Abstracts Service , ^b IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

O metanol e o diclorometano utilizados no preparo das amostras foram de grau nanograde (Mallinckrodt) enquanto a acetonitrila utilizada na separação cromatográfica foi de grau HPLC (JT Baker). A água utilizada como fase móvel em todas as análises foi deionizada em sistema de água ultrapura MilliQ com resistividade igual a 18,2 MΩ cm.

3.1.1. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

A separação por HPLC foi realizada em um aparelho Shimadzu, modelo SCL 10AVP, equipado com uma coluna de guarda Shim-pack G-ODS(4) octadecil de 4 mm de diâmetro interno, marca Shimadzu e uma coluna de separação Shiseido Co. modelo CAPCLLE PAK C18 AG120 S-5 µm, de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno. Os solventes utilizados como fase móvel foram degaseificados antes de serem bombeados por uma estação LC 10A DVP. Dois detectores foram empregados nas análises: um detector na região do ultravioleta com arranjo de fotodiodos, modelo SPD-M10VP, e um detector por fluorescência molecular, modelo RF-10A XL, ambos da Shimadzu.

No desenvolvimento da análise cromatográfica foi avaliada a eficiência da separação dos compostos usando como fase móvel (FM) acetonitrila e água. Para isso foram estudados três parâmetros: pH da FM, vazão da FM e tipo de eluição: isocrática ou gradiente.

Para definir o melhor pH da FM foram avaliados cromatogramas obtidos com fase móvel sem o ajuste de pH e com o pH ajustado em 3. Para determinar qual ácido seria o mais adequado para o ajuste da FM ácida foram empregados os ácidos clorídrico, sulfúrico e fosfórico. A vazão da fase móvel escolhida foi 0,8 mL min⁻¹ definida a partir da análise dos picos dos compostos obtidos com vazões que variaram entre 0,4 e 0,8 mL min⁻¹. O volume de injeção manteve-se constante e igual a 20 µL em todas as medidas.

Para identificação dos compostos por ultravioleta foi construído um gradiente de concentração com solução ácida pH 3 (com HCl) e acetonitrila (ACN). A proporção de ACN em água variou de 10 até 90 % em 30 minutos. Em seguida, durante 5 minutos

essa proporção aumentou para 92 % de ACN e, durante mais 2 minutos, variou de 92 a 95 %. Finalmente, essa proporção diminuiu de 95 para 10 % de ACN nos últimos 3 minutos da análise, totalizando 40 minutos de análise cromatográfica.

Nas análises empregando a detecção por fluorescência, a etapa de identificação e quantificação foi precedida de uma relação isocrática (1:1) entre a solução ácida pH 3 e acetonitrila.

3.1.2. EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS

A extração e concentração dos analitos foram feitas com o objetivo de isolar e concentrar os compostos de interesse bem como separá-los das espécies que poderiam interferir na análise.

A remoção de compostos orgânicos da fase aquosa foi feita por SPE e LLE. Nessa primeira etapa foi verificada a eficiência dos dois modos de extração a fim de se obter o procedimento que seria mais adequado à extração simultânea de todos os quinze compostos analisados.

3.1.2.1. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

A extração em fase sólida utiliza uma coluna contendo um sorvente apropriado para reter o analito que é então eluído com o solvente específico. A SPE envolve basicamente quatro etapas: (1) condicionamento do cartucho: uso de solvente adequado para disponibilizar os sítios ativos e para ajustar as forças dos solventes de eluição com o solvente da amostra; (2) extração dos analitos da amostra; (3) lavagem do cartucho para eliminar possíveis interferentes e (4) eluição dos analitos de interesse para posterior análise.

Nesse trabalho foram utilizados cartuchos OASIS HLB (Waters) contendo 500 mg de fase sólida. Este sorvente é usado para adsorver simultaneamente compostos polares e apolares do meio aquoso.

Foram avaliados três procedimentos de extração em fase sólida, um descrito na literatura para determinação de fármacos (Hilton e Thomas, 2003) e outro para determinação de hormônios (Lopez de Alda e Barceló, 2000) sendo que a principal diferença entre os dois é que o método para os fármacos tem o pH da amostra ajustado em 3, enquanto que o segundo não faz nenhum ajuste de pH na amostra. E o terceiro procedimento foi aplicado à extração de cafeína (Chen *et al.*, 2002). A Tabela 6 descreve os principais detalhes desses métodos.

Tabela 6: Descrição dos três procedimentos de SPE avaliados nesse trabalho para a extração simultânea dos 15 compostos de interesse.

Procedimentos	Método 1 (fármacos)	Método 2 (hormônios)	Método 3 (cafeína)
Cartucho extrator	OASIS HLB	OASIS HLB	C18 (Supelco)
	6 mL metanol	5 mL metanol	
Condicionamento	6 mL água MilliQ	7 mL acetonitrila	5 mL metanol
	6 mL solução ácida pH 3 (HCl)	7 mL água MilliQ	5 mL água MilliQ
Volume eluído	1 litro de amostra acidificada pH 3 (HCl)	1 litro de amostra	1 litro de amostra
Secagem do cartucho	15 min com N ₂	15 min com N ₂	Não seca
Lavagem do cartucho	-	-	5 mL de H ₃ PO ₄ pH 3
Eluição os analitos	4 x 3 mL de metanol	4 x 3 mL de acetonitrila	10 mL acetonitrila

A extração foi realizada a vácuo por meio da fixação dos cartuchos em um sistema 12-Port Vacuum Manifold, marca PrepSep. Foram avaliados cartuchos OASIS HLB nos métodos 1 e 2 e, C18 modelo envi-18, de 6 mL, marca Supelco no método 3. As amostras foram passadas pelo cartucho com o auxílio de uma bomba peristáltica (Ismatec - IPC), à vazão de 10 mL min⁻¹. O extrato final foi seco com nitrogênio e o volume foi ajustado para 0,5 mL pela adição de metanol que ficou conservado em geladeira a 4 °C até a análise cromatográfica.

3.1.2.2. EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

A LLE se baseia na partição da amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa) e a sua eficiência esta diretamente relacionada à afinidade do analito pelo solvente de extração, à razão entre as fases e o número de extrações. O coeficiente de partição (K_{ow}), é característico de cada composto, é a constante de equilíbrio da reação:

$$\text{Analito (fase aquosa)} \rightleftharpoons \text{Analito (fase orgânica)} \text{ sendo, } K_{ow} = \frac{[A(\text{orgânica})]}{[A(\text{aquosa})]}$$

Dessa forma, quanto maior o coeficiente de partição, maior será a afinidade do analito pela fase orgânica e conseqüentemente melhor será a eficiência da extração. Assim espera-se que compostos como cafeína, paracetamol e AAS que apresentam valores de $\log K_{ow}$ iguais a 0,01, 0,5 e 1,2, respectivamente, apresentem pouca afinidade com a fase orgânica e conseqüentemente sejam parcialmente extraídos da fase aquosa.

Foi testado um procedimento de LLE realizado de acordo com o método 3510C da USEPA (1996). Em um funil de separação de 2 L, adicionou-se 1 L da amostra e 60 mL de diclorometano. A mistura foi agitada vigorosamente por cerca de 2 minutos e deixada em repouso até a separação completa das fases. A fase orgânica foi passada por um funil contendo lã de vidro e sulfato de sódio anidro e recolhida em um balão de fundo chato e boca esmerilhada de 250 mL, adicionaram-se mais 60 mL de diclorometano e o procedimento foi repetido por mais duas vezes totalizando um volume de 180 mL de extrato orgânico. O volume do extrato obtido foi reduzido para cerca de 5 mL em um rotaevaporador com temperatura de aproximadamente 40 °C. A fase aquosa foi descartada e a extração foi realizada para mais uma alíquota de 1 L da amostra, cujo extrato foi acondicionado no mesmo balão utilizado na extração anterior. Depois de secado quase todo solvente, a alíquota final de aproximadamente 5 mL foi transferida para um frasco de vidro com 10 mL de capacidade. O extrato final foi seco com nitrogênio e o volume foi ajustado para 1,0 mL com metanol que ficou conservado em geladeira a 4 °C até a análise cromatográfica.

3.2. SEGUNDA ETAPA: VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. No entanto não há um procedimento oficial padrão para análise de compostos como os fármacos, hormônios e os xenoestrogênios em matrizes aquáticas, bem como uma legislação que aponte valores de concentrações permitidas, para os compostos considerados contaminantes emergentes, que garantam a preservação da vida aquática. A USEPA vem realizando uma série de testes de toxicidade que possam inferir principalmente sobre a biota, mas esses estudos são recentes e ainda não há um consenso sobre esse assunto.

No Brasil há duas agências credenciadoras responsáveis por verificar a competência dos laboratórios de ensaio, a ANVISA e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). A ANVISA criou a Resolução ANVISA RE nº 899, de 29 de maio de 2003, documento com poder de lei, onde estão apresentados os parâmetros de validação e seus respectivos limites que garantam confiabilidade dos resultados obtidos por determinado método para a determinação de fármacos em produtos farmacêuticos. A Resolução ANVISA RE nº 475, de 19 de março de 2002 é aplicada a métodos bioanalíticos para a determinação quantitativa de fármacos e/ou seus metabólitos em matrizes biológicas, tais como sangue, soro, plasma ou urina. Já o INMETRO disponibiliza um documento guia, mais abrangente, para o procedimento de validação de métodos analíticos, o INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março de 2003, o qual sugere uma conduta de validação sendo aberto a interpretação e adaptação do analista de acordo com o método a ser usado.

A validação do método proposto para esse trabalho consistiu primeiramente da verificação da calibração do cromatógrafo, baseada em parâmetros definidos pela United States Food and Drug Administration (USFDA, 2000) uma vez que a ANVISA e o INMETRO ao estabelecerem suas normas já esperam que os equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e os analistas qualificados e devidamente treinados (ANVISA, 2003), e os parâmetros conformidades do sistema cromatográfico,

estabilidade das amostras e soluções-padrão, seletividade, linearidade, sensibilidade, intervalos da curva analítica, limite de detecção, limite de quantificação e a eficiência da extração em fase sólida foram avaliados baseados nos documentos da ANVISA e do INMETRO descritos acima.

3.2.1. CONFORMIDADE DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Foi verificada a conformidade do sistema cromatográfico para o método analítico proposto. Para isso foi usada uma solução 5 mg L^{-1} contendo os quinze compostos de interesse para análise por HPLC-DAD e uma solução $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ contendo apenas bisfenol A, 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol para análise por HPLC-FL. Os parâmetros verificados foram: fator de retenção, resolução, fator de alargamento e número de pratos, com base na U.S.FDA da mesma maneira que foi realizado para a verificação da calibração.

3.2.2. ESTABILIDADE

A estabilidade das amostras e padrões foi verificada em termos de temperatura e tempo. Nesse trabalho foi construída uma curva analítica com novos padrões a cada campanha e os extratos das amostras foram analisados em um período máximo de 15 dias. Além disso, todos os padrões e amostras foram conservados em geladeira a 4°C e protegidos da luz, envoltos em papel alumínio.

A estabilidade dos padrões foi analisada com três soluções contendo os quinze compostos de interesse em concentrações de 0,5; 1,0 e $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ em três momentos diferentes: (1) t_0 logo que o padrão foi preparado; (2) t_1 depois 1 mês de preparo, imediatamente após ter sido retirado a geladeira e atingido a temperatura ambiente; (3) t_2 24 horas após ter sido analisado em t_1 , porém tendo ficado sobre a bancada a temperatura e luz ambiente. A estabilidade das amostras foi avaliada através da análise do extrato da amostra do rio Capivari na primeira campanha amostral em dois momentos: (1) imediatamente após ter preparado o extrato e; (2) após 1 mês que o extrato foi preparado e mantido sob as condições de preservação.

3.2.3. SELETIVIDADE

Seletividade é a capacidade que um método possui de medir exatamente os compostos de interesse em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003).

Nesse trabalho a seletividade foi verificada de duas maneiras: (1) através da comparação de três cromatogramas: o primeiro referente a uma amostra pura; o segundo referente à mesma amostra, porém foi adicionado a ela antes da extração os quinze compostos em concentrações de $1 \mu\text{g L}^{-1}$; e o terceiro referente a uma mistura dos quinze compostos de concentração $1 \mu\text{g L}^{-1}$ que, assim como a amostra, foi extraída e analisada por HPLC-DAD/FL; (2) comparação do espectro do pico obtido na separação com a de um padrão. Todos os compostos apresentam espectro de absorção no ultravioleta com comprimentos de onda máximos característicos e, portanto uma maneira segura de identificar o composto analisado de um interferente presente na matriz.

3.2.4. CURVA ANALÍTICA

A quantificação dos compostos de interesse nas amostras ambientais foi obtida por padronização externa. As soluções padrão foram preparadas a partir de uma solução mais concentrada obtida pela pesagem do padrão (solução estoque) e as soluções de trabalho foram preparadas por diluição direta da solução estoque.

Os limites de detecção e de quantificação foram obtidos pelo método estatístico recomendado pela ANVISA, determinado pelas equações: $LD = \frac{3s_a}{IC}$ e $LQ = \frac{10s_a}{IC}$, onde s_a é a estimativa do desvio padrão no intercepto com o eixo y de, no mínimo três curvas analíticas construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação e IC é a inclinação da curva analítica.

3.2.4. LINEARIDADE E SENSIBILIDADE

A linearidade foi obtida por padronização externa de acordo com a resolução RE 899 da ANVISA que recomenda como critério mínimo um coeficiente de correlação (r) igual a 0,99. Para o INMETRO um valor de r maior que 0,90 é aceitável. A sensibilidade foi expressa pela inclinação da curva de regressão linear de calibração e determinada simultaneamente aos testes de linearidade.

3.2.6. PRECISÃO

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade através do cálculo da estimativa do desvio padrão absoluto (s) e do coeficiente de variação (CV) para um número de seis repetições, onde são aceitos CV de até 20 %, dependendo da nível de concentração da amostra (INMETRO, 2003).

3.2.7. EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

A eficiência da extração em fase sólida foi avaliada através do teste de recuperação estimado pela análise de amostras adicionadas com quantidades conhecidas dos compostos de interesse e calculada segundo a expressão:

$$Recuperação(\%) = \frac{X_{obtido}}{X_{adicionado}} \times 100, \text{ sendo que os intervalos aceitáveis de recuperação}$$

para análise de compostos em concentrações-traço estão entre 70 e 120 %, com precisão de até 20 % (GARP, 1999).

3.3. TERCEIRA ETAPA: CAMPANHAS AMOSTRAIS

Foram realizadas quatro campanhas amostrais a fim de se obterem dados referentes às variações de sazonalidade na concentração dos compostos nos corpos d'água. Assim, duas campanhas foram realizadas em períodos de elevada pluviosidade. A primeira e a quarta campanha foram realizadas no início de março de 2006 e em janeiro de 2007, respectivamente, contemplando o período de cheias dos rios, e a segunda e terceira campanhas, realizadas no período de estiagem, nos meses de junho e agosto de 2006, respectivamente. Os dados de precipitação úmida diária no período de janeiro de 2006 a fevereiro de 2007 são mostrados na Figura 7 juntamente com as datas das campanhas de amostragem. Segundo a CETESB, o ano de 2006 teve os meses de janeiro e maio mais secos que as médias e, fevereiro e março foram bem mais chuvosos do que os anos anteriores.

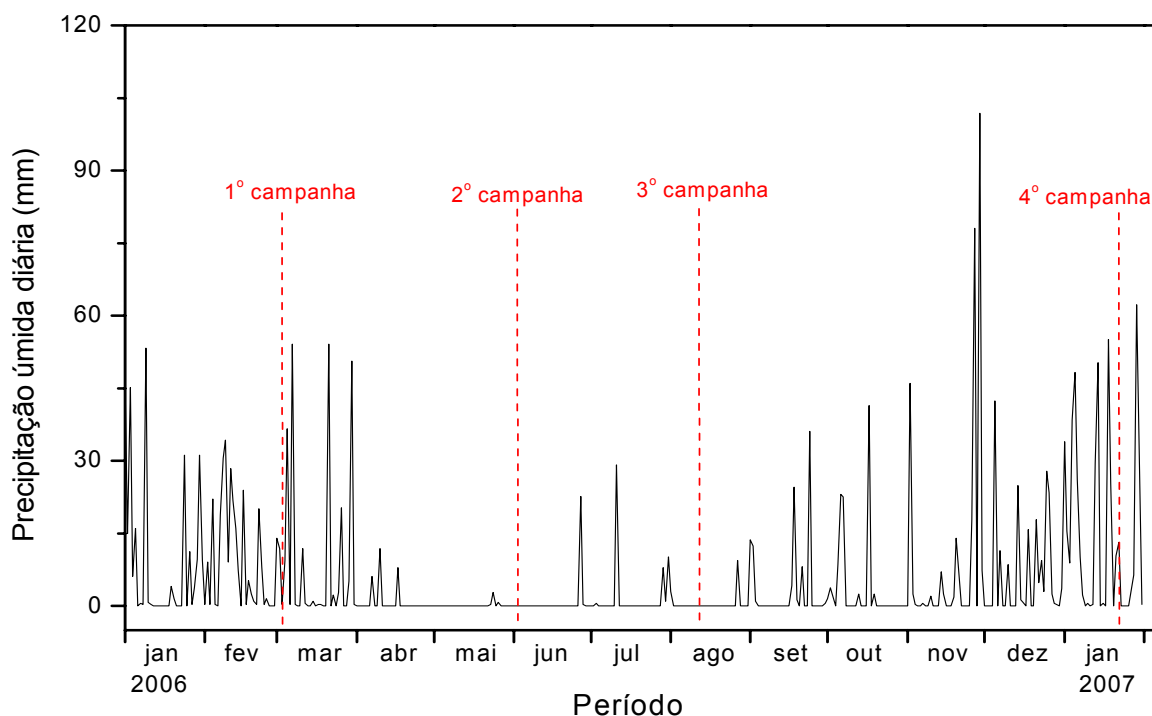


Figura 7: Precipitação úmida diária e datas das campanhas amostrais (AGRITEMPO, 2007).

Na primeira campanha foram selecionados seis pontos amostrais, três localizados no rio Atibaia, além do rio Jundiá, rio Capivari e ribeirão Anhumas. Na segunda campanha foram inseridos dois pontos de coleta, um no ribeirão Pinheiro e outro no rio Atibaia antes do aporte do deste ribeirão. Para a terceira e quarta campanhas foram inseridos mais dois pontos ao longo do rio Atibaia e, de forma a expandir o universo amostral e, conseqüentemente, possibilitar uma avaliação mais detalhada dos resultados obtidos. Todos os pontos de amostragem estão localizados na UGRHI-5 que abrange, dentre outras, as bacias dos rios Piracicaba (a qual inclui a sub-bacia do rio Atibaia), Jundiá e Capivari. A Figura 8 mostra a localização dos dez pontos amostrais abordados nesse trabalho.

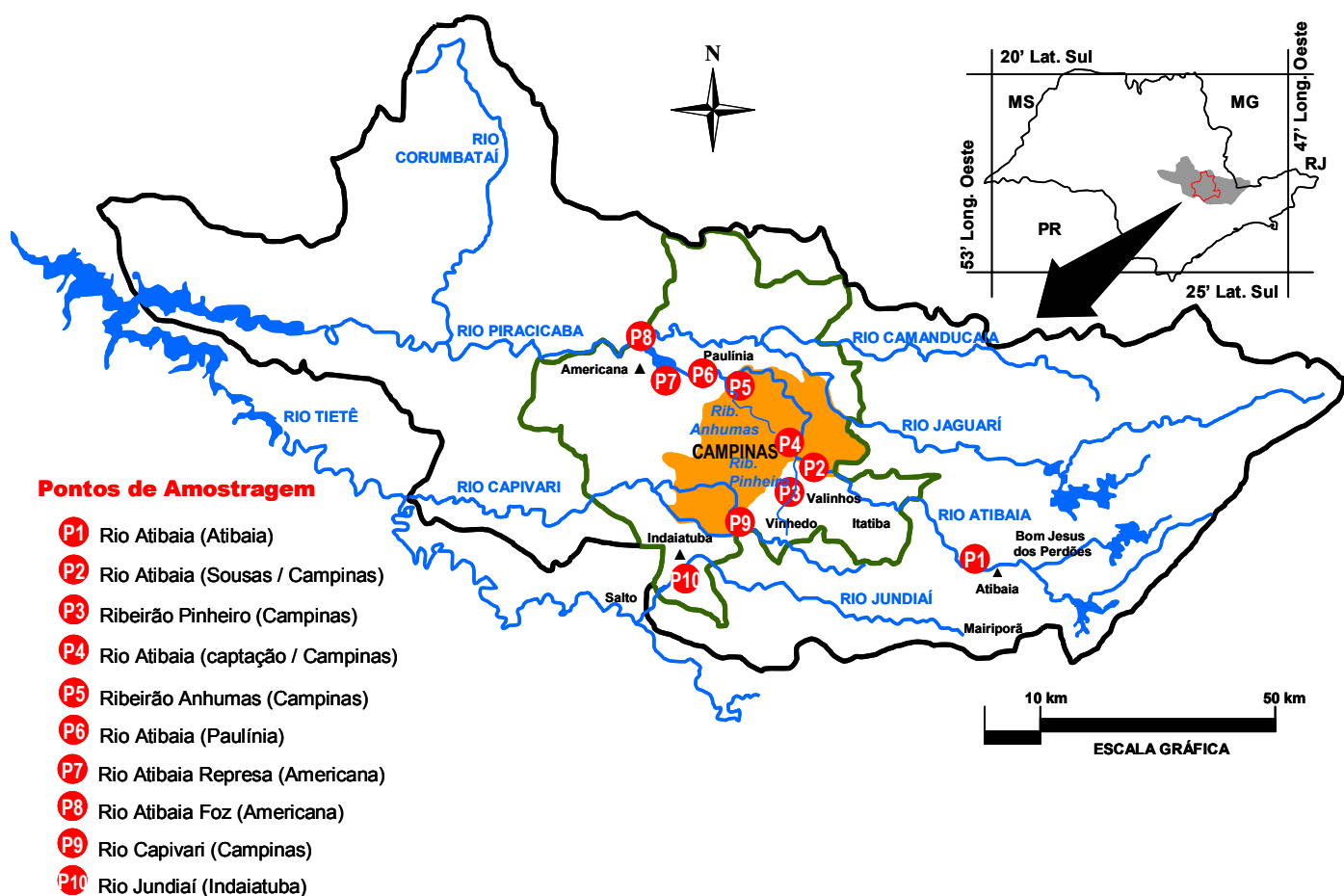


Figura 8: Localização dos pontos de amostragem na UGRHI 5.

Dentre os dez pontos de amostragem selecionados nesse trabalho, seis encontram-se no rio Atibaia, um no ribeirão Anhumas, um no ribeirão Pinheiro, um no rio Capivari e um no rio Jundiá.

O primeiro ponto de amostragem no rio Atibaia (P1) localiza-se na estação de captação de água da companhia de saneamento do município de Atibaia (SAAE) (Figura 9).



Figura 9: Ponto de amostragem P1: rio Atibaia/Atibaia no município de Atibaia à esquerda na primeira campanha (alta pluviosidade) e a direita na terceira campanha (estiagem).

O segundo ponto amostral (P2) também é situado no rio Atibaia, na divisa entre os municípios de Campinas e Valinhos, próximo ao distrito de Sousas, antes do aporte do ribeirão Pinheiro (Figura 10).



Figura 10: Ponto de amostragem P2: rio Atibaia/Sousas no município de Campinas

O terceiro ponto (P3) localiza-se no ribeirão Pinheiros, na ponte à marginal da Rodovia D. Pedro, altura do km 122,5 sentido Campinas, a aproximadamente 100 metros de sua foz no rio Atibaia a montante da estação de captação de água da SANASA. O ribeirão Pinheiro recebe grande quantidade da carga poluidora doméstica dos municípios de Valinhos e Vinhedo e, portanto, encontra-se altamente impactado, muito embora, segundo a SANASA, tenha havido uma melhora significativa na qualidade da água desse ribeirão com a ativação da ETE Capuava que começou a tratar o esgoto doméstico da cidade de Valinhos no começo de 2005 (Figura 11).



Figura 11: Ponto de amostragem P3: ribeirão Pinheiro a 100 m de sua foz no rio Atibaia.

O quarto ponto situa-se no rio Atibaia (P4) a aproximadamente 1.600 metros após o aporte do ribeirão Pinheiro. No local utilizado para captação de água das ETA 3 e 4 da SANASA. (Figura 12).



Figura 12: Ponto de amostragem P4: rio Atibaia/captação à esquerda na primeira campanha (alta pluviosidade) e a direita na terceira campanha (estiagem).

Os pontos P2 e P3 correspondem aos locais de amostragem inseridos na segunda campanha, que foram selecionados como objetivo de conhecer a influência que o aporte do ribeirão Pinheiro provocaria na qualidade da água superficial do rio Atibaia no local de onde provém a água de abastecimento de quase toda população do município de Campinas.

O ponto P5 está localizado no ribeirão Anhumas imediatamente à jusante da cidade de Campinas e à montante de sua afluência no rio Atibaia, sob a ponte da estrada da Rodhã (Figura 13). Esse ribeirão recebe cerca de 45 % da carga poluidora da cidade de Campinas. O sexto ponto de amostragem no rio Atibaia (P6) situa-se no município de Paulínia, à jusante do pólo industrial, da Refinaria do Planalto Paulista (REPLAN) e do aporte do ribeirão Anhumas, sob a ponte da rodovia SP-332 no trecho que liga Campinas a Cosmópolis (Figura 14).



Figura 13: Ponto de amostragem P5: ribeirão Anhumas à esquerda na primeira campanha (alta pluviosidade) e a direita na terceira campanha (estiagem).



Figura 14: Ponto de amostragem P6: rio Atibaia/Paulínia.

Os pontos P7 e P8 no rio Atibaia foram analisados na terceira e quarta campanhas e estão localizados na cidade de Americana. O P7 refere-se à Represa de Salto Grande (Figura 15) e o P8 situa-se a aproximadamente 200 metros da sua afluição no rio Jaguari para juntos formarem o rio Piracicaba (Figura 16).



Figura 15: Ponto de amostragem P7: rio Atibaia/Represa, na Represa de Salto Grande no município de Americana à esquerda na terceira campanha (estiação) e a direita na quarta campanha (alta pluviosidade).



Figura 16: Ponto de amostragem P8: rio Atibaia/Foz, no município de Americana a 200 m de seu aporte no rio Piracicaba.

Sob a Rodovia dos Bandeirantes foi estabelecido o ponto de amostragem P9. Neste local, a SANASA realiza a captação das águas do rio Capivari para a ETA-Capivari (Figura 17). E por fim, o ponto P10 está localizado no Rio Jundiáí, na ponte de concreto logo após a estrada de ferro, no bairro Itaici do município de Indaiatuba (Figura 18). Município que apesar de coletar 96 % do esgoto doméstico, apenas 10 % passa por algum tratamento lançando 100 % da sua carga orgânica poluidora no rio Jundiáí (CETESB, 2007).



Figura 17: Ponto de amostragem P9: rio Capivari à esquerda na primeira campanha (alta pluviosidade) e a direita na terceira campanha (estiagem).



Figura 18: Ponto de amostragem P10: rio Jundiáí no município de Indaiatuba.

A Tabela 7 resume as informações dos pontos amostrais desse trabalho. Nove dos dez pontos selecionados fazem parte do trabalho de monitoramento da qualidade das águas superficiais do Estado de São Paulo, realizado pela CETESB.

Tabela 7: Descrição dos pontos de amostragem e seus respectivos códigos de monitoramento da CETESB.

<i>Ponto amostral</i>	<i>Corpo Aquático</i>	<i>Código nesse trabalho</i>	<i>Código CETESB</i>	<i>Latitude</i>	<i>Longitude</i>
P1	Rio Atibaia	Atibaia/ Atibaia	ATIB 02010	23°06'14"	46°32'44"
P2	Rio Atibaia	Atibaia/ Sousas	-	22°54'39"	46°57'22"
P3	Ribeirão Pinheiros	Pinheiros	PIN 03900	22°54'45"	46°57'37"
P4	Rio Atibaia	Atibaia/ captação	ATIB 02065	22°54'17"	46°58'30"
P5	Ribeirão Anhumas	Anhumas	NUMA 04900	22°46'10"	47°05'42"
P6	Rio Atibaia	Atibaia/ Paulínia	ATIB 02605	22°44'44"	47°09'34"
P7	Rio Atibaia	Atibaia/ Represa	ATSG 02900	22°43'14"	47°16'24"
P8	Rio Atibaia	Atibaia/ Foz	ATIB 02900	22°41'54"	47°17'27"
P9	Rio Capivari	Capivari	CPIV 02130	23°00'15"	47°05'56"
P10	Rio Jundiá	Jundiá	JUNA 04270	23°06'30"	47°10'52"

As amostras foram coletadas com o auxílio de um balde previamente ambientado com a própria água a ser coletada, ou diretamente em frascos de vidro âmbar de 4 litros de capacidade também ambientados. Em cada ponto de amostragem foram coletados cerca de 8 L de amostra. As coletas foram realizadas por, pelo menos, duas pessoas sendo que uma foi responsável pelo manuseio dos materiais que não entram em contato direto com a amostra e a outra que manipulou somente os materiais destinados a receber a amostra. Os frascos contendo as amostras foram selados com papel alumínio, fechados e colocados em caixa térmica para transporte. Durante todo o período de amostragem foram utilizadas luvas de látex.

No laboratório, alíquotas das amostras que foram extraídas por SPE, foram imediatamente filtradas a vácuo em sistema fechado de vidro utilizando membranas de ester de celulose modelo Sterile Pack 10x20-S, marca MFS, com 0,45 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro, para minimizar a interferência de substâncias húmicas e sólidos em suspensão presentes na matriz.

Outra alíquota de 100 mL das amostras foi separada para a análise de Carbono Orgânico Total (do inglês, TOC) usando um equipamento modelo TOC-V CPN, marca Shimadzu, realizada no mesmo dia da coleta.

Todas as amostras foram preservadas a 4 °C, em refrigerador, até a extração dos compostos de interesse, as quais foram realizados em até dois dias.

Na quarta campanha, realizada em janeiro de 2007 foram realizadas medidas de temperatura, pH, condutividade e oxigênio dissolvido. As medidas foram realizadas *in situ* utilizando o medidor multiparâmetro, modelo Multi 340i/SET, marca WTW.

Nessa última campanha, para todas as amostras dos 10 diferentes pontos amostrais, as extrações foram realizadas em duplicata e cada extrato foi analisado por HPLC-DAD/FL em triplicata, portanto a quarta campanha também apresenta a estimativa de desvio padrão (s) dos seis valores obtidos nessas replicatas de análises dos quinze compostos nos corpos d'água da RMC.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Assim como na descrição da parte Experimental, esse capítulo foi dividido nas três etapas do trabalho: (1) adaptação e otimização do método analítico; (2) validação do método empregado; e (3) campanhas amostrais.

4.1. PRIMEIRA ETAPA: MÉTODO ANALÍTICO

O método analítico envolveu a extração, concentração dos analitos da amostra e a sua determinação por HPLC-DAD/FL. Os métodos testados e adaptados estão descritos na literatura, porém ainda não há nenhum método oficial convalidado para a determinação desses compostos em matrizes aquáticas. O que se encontra nos artigos dessa área são procedimentos de extração e determinação aplicados a uma classe de compostos, como os ftalatos ou os fármacos, por exemplo. Portanto, essa primeira etapa do trabalho consistiu no desenvolvimento de um método analítico que pudesse ser aplicado à determinação simultânea das quinze substâncias escolhidas para serem monitoradas em águas superficiais.

4.1.1. SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

Inicialmente foi estudada a melhor separação cromatográfica para oito dos quinze analitos (caféina, bisfenol A, 17 β -estradiol, 17 α -EE2, estrona, progesterona, diclofenaco e ibuprofeno) usando eluição de FM isocrática composta por ACN e água. Para o estudo de eluição por gradientes de FM foram inseridos mais três analitos (paracetamol, AAS e dibutilftalato) totalizando o estudo com onze dos quinze analitos selecionados. No decorrer do trabalho, tendo o procedimento analítico definido, foram inseridos os demais quatro compostos (levonorgestrel, dietilftalato, 4-octilfenol e 4-nonilfenol), que puderam ser analisados nas mesmas condições estabelecidas para os outros onze compostos.

Estudos preliminares avaliaram a separação de uma mistura 5 mg L^{-1} de cada um dos oito compostos em eluição isocrática. Para isso foram empregadas porcentagens de ACN em água de 35, 45, 50, e 70 %, e vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. A Figura 19 mostra que a eluição no modo isocrático não foi adequada para a separação desses oito compostos.

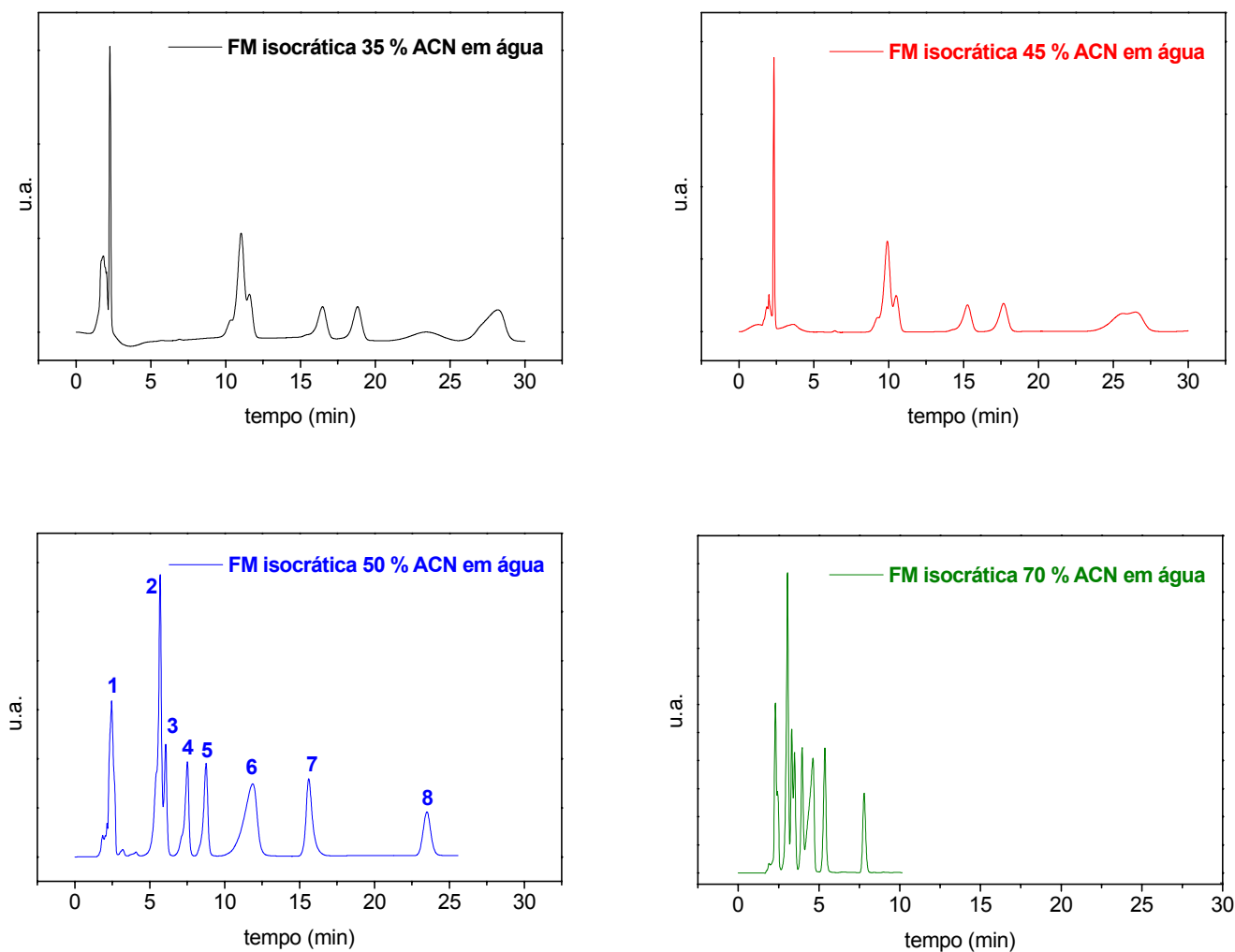


Figura 19: Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD com absorção em 200 nm e FM isocráticas de 35, 45, 50 e 70 % ACN em água para uma mistura padrão dos 8 compostos 1: cafeína, 2: bisfenol A, 3: 17β -estradiol, 4: 17α -EE2, 5: estrona, 6: diclofenaco, 7: ibuprofeno e 8: progesterona.

Os cromatogramas da Figura 19 mostram que o uso da FM contendo 50 % de ACN em água foi a que proporcionou melhor separação dos analitos, mas ainda não foi considerada adequada à análise. Padrões individuais foram analisados nessas condições para se obter a ordem de eluição dos compostos. Nota-se que a cafeína é eluída juntamente com o tempo de um composto não retido (tempo morto); além disso, os compostos 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol não foram completamente separados e o diclofenaco apresentou pico largo o que poderia prejudicar a análise quantitativa.

A maioria dos trabalhos descritos na literatura usa fase móvel acidificada em pH próximo de 3 para analisar fármacos ácidos (Hilton e Thomas, 2003; Lindqvist *et al.*, 2005; Roberts e Thomas, 2006). Esse parâmetro foi avaliado na separação dos oito compostos usando o modo de eluição isocrático com 50 % de acetonitrila e vazão $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. A Figura 20 mostra que houve uma melhora na resolução dos picos com o uso da fase móvel ácida, principalmente aqueles referentes aos fármacos ácidos, como o diclofenaco e ibuprofeno.

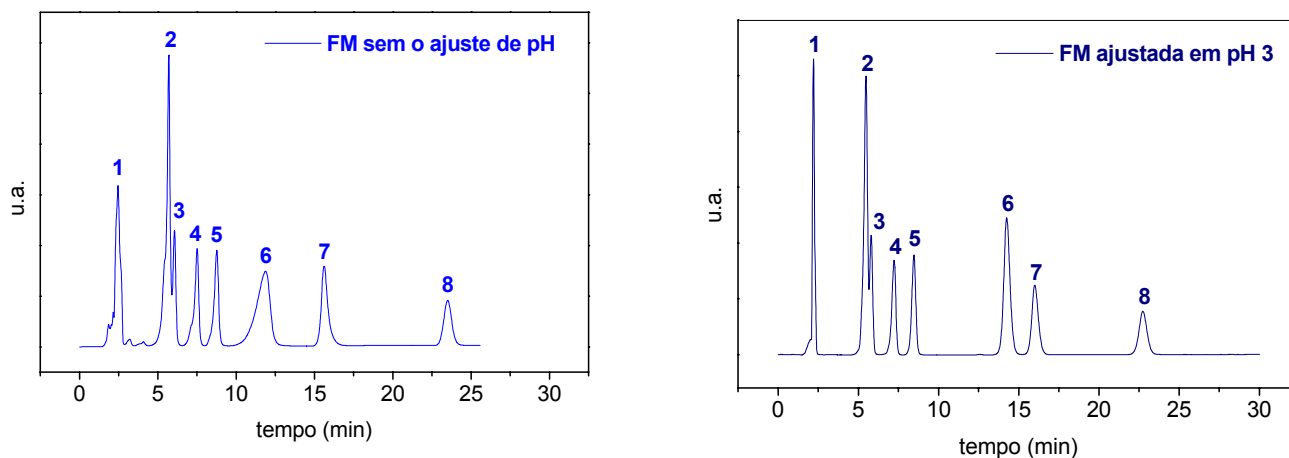


Figura 20: Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD com absorção em 200 nm e FM isocrática 50 % ACN em água, à direita sem o ajuste de pH e a esquerda com o pH 3, para uma mistura padrão dos 8 compostos 1: cafeína, 2: bisfenol A, 3: 17β -estradiol, 4: 17α -EE2, 5: estrona, 6: diclofenaco, 7: ibuprofeno e 8: progesterona.

Foram usados ácidos clorídrico, sulfúrico e fosfórico concentrado para diminuir o pH da água usada como FM. Não houve variação significativa na análise cromatográfica, e, portanto optou-se em usar o ácido clorídrico para acidificar a FM, sendo este, o mesmo ácido usado para acidificar as amostras.

Variou-se a vazão da fase móvel de 0,4 a 1,0 mL min⁻¹ para avaliar parâmetros como o fator alargamento, resolução e tempo de análise para a separação dos oito compostos com eluição isocrática 50 % ACN em água. De 0,4 a 0,6 mL min⁻¹ houve um alargamento dos picos e o tempo de retenção do último analito eluído foi de 32,0 e 30,3 minutos, respectivamente. Entre 0,7 e 0,8 mL min⁻¹ não houve variação significativa na resolução dos picos, que ficaram mais estreitos com o aumento da vazão de FM. Já com a vazão de 1 mL min⁻¹ houve um aumento na coeluição dos picos referentes ao 17 β -estradiol e 17 α -EE2. O tempo de retenção da progesterona foi de 25,8, 22,7 e 21,3 minutos para as análises realizadas com vazões de FM de 0,7, 0,8 e 1,0 mL min⁻¹, respectivamente. Dessa forma, optou-se por trabalhar na vazão de 0,8 mL min⁻¹ o que proporcionou as melhores condições de análise em um tempo máximo de corrida cromatográfica de 24 minutos.

Um padrão individual de cafeína na concentração de 1,0 mg L⁻¹ foi analisado usando eluição isocrática contendo apenas 10 % de ACN em água acidificada e vazão 0,8 mL min⁻¹. Nessas condições, obteve-se a separação completa da cafeína e o tempo morto com um fator de retenção maior que dois. Tendo observado a necessidade de se aplicar FM mais polar para a separação da cafeína que aquela necessária à separação dos demais compostos, aplicou-se o modo de eluição por gradientes de FM para que fosse possível determinar simultaneamente todos os compostos de interesse.

Para isso preparou-se uma nova solução-padrão contendo 5,0 mg L⁻¹ de cada um dos oito compostos, além do paracetamol, AAS e dibutilftalato que foi usada para determinar o melhor modo de separação desses analitos. As condições de pH da FM igual a 3, ajustado com HCl concentrado e vazão de 0,8 mL min⁻¹ foram padronizados para todas as análises realizadas nesse trabalho.

Foram analisados 23 gradientes de eluição da FM (Tabela 8), onde a porcentagem de ACN em água variou desde 1 até 100 %. Os tempos de análise variaram entre 30 e 60 minutos e verificou-se que pequenas mudanças na proporção de ACN ou na taxa de variação provocaram mudanças significativas na separação dos compostos, por isso uma análise cuidadosa foi feita até se obter o programa de gradiente de eluição adequado.

Tabela 8: Gradientes de eluição da fase móvel constituída por acetonitrila (ACN) em solução HCl pH 3 e vazão 0,8 mL min⁻¹.

	<i>Gradientes de FM</i>	<i>Tempo de análise (min)</i>
1	Aumento de 15 até 100 % de ACN em 50' retornando a 15 % de ACN em 10'.	60
2	Aumento de 15 até 100 % de ACN em 40' retornando a 15 % de ACN em 5'.	45
3	Manutenção de 10 % de ACN por 4', aumento até 100 % em 30', retornando a 10 % de ACN em 3'.	37
4	Manutenção de 10 % de ACN por 2', aumento até 90 % em 36', retornando a 10 % de ACN em 2'.	40
5	Aumento de 10 até 90 % de ACN em 42' retornando a 10 % ACN em 3'.	45
6	Aumento de 15 até 80 % de ACN em 42' retornando a 10 % ACN em 3'.	45
7	Manutenção de 10 % de ACN por 6', aumento até 90 % em 36', retornando a 10 % ACN em 3'.	45
8	Aumento de 10 até 80 % ACN em 42' retornando a 10 % de ACN em 3'.	45
9	Aumento de 10 até 80 % ACN em 47' retornando a 10 % de ACN em 3'.	50
10	Manutenção de 10 % de ACN por 6', aumento até 50 % em 3' e até 90 % em 25' e retornando a 10 % de ACN em 3'.	37
11	Aumento de 10 até 90 % de ACN em 30' retornando a 10 % de ACN em 3'.	33
12	Aumento de 10 até 90 % de ACN em 27' retornando a 10 % de ACN em 3'.	30
13	Manutenção de 10 % de ACN por 4', aumento até 90 % em 33' retornando a 10 % de ACN em 3'.	40
14	Manutenção de 10 % de ACN por 4', aumento até 50 % em 6', manutenção por 20' retornando a 10 % de ACN em 3'.	33
15	Manutenção de 10 % de ACN por 4', aumento até 50 % em 6', manutenção por 27' retornando a 10 % de ACN em 3'.	40
16	Manutenção de 10 % de ACN por 4', aumento até 50 % em 3', manutenção por 27', aumento até 80 % de ACN em 3', manutenção por mais 7' e retorno a 10 % de ACN em 3'.	47
17	Aumento de 5 até 90 % de ACN em 30' retornando a 5 % de ACN em 3'.	33
18	Aumento de 10 até 90 % de ACN em 37' retornando a 10 % de ACN em 3'.	40
19	Aumento de 10 até 90 % de ACN em 30', manutenção por 7' retornando a 10 % de ACN em 3'.	40
20	Aumento de 10 até 95 % de ACN em 37' retornando a 10 % de ACN em 3'.	40
21	Aumento de 1 até 99 % de ACN em 47' retornando a 10 % de ACN em 3'.	50
22	Aumento de 10 até 90 % de ACN em 33', aumento até 95 % em 7' retornando a 10 % de ACN em 3'.	43
23	Aumento de 10 até 90 % de ACN em 30', aumento até 92 % em 5' e até 95 % em 2' retornando a 10 % de ACN em 3'.	40

A utilização do gradiente de concentração descrito como número 23 mostrou-se eficaz para a separação dos onze compostos de interesse. Mesmo com um tempo total de análise de 40 minutos, considerado relativamente longo para a separação dos analitos, a utilização deste gradiente de concentração é justificável por se tratar de substâncias químicas pertencentes a diferentes classes de compostos e que possuem diferentes propriedades químicas. Esse gradiente foi adequado à separação não só dos onze compostos, como também foi possível incluir outros quatro: o dietilftalato, levonorgestrel, 4-octilfenol e 4-nonilfenol. A Figura 21 mostra o cromatograma obtido para a solução contendo $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de cada um dos quinze compostos empregando-se detecção por DAD e absorção em 200 nm.

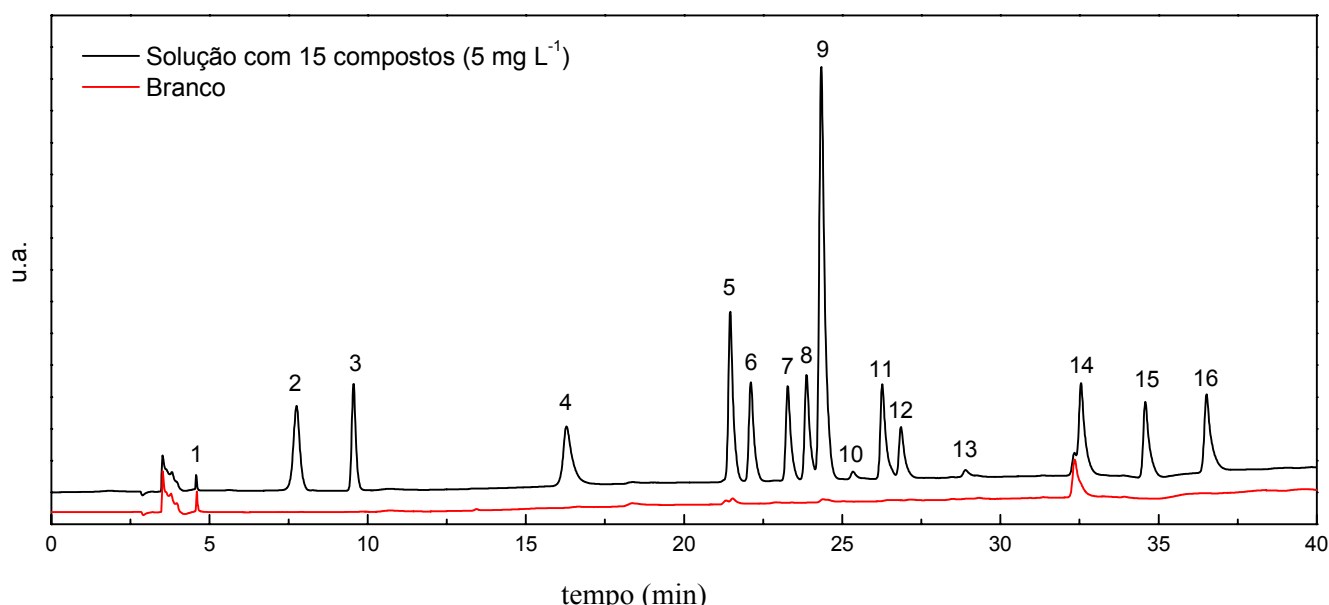


Figura 21: Cromatograma de uma solução contendo quinze compostos em metanol obtido por HPLC-DAD com absorção em 200 nm. 1: tempo de um composto não retido, 2: paracetamol, 3: cafeína, 4: AAS, 5: bisfenol A, 6: 17β -estradiol, 7: 17α -EE2, 8: estrona, 9: dietilftalato, 10: levonorgestrel, 11: diclofenaco, 12: ibuprofeno, 13: progesterona, 14: dietilftalato, 15: 4-octilfenol e 16: 4-nonilfenol.

Portanto, nesse programa de gradiente adotado a proporção de ACN em água variou de 10 % até 90 % em 30 minutos. Em seguida, durante 5 minutos essa proporção aumentou para 92 % de ACN e, durante mais 2 minutos, variou de 92 a 95 %. Finalmente, essa proporção diminuiu de 95 para 10 % de ACN nos últimos 3

minutos da análise, totalizando 40 minutos de corrida cromatográfica. A análise quantitativa dos quinze compostos por HPLC-DAD foi realizada com os cromatogramas obtidos com absorção no comprimento de onda máximo de cada composto explorando assim o detector por arranjo de diodos que nos forneceu o espectro na região do ultravioleta de cada um dos compostos, ferramenta essa que tornou o método bastante seletivo.

A Tabela 9 apresenta os tempos de retenção e os comprimentos de onda máximos que são característicos de cada composto.

Tabela 9: Tempo de retenção (t_R) dos quinze compostos e seus respectivos comprimentos de onda empregados para a quantificação.

Pico	Composto	t_R (min)	$\lambda_{máx.}$ (nm)
2	paracetamol	8,4	244
3	cafeína	10,2	272
4	AAS	15,8	301
5	bisfenol A	21,5	278
6	17 β -estradiol	22,1	280
7	17 α -etinilestradiol	23,2	280
8	estrone	23,8	280
9	dietilftalato	24,3	274
10	levonorgestrel	25,3	241
11	diclofenaco	26,1	274
12	ibuprofeno	26,7	263 / 344
13	progesterona	28,7	241
14	dibutilftalato	32,1	273
15	4-octilfenol	34,1	278
16	4-nonilfenol	35,9	278

4.1.2. DETECÇÃO POR FLUORESCÊNCIA

O princípio da fluorescência molecular se baseia na absorção da radiação eletromagnética de um determinado comprimento de onda e a emissão da radiação de menor energia, portanto, de comprimento de onda maior. Moléculas cuja estrutura são formadas por anéis aromáticos, ligações duplas conjugadas e grupos ácidos favorecem esse fenômeno e podem ser identificadas usando o detector por fluorescência. Cada composto possui energias de emissão e excitação características.

Para se conhecer quais dos quinze compostos poderiam ser identificados por fluorescência, foi feita uma análise preliminar no Fluorímetro LS-55 da Perkin Elmer e, com base na literatura foi feito uma varredura de emissão entre 250 e 700 nm em três comprimentos de onda de excitação: 230, 280 e 330 nm para soluções padrão em metanol de cada composto individualmente. Como branco foi utilizado o próprio solvente.

Embora a maioria dos compostos possuam anéis aromáticos ou ligações duplas conjugadas (Tabela 1, página 18), apenas o bisfenol A, 17 β -estradiol e 17 α -EE2 foram detectados por FL. Os demais compostos não foram detectados, ou não apresentaram um pico bem definido, devido às particularidades do método de detecção empregado. A Figura 22 mostra um cromatograma obtido para a solução 1 mg L⁻¹ contendo cada um dos 15 compostos estudados empregando-se a separação por eluição de gradiente adotado e detecção por FL com comprimento de onda de excitação de 230 nm e de emissão de 310 nm.

Dentre os compostos presentes na solução-padrão, o dietilftalato, o dibutilftalato, o 4-nonilfenol e o 4-octilfenol também apresentam um anel aromático em suas estruturas. Entretanto, estes compostos não foram detectados empregando-se HPLC-FL. São compostos que apresentam tempos de retenção superiores a 24 min e pode-se observar na Figura 22, que a partir de 24 minutos o cromatograma apresentou vários picos, tanto no branco quanto na solução-padrão, que dificultaram a identificação dos picos referentes a esses compostos. Desta forma, apenas o bisfenol A, o 17 β -estradiol e o 17 α -EE2 foram selecionados, para serem determinados usando detecção por FL.

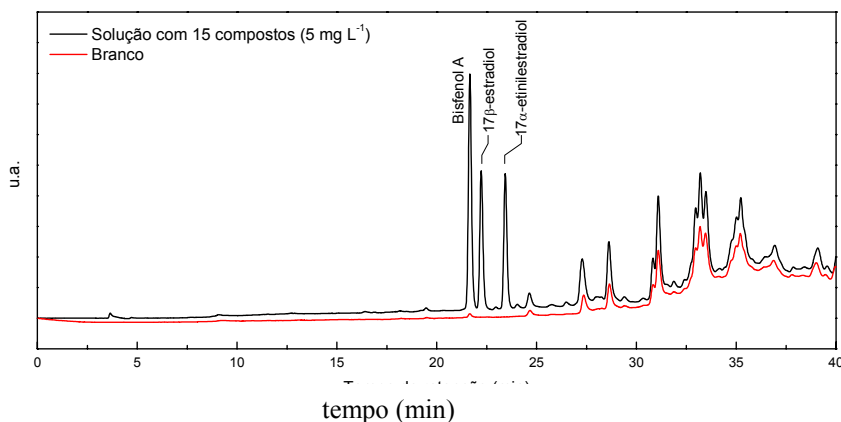


Figura 22: Cromatograma de uma solução contendo os quinze compostos estudados em metanol obtido por HPLC-FL com excitação em 230 nm e emissão em 310 nm aplicando o programa de eluição por gradiente de FM adotado.

Por se tratar de uma técnica bastante sensível, os extratos das amostras foram diluídos para serem analisados por FL, impossibilitando dessa forma, a análise contínua pelos dois detectores instalados em série. Para otimizar o tempo de análise, foram avaliadas diferentes formas de obtenção dos cromatogramas para estes três compostos variando-se, principalmente, o programa do gradiente de FM entre ACN e solução ácida pH 3. Com isso observou-se que, empregando-se uma relação isocrática entre os dois solventes, o tempo de análise cromatográfica poderia ser diminuído significativamente. A separação desses três compostos foi realizada por meio de eluição de FM isocrática contendo 50 % de ACN em solução ácida pH 3, por 10 minutos (Figura 23).

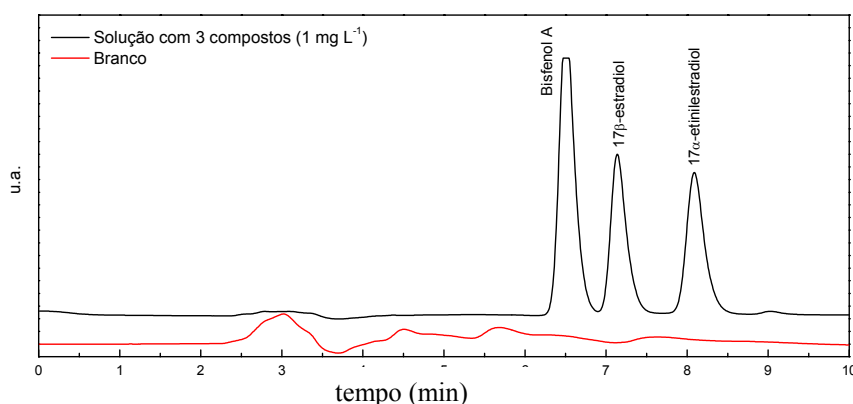


Figura 23: Cromatograma obtido por HPLC-FL com excitação em 230 nm e emissão em 310 nm para uma solução contendo 1 mg L⁻¹ de bisfenol A (t_R = 6,5 min), 17β-estradiol (t_R = 7,1 min) e 17α-EE2 (t_R = 8,0 min), empregando eluição de FM isocrática contendo 50 % de ACN em solução ácida pH 3 e vazão de 0,8 mL min⁻¹.

4.1.3. EXTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS

Nessa primeira etapa de adaptação do método analítico foram avaliados três modos de extração e concentração dos analitos da amostra por SPE e o método 3510C da USEPA (1996) empregando LLE.

4.1.3.1. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

O método 1 de SPE usado para extrair fármacos foi o que apresentou melhor eficiência na extração simultânea dos quinze compostos de interesse. A Figura 24 apresenta os cromatogramas obtidos para a amostra do rio Atibaia coletadas na primeira campanha amostral extraída pelos três métodos empregados.

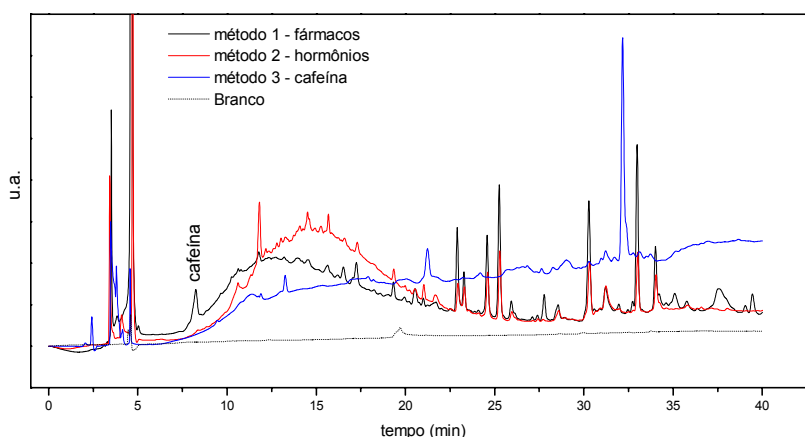


Figura 24: Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD para amostras do rio Atibaia empregando os três métodos de SPE.

A extração em fase sólida utilizou uma alíquota de 1 litro da amostra filtrada, a qual foi acidificada com HCl concentrado até pH 3 para aumentar a afinidade dos compostos junto à fase estacionária, principalmente aqueles de caráter ácido como AAS, diclofenaco e ibuprofeno. Foi usado cartucho OASIS HLB previamente condicionado com 6 mL de metanol, 6 mL de água deionizada e 6 mL de solução de HCl com pH 3. A eluição dos compostos foi feita por meio da adição de 4 porções de 3 mL de metanol em cada cartucho. Os extratos foram secos em nitrogênio e os analitos, redissolvidos em 0,5 mL de metanol, proporcionando um fator de concentração de 2000 vezes dos analitos no extrato (Thomas e Hilton, 2003).

Nota-se que o método empregando cartucho C18 (método 3) foi capaz de extrair poucos analitos da amostra, apenas aqueles de caráter lipofílicos. Mesmo sendo empregado para extração de cafeína, não apresentou eficiência melhor que os outros dois métodos na extração desse composto.

Nessa amostra do rio Atibaia a concentração de cafeína determinada pelo método 1 foi de 689 ng L⁻¹ e tanto o método 2 como o método 3 não foram apresentaram picos correspondente a esse composto. Embora o método 2 tivesse apresentado um cromatograma bastante semelhante ao obtido pelo método 1, uma análise mais detalhada realizada usando uma amostra sintética contendo os quinze compostos mostrou média eficiência de extração quando comparado ao método 1, descrito na literatura para a determinação de fármacos.

4.1.3.2. COMPARAÇÃO ENTRE SPE E LLE

As amostras coletadas na primeira campanha foram utilizadas para avaliar o método mais adequado de extração dos analitos considerando-se aspectos como tempo de análise, facilidade de manuseio dos materiais, possibilidade de contaminação, resolução e presença de interferentes.

A Figura 25 mostra os cromatogramas obtidos para amostras do rio Jundiaí coletadas durante a primeira campanha empregando extrações LLE e SPE (método 1), onde se nota uma maior quantidade de picos para o extrato obtido por SPE em comparação ao obtido por LLE. Além disso, as amostras extraídas por SPE sempre apresentaram picos bem definidos referentes aos compostos de interesse, e naquelas extraídas por LLE foram detectados, em alguns casos, picos interferentes com tempos de retenção próximos aos dos compostos de interesse. Nesse caso do rio Jundiaí, por exemplo, usando SPE foi possível determinar a cafeína, o AAS, o dibutilftalato, bisfenol A, 17β-estradiol e 17α-EE2, enquanto que no extrato da amostra obtido por LLE determinou-se apenas a cafeína, o AAS e o dibutilftalato. Os esteróides e o bisfenol A não foram detectados nos extratos obtidos por LLE.

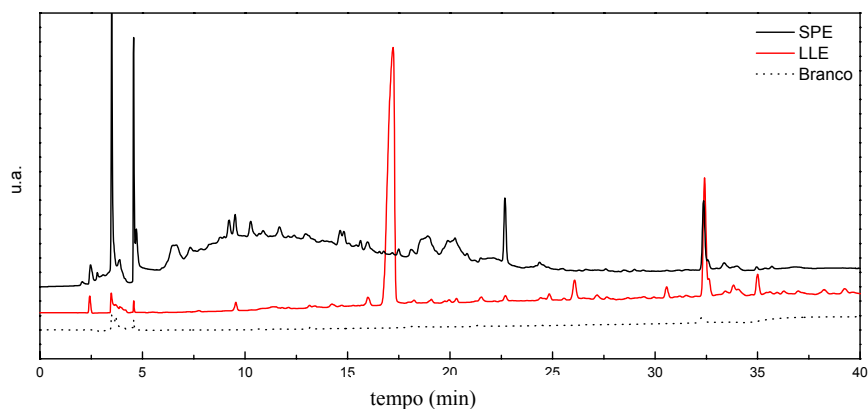


Figura 25: Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD para amostras do rio Jundiá empregando extração em fase sólida (SPE) e extração líquido-líquido (LLE).

Foram analisadas também amostras de água mineral extraídas por SPE e LLE. A Figura 26 mostra os cromatogramas obtidos nessas análises. É possível observar que mesmo em matrizes menos complexas a SPE favorece a extração de um número maior dos compostos que são de interesse desse trabalho. Nessa amostra de água mineral estão presentes compostos da classe dos ftalatos, incluindo o dibutilftalato e o dietilftalato, que puderam ser detectados somente através a SPE.

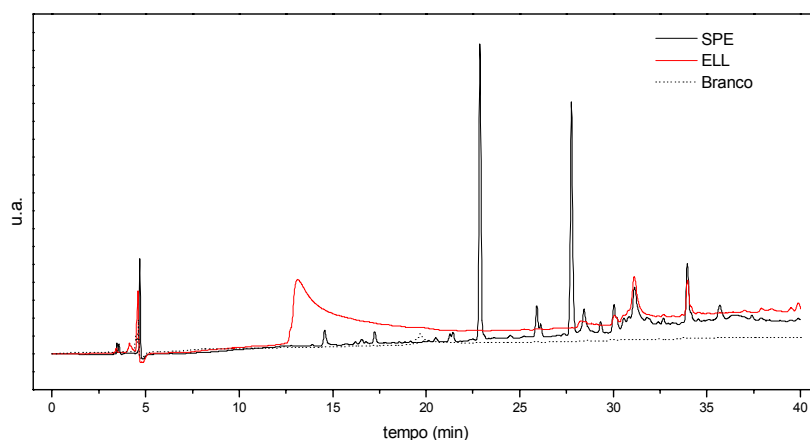


Figura 26: Cromatogramas obtidos por HPLC – DAD para amostras de água mineral empregando extração em fase sólida (SPE) e extração líquido-líquido (LLE).

A extração por SPE mostrou-se mais eficiente, pois além de favorecer a detecção dos compostos de interesse, permitiu que outros compostos, ainda não investigados neste trabalho, pudessem ser detectados. Outras limitações verificadas envolveram a formação de emulsões (diclorometano:água de rio) e a possível extração parcial de

compostos que apresentam afinidade elevada pela fase aquosa. Não se pode descartar o uso da LLE, principalmente quando se trabalha com uma única classe de compostos que possuem pouca afinidade pela fase aquosa, porém a LLE necessita um volume maior de solvente, além de tempo e um custo maior de análise. Com base nessas comparações entre os métodos de extração optou-se por empregar apenas a SPE (método 1) para extração e concentração dos compostos nas campanhas seguintes.

4.2. SEGUNDA ETAPA: VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

As condições da coluna cromatográfica foram avaliadas usando uma solução padrão sugerida pelo fabricante e manteve-se adequada ao uso durante todo o período de trabalho. Parâmetros como tempo de retenção dos compostos, comprimento de onda máximo, fator de retenção, resolução e números de pratos foram verificados e garantiram a qualidade da coluna cromatográfica empregada.

4.2.1. CONFORMIDADE DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Foi verificada a conformidade do sistema cromatográfico para o método proposto usando HPLC-DAD/FL. Os parâmetros: tempo de retenção (t_R), comprimento de onda máximo (λ), fator de retenção (k'), resolução (R) considerando o pico de interesse e o pico anterior mais próximo, fator alargamento (T_f) e número de pratos (N) foram verificados para separação dos quinze compostos em uma solução $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ usando o detector por ultravioleta e estão mostrados na Tabela 10. Os compostos foram analisados nos cromatogramas obtidos em comprimento de onda igual ao λ máximo característico de cada um.

A análise cromatográfica foi repetida dez vezes e as variações nos tempos de retenção dos compostos não ultrapassou 0,4 minutos e, no comprimento de onda máximo dos compostos, quando houve variação, estas não foram maior que 2 nm, com exceção do ibuprofeno que apresentou $s = 25 \text{ nm}$ e $CV = 7,5 \%$. O fator de retenção foi

adequado para todos os compostos. Houve a separação completa em 12 dos 15 compostos. Para o dietilftalato a separação foi de 98 % e a resolução esteve inferior a 1,5 apenas para o diclofenaco e ibuprofeno. Os valores do fator alargamento estiveram entre 1,1 para o paracetamol e 2,6 para o 4-octilfenol. O número de pratos foi bastante elevado, no mínimo 3 vezes maior que o recomendado para o caso do paracetamol, chegando a ser igual a 203.000 para o 4-nonilfenol.

Tabela 10: Conformidade do sistema cromatográfico para determinação dos quinze compostos de interesse por HPLC-DAD.

Pico	Composto	<i>k'</i>	<i>R</i>	<i>Tf</i>	<i>N</i>
1	paracetamol	1,9	12,2	1,1	6.626
2	cafeína	2,5	5,0	1,4	22.629
3	AAS	4,5	14,5	1,9	15.682
4	bisfenol A	6,5	13,9	1,7	85.657
5	17 β -estradiol	6,7	2,3	1,9	89.588
6	17 α -etinilestradiol	7,1	3,8	-	100.137
7	estrone	7,3	2,0	-	98.530
8	dietilftalato	7,5	1,6	1,9	95.266
9	levonorgestrel	7,6	3,1	2,1	102.027
10	diclofenaco	8,1	1,1	-	115.721
11	ibuprofeno	8,3	0,5	-	100.306
12	progesterona	8,8	8,1	2,3	113.095
13	dibutilftalato	10,2	16,6	1,5	159.982
14	4-octilfenol	10,9	6,0	2,6	180.572
15	4-nonilfenol	11,5	5,6	2,5	203.282

Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico para a separação de uma mistura $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ contendo bisfenol A, 17β -estradiol e 17α -EE2 por HPLC-FL, apresentou-se ideal a análise desejada como mostrado na Tabela 11. Foram realizadas nove corridas cromatográficas e a variação no tempo de retenção máxima foi de 0,05 min para 17α -etinilestradiol.

Tabela 11: Conformidade do sistema cromatográfico para determinação de bisfenol A, 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol por HPLC-FL.

<i>Pico</i>	<i>Composto</i>	<i>k'</i>	<i>R</i>	<i>Tf</i>	<i>N</i>
1	bisfenol A	31	2,4	1,6	4.609
2	17β -estradiol	34	1,9	1,4	5.788
3	17α -etinilestradiol	39	2,7	1,5	7.412

4.2.2. ESTABILIDADE

Os parâmetros como tempo de retenção, comprimento de onda máximo, fator de retenção, resolução, fator alargamento, número e altura dos pratos foram verificados para as três concentrações diferentes dos padrões nos diferentes momentos, apresentando-se dentro das mesmas variações obtidas no teste de conformidade do sistema cromatográfico realizado anteriormente. O mesmo aconteceu com a as duas análises do extrato da amostra do rio Capivari da primeira campanha, realizadas imediatamente após ter sido preparado e; (ii) após 1 mês que o extrato ficou mantido sob as condições de preservação. Além disso, não houve variações na linha de base e na concentração dos três analitos detectados nessa amostra.

4.2.3. SELETIVIDADE

A comparação entre os três cromatogramas referentes a uma amostra do rio Capivari; a outra amostra do rio Capivari a qual foram adicionados os quinze compostos em concentrações de $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$; e à uma mistura dos quinze compostos de concentração $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ cada, foi realizada pela análise das Figuras 27 e 28 referentes a determinação por DAD e FL, respectivamente.

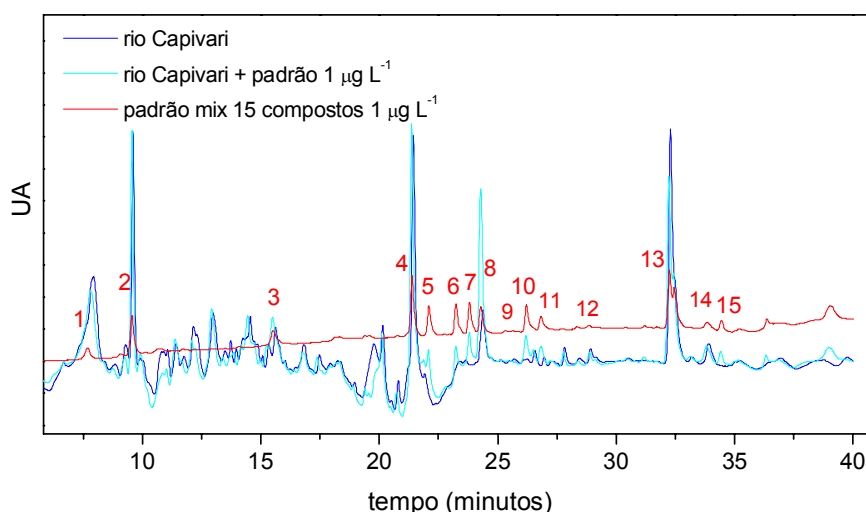


Figura 27: Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD para uma amostra padrão contendo $1\mu\text{g L}^{-1}$ de cada um dos 15 compostos, e duas amostras do rio Capivari, sendo uma amostra natural e uma na qual foi adicionado $1\mu\text{g L}^{-1}$ de cada um dos 15 compostos. 1: tempo morto, 2: paracetamol, 3: cafeína, 4: AAS, 5: bisfenol A, 6: 17β -estradiol, 7: 17α EE2, 8: estrona, 9: dietilftalato 10: levonorgestrel, 11: diclofenaco, 12: ibuprofeno, 13: progesterona, 14:dibutilftalato, 15: 4-octilfenol e 16: 4-nonilfenol.

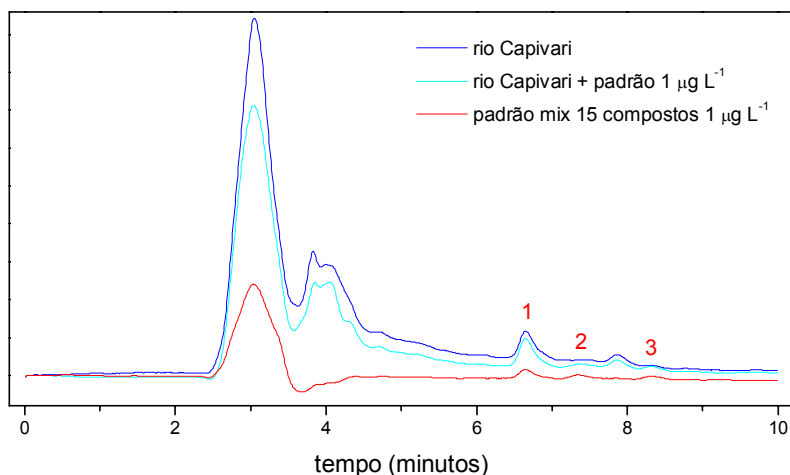


Figura 28: Cromatogramas obtidos por HPLC-FL para uma amostra padrão contendo $1\mu\text{g L}^{-1}$ de cada um dos 15 compostos e duas amostras do rio Capivari, sendo uma amostra natural e uma na qual foi adicionado $1\mu\text{g L}^{-1}$ de cada um dos 15 compostos. 1: bisfenol A, 2: 17β -estradiol, 3: 17α -EE2.

Nessa amostra do rio Capivari foram determinadas cafeína, dibutilftalato e bisfenol A, onde se observa que o método cromatográfico é seletivo para a maioria dos

compostos, tanto na determinação usando detector por ultravioleta como por fluorescência. Porém, para esse último, não há picos interferentes, enquanto que os cromatogramas obtidos por DAD em 200 nm apresentam um número maior de picos próximos aos compostos de interesse, o que dificulta a determinação. Por isso, para a quantificação dos analitos foram usados os cromatogramas obtidos com absorção nos comprimentos característicos de cada composto, diminuindo assim o número de picos interferentes das amostras.

A determinação empregando o detector por arranjo de diodos possibilita a identificação no cromatograma do pico referente ao analito de interesse pelo espectro de absorção no UV característico de cada composto. A comparação dos espectros dos picos obtidos nos cromatogramas do padrão e da amostra tornou a análise mais seletiva. A Figura 29 apresenta quatro espectros de absorção no UV para os compostos cafeína e dibutilftalato presentes em uma solução padrão e uma amostra do ribeirão Anhumas, corpo d’água mais impactado estudado nesse trabalho. A comparação entre os dois espectros comprova, portanto a presença dos analitos na matriz. A Figura 30, mostra os espectros obtidos pelo detector DAD para os outros treze compostos estudados presentes em uma solução padrão 5 mg L^{-1} .

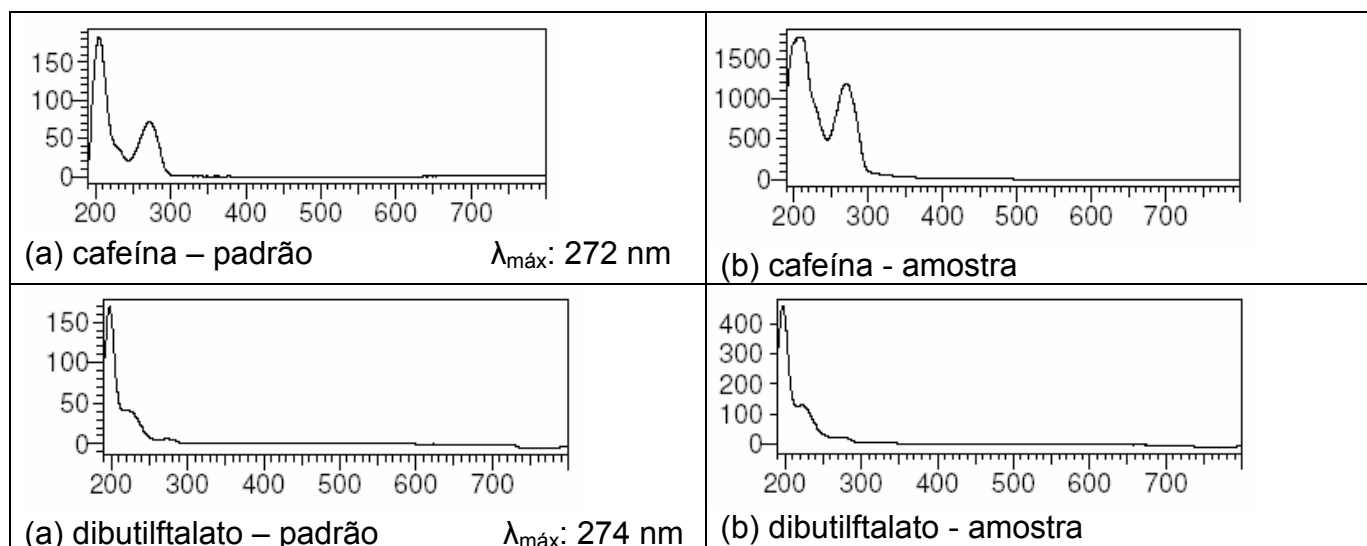


Figura 29: Espectros de absorção no UV para a cafeína e o dibutilftalato presentes em (a) solução padrão 5 mg L^{-1} e (b) amostra do ribeirão Anhumas.

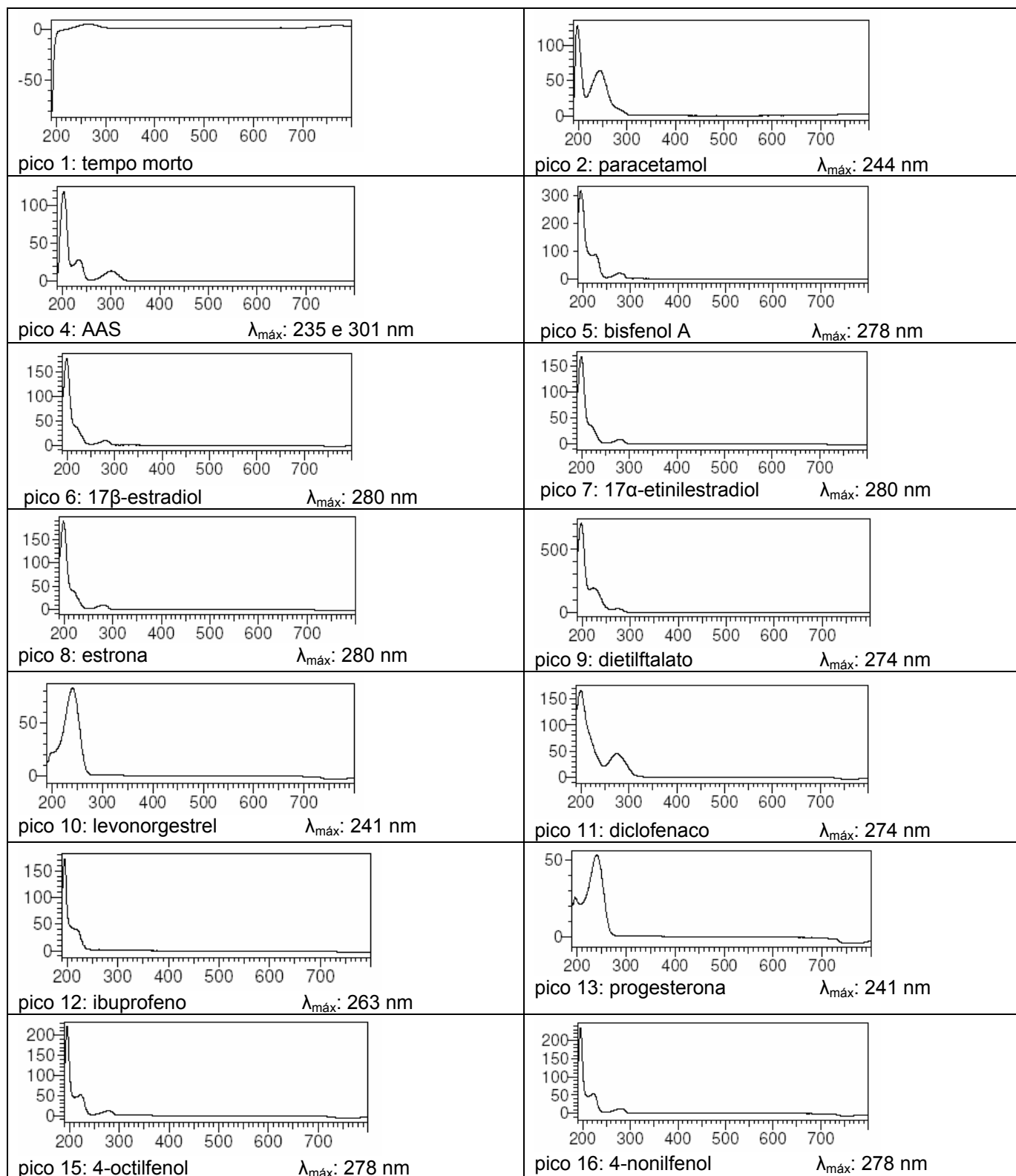


Figura 30: Espectro de absorção no UV obtido pelo detector DAD para treze dos quinze compostos analisados.

4.2.4. CURVA ANALÍTICA

Neste trabalho, a padronização externa foi empregada para a quantificação dos compostos de interesse nas amostras de água superficial. As soluções de trabalho foram preparadas em metanol. Foi preparada uma solução estoque 1.000 mg L⁻¹ para cada composto pela pesagem dos padrões sólidos. A partir das soluções estoque foi preparado uma solução 50 mg L⁻¹ contendo os quinze compostos e uma solução 10 mg L⁻¹ contendo apenas bisfenol A, 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol. As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição direta destas soluções mais concentradas.

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica e estão mostrados nas Tabelas 12 e 13 juntamente com a faixa de trabalho para cada composto

Tabela 12: Faixa de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação dos doze compostos determinados por HPLC-DAD.

Composto	Faixa linear^a (mg L⁻¹)	LD^b (ng L⁻¹)	LQ^b (ng L⁻¹)
paracetamol	0,075 – 2,5	33	111
cafeína	0,050 – 17,5	11	37
AAS	0,250 – 5,0	49	164
estrona	0,250 – 2,5	16	55
dietilftalato	0,100 – 1,0	33	110
levonorgestrel	0,500 – 1,0	19	63
diclofenaco	0,050 – 1,0	13	46
ibuprofeno	1,500 – 10,0	51	170
progesterona	0,100 – 1,0	19	65
dibutilftalato	0,750 – 10,0	28	95
4-octilfenol	0,250 – 10,0	20	69
4-nonilfenol	0,100 – 10,0	17	59

^a Empregando-se soluções-padrão dos compostos em metanol

^b Considerando-se um fator de concentração de 2000 vezes

Tabela 13: Faixa linear, limite de detecção e limite de quantificação dos 3 compostos determinados por HPLC-FL.

Composto	Faixa linear ^a (mg L⁻¹)	LD ^b (ng L⁻¹)	LQ ^b (ng L⁻¹)
bisfenol A	0,005 – 1,0	38	128
17β-estradiol	0,005 – 1,0	45	151
17α-etinilestradiol	0,005 – 1,0	16	55

^a Empregando-se soluções-padrão dos compostos em metanol^b Considerando-se um fator de concentração de 2000 vezes

4.2.5. LINEARIDADE E SENSIBILIDADE

Dentro das faixas lineares descritas nas Tabelas 12 e 13 o método analítico empregando HPLC-DAD/FL atendeu as exigências da ANVISA em 94 % dos casos e, apenas três curvas apresentaram $r < 0,99$, mas e em 100 % delas o coeficiente de correlação foi superior a 0,90 recomendado pelo INMETRO (Tabelas 14 e 15).

Tabela 14: Coeficiente de correlação (r) obtido para os 12 compostos determinados por HPLC-DAD em cada campanha amostral.

Compostos	1ª campanha	2ª campanha	3ª campanha	4ª campanha
paracetamol	0,997	0,994	0,998	0,996
cafeína	0,998	0,998	0,999	0,998
AAS	0,997	0,998	0,998	0,990
estrone	0,999	0,999	0,999	0,998
dietilftalato	nd	nd	0,999	nd
levonorgestrel	nd	nd	0,999	0,998
diclofenaco	0,999	0,999	0,999	0,998
ibuprofeno	0,994	0,992	0,997	0,990
progesterona	0,984	nd	0,999	0,996
dibutilftalato	0,980	0,988	0,997	0,995
4-octilfenol	nd	nd	0,999	0,997
4-nonilfenol	nd	nd	0,998	0,997

nd: não determinado

Tabela 15: Coeficiente de correlação (r) obtido para os 3 compostos determinados por HPLC-FL em cada campanha amostral.

Compostos	1ª campanha	2ª campanha	3ª campanha	4ª campanha
bisfenol A	0,996	0,998	0,999	0,994
17β-estradiol	0,999	0,999	0,999	0,992
17α-etinilestradiol	0,999	0,999	0,999	0,999

A sensibilidade foi expressa pela inclinação da curva analítica. A Figura 31 mostra as curvas analíticas dos compostos na terceira campanha amostral. Por ela é possível observar as tendências da sensibilidade. Usando o detector DAD tem-se que o dietilftalato é o composto que apresenta a maior sensibilidade dentre os quinze analisados. Já os compostos levonorgestrel, progesterona, 4-octilfenol e 4-nonilfenol apresentaram valores de sensibilidade bem inferiores.

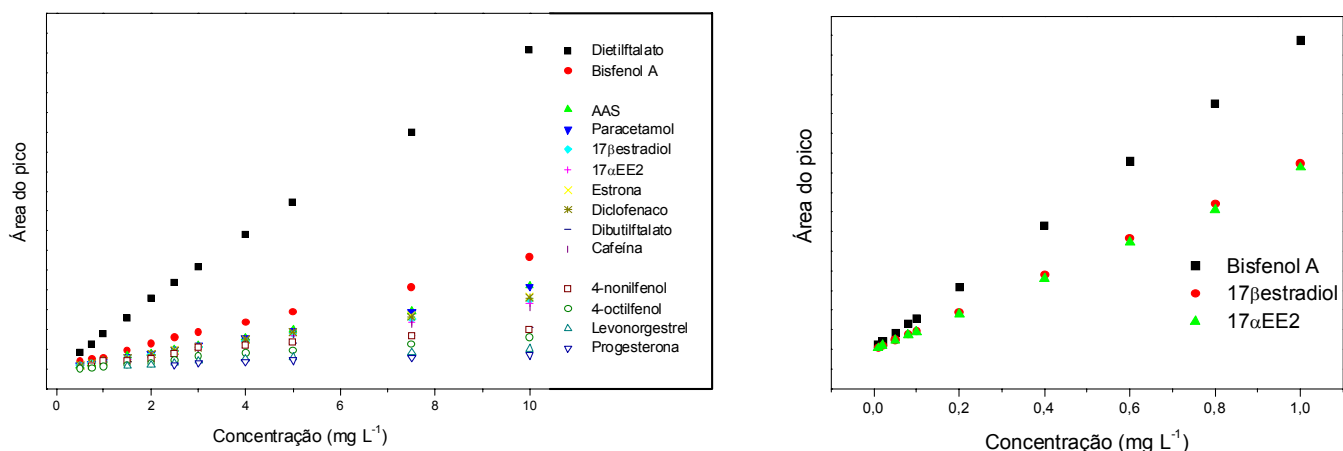


Figura 31: Curvas analíticas obtidas com soluções-padrão para os quinze compostos empregando o detector DAD à esquerda e, os três compostos empregando FL.

Os compostos bisfenol A, 17β-estradiol, 17α-etinilestradiol que puderam ser determinados tanto por DAD quanto por FL estão presentes nos dois gráficos, sendo assim, é possível constatar a maior sensibilidade na determinação usando o detector de fluorescência. A Tabela 16 apresenta os coeficientes angulares obtidos nas curvas analíticas desses compostos usando os dois detectores. Observou-se que os valores

de sensibilidade obtidos com o FL são 55, 56 e 57 vezes maiores que aqueles obtidos por DAD para, respectivamente, comprovando a maior sensibilidade desta técnica.

Tabela 16: Sensibilidade das curvas analíticas dos três compostos: bisfenol A, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol obtidas por DAD e FL.

<i>Compostos</i>	<i>Coeficiente angular (DAD)</i>	<i>Coeficiente angular (FL)</i>
bisfenol A	275.048	15.702.600
17 β -estradiol	171.785	9.404.600
17 α -etinilestradiol	162.981	9.128.010

4.2.6. PRECISÃO

A precisão do método cromatográfico empregado nesse trabalho foi avaliada por meio da repetibilidade intradia e interdia. A precisão intradia foi representada pela concordância entre os resultados de seis medidas sucessivas do método, efetuadas pelo mesmo analista, sob as mesmas condições de análise, no mesmo instrumento, no mesmo local e no mesmo dia, no intervalo de tempo de horas (Figura 32-a). Já a precisão interdia foi representada pela concordância entre os resultados de dez medidas sucessivas, efetuadas pelo mesmo analista, sob as mesmas condições, no mesmo instrumento, em três dias diferentes (Figura 32-b).

Os coeficientes de variação foram inferiores a 5 % para 12 dos quinze compostos, apresentando-se próximos a 15 % apenas para o dibutilftalato, 4-octilfenol e 4-nonilfenol. Esses valores foram considerados suficientes para a análise em soluções-padrão, pois geralmente o valor máximo de CV é definido de acordo com o procedimento empregado, a concentração na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método. A ANVISA não admite valores de CV superiores a 5 % para determinação de fármacos em medicamentos (ANVISA, 2003), mas para a determinação destes em amostras mais complexas como soro, sangue ou plasma é permitido CV de até 15 % (ANVISA, 2002). Como não há uma legislação específica para a determinação desses fármacos, bem como os outros compostos abordados nessa dissertação, em águas superficiais, os limites admitidos para CV pode variar quando se valida o método com

padrões ou avalia a precisão através de uma replicata da mesma amostra de água superficial, sendo que os limites de CV devem ser menos rigorosos para esse último, por se tratar de uma matriz mais complexa.

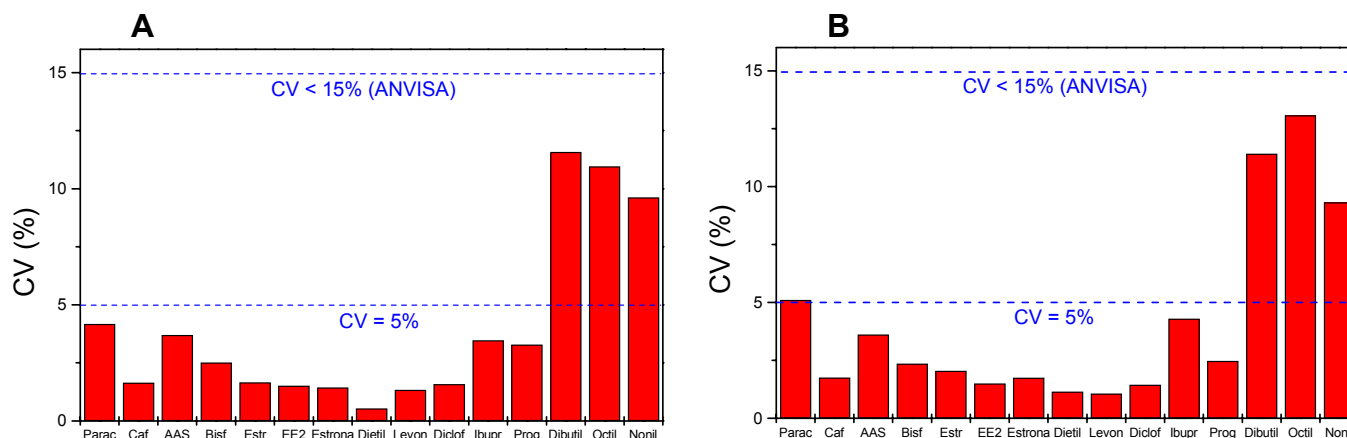


Figura 32: Repetibilidade dos resultados obtidos para uma solução-padrão contendo 5 mg L⁻¹ de cada um dos quinze compostos expressa por meio do coeficiente de variação (CV) para um número de (a) seis repetições realizadas no mesmo dia e, (b) dez repetições realizadas em três dias diferentes.

4.2.7. EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

A eficiência da extração em fase sólida foi avaliada por meio de um teste de recuperação com os compostos estudados. Para o cálculo da porcentagem de recuperação foram preparadas amostras de água desionizada enriquecida com 10,0 µg L⁻¹ de cada um dos onze de quinze compostos estudados: paracetamol, cafeína, AAS, diclofenaco, ibuprofeno, dibutilftalato, bisfenol A, 17β-estradiol, 17α-EE2, estrona e progesterona. Neste experimento a extração em fase sólida foi feita seguida da eluição dos compostos em cinco alíquotas de dois mililitros de metanol. Cada alíquota foi analisada separadamente para se verificar o volume de solvente necessário para eluição dos compostos. Foram utilizadas diferentes quantidades da amostra para

se determinar o volume de “break-through”, ou seja, a capacidade de extração do cartucho de SPE frente aos onze compostos analisados.

Na Figura 33 são mostrados os resultados obtidos para o teste de recuperação em função dos volumes de amostra e das alíquotas de metanol empregadas para eluição dos compostos. Observa-se que algumas substâncias foram totalmente eluídas com apenas quatro mililitros de solvente, como o paracetamol, estrona e ibuprofeno e que 6 mL, ou seja, três alíquotas de solvente, foram suficientes para remover da fase extratora todos os analitos de interesse. Nas duas últimas alíquotas nenhum composto foi detectado. Sendo assim, todos os procedimentos de extração por SPE foram realizados com, no mínimo, 6 mL de metanol para a eluição dos compostos.

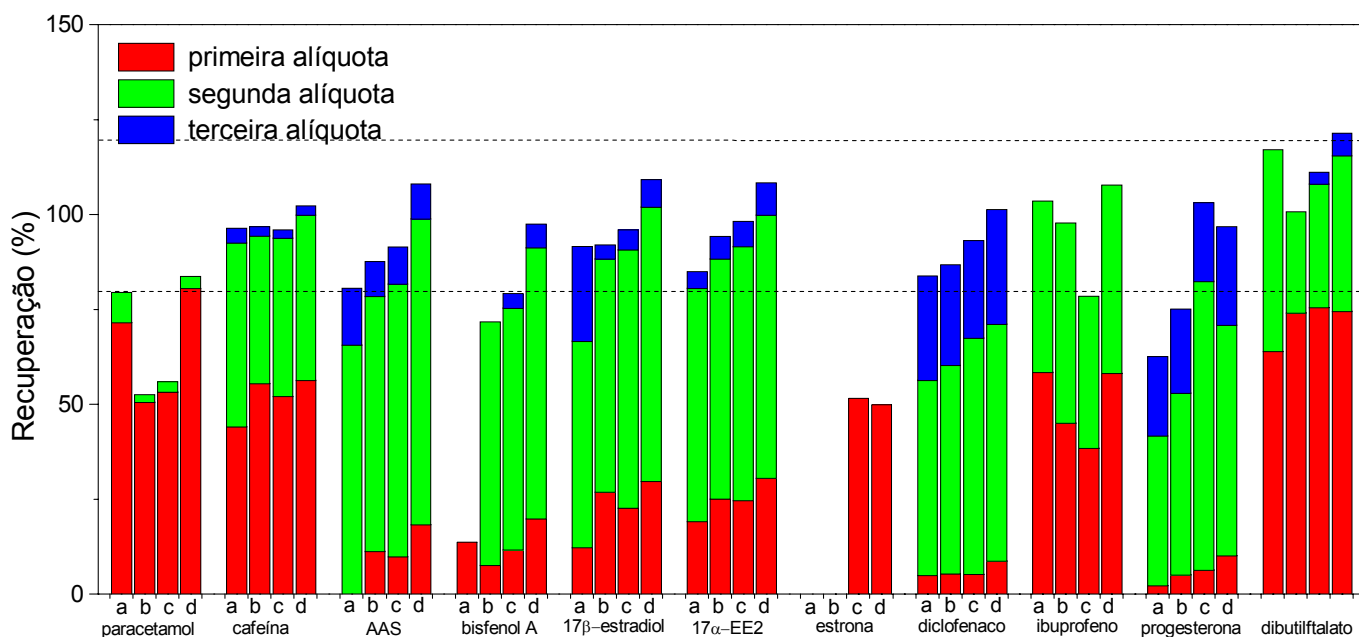


Figura 33: Teste de recuperação para onze compostos empregando-se extração em fase sólida e determinação cromatográfica por HPLC-DAD. As letras a, b, c e d representam volumes da amostra de 250, 500, 750 e 1000 mL.

A recuperação dos compostos foi calculada por meio da somatória das concentrações determinadas em cada alíquota de metanol. Observa-se que a porcentagem de recuperação dos compostos variou em função dos volumes de amostra empregados. Para alguns compostos o volume de amostra foi determinante para se atingir recuperações próximas a 100 %. De maneira geral, observou-se que a recuperação foi maior em função do aumento do volume de amostra. Porém, para a cafeína a porcentagem de recuperação ficou próxima a 100 % independente do volume de amostra enquanto que a estrona não pode ser extraída com volumes inferiores a 750 mL para esse método proposto. No caso do dibutilftalato observaram-se os valores mais elevados de recuperação em todos os volumes de amostra, permanecendo dentro na faixa esperada de 80 a 120 % de recuperação (INMETRO, 2003).

A eficiência da extração em fase sólida foi considerada satisfatória empregando-se 1 L de amostra e, considerando-se que a maioria dos compostos seriam encontrados em concentrações inferiores a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ nas amostras reais e estes deveriam ser extraídos e concentrados simultaneamente a partir de uma mesma amostra empregando-se apenas um procedimento de extração e eluição, foi adotado o volume de extração de 1 L para todas as amostras extraídas. O teste de recuperação foi então repetido para este volume de amostra de água desionizada enriquecida com $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada um dos quinze compostos estudados para se verificar a eficiência de extração com concentrações dos analitos mais próximas das reais. A Tabela 17 mostra as porcentagens de recuperação para as duas amostras de 1 L, contendo $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ dos compostos analisados, respectivamente.

A partir dos dados contidos nessa Tabela nota-se que para oito dos onze compostos analisados no primeiro teste de recuperação a porcentagem de recuperação variou entre 90 e 110 %. Este resultado é satisfatório considerando-se que estas substâncias pertencem a diferentes classes de compostos. Já para o segundo teste, com amostra de concentração dos analitos dez vezes menor, a eficiência da extração diminuiu cerca de 35 % e a porcentagem de recuperação variou entre 65 e 85 % para dez dos quinze compostos analisados nesse teste. Esse comportamento foi esperado uma vez que a eficiência da recuperação está diretamente relacionada com a concentração dos analitos na amostra.

Tabela 17: Porcentagem de recuperação dos compostos extraídos por SPE em duas amostras de 1 L cada enriquecida com $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada composto.

Compostos	Recuperação (%)	
	$10,0 \mu\text{g L}^{-1}$	$1,0 \mu\text{g L}^{-1}$
paracetamol	84	35
cafeína	102	74
AAS	108	50
bisfenol A	97	85
17β -estradiol	109	65
17α -etinilestradiol	108	74
estrone	50	72
dietilftalato	-	73
levonorgestrel	-	72
diclofenaco	101	65
ibuprofeno	108	68
progesterona	96	68
dibutilftalato	121	98
4-octilfenol	-	58
4-nonilfenol	-	57

O paracetamol apresentou baixa porcentagem de recuperação no segundo teste realizado. Para a cafeína e o dibutilftalato a eficiência da extração diminuiu cerca de 25 % com a diminuição da concentração dos analitos na amostra. O levonorgestrel e o dietilftalato foram analisados apenas na amostra menos concentrada e obtiveram porcentagem de recuperação em torno de 70 %. Os dois surfactantes, 4-octilfenol e 4-nonilfenol apresentaram eficiência intermediária no teste de recuperação com a amostra contendo $1 \mu\text{g L}^{-1}$ dos compostos.

Essa diferença na eficiência de extração para os diferentes compostos se deve ao fato de se tratar de substâncias químicas muito diferentes e que sofrem interações distintas com o sorvente. A Tabela 18 mostra a classificação dessas substâncias analisadas considerando-se aspectos como tipo, função orgânica e classe específica.

Tabela 18: Classificação dos compostos orgânicos analisados considerando-se suas funções e características estruturais.

Nome	Tipo	Função orgânica	Classe^a
Paracetamol	Fármaco	Amida	Acetanilida
Cafeína	Fármaco	Amida	Xantina
AAS	Fármaco	Ácido carboxílico	Ácido hidroxibenzóico
Ibuprofeno	Fármaco	Ácido carboxílico	Fenilpropionato
Diclofenaco	Fármaco	Ácido carboxílico	Fenilacetato
17 α -etinilestradiol	Esteróide	Diol	Norpregnantrieno
17 β -estradiol	Esteróide	Diol	Estreno
Estrona	Esteróide	Cetona	Estreno
Levonorgestrel	Esteróide	Cetona	Norpregneno
Progesterona	Esteróide	Cetona	Pregnenodiona
Dietilftalato	Plastificante	Ester	Ftalato
Dibutilftalato	Plastificante	Ester	Ftalato
Bisfenol A	Plastificante	Fenol	Bisfenol
4-Octilfenol	Surfactante	Fenol	Alquilfenol
4-Nonilfenol	Surfactante	Fenol	Alquilfenol

a Classe hierárquica com relação ao sistema de classificação MeSH.(NLM, 2006).

4.3. TERCEIRA ETAPA: CAMPANHAS AMOSTRAIS

Para a determinação dos quinze compostos nas matrizes aquáticas, foram cuidadosamente empregadas três etapas importantes que garantiram o sucesso da análise: (1) coleta e preservação da amostra, (2) extração e concentração dos analitos, (3) separação e determinação dos compostos usando HPLC-DAD/FL. As quatro campanhas realizadas, duas no período de estiagem e duas no período de cheia dos rios contribuíram para o estudo da influência da sazonalidade na concentração dos compostos nos corpos d'água.

4.3.1. FÁRMACOS

Foram analisados nesse trabalho, quatro fármacos: paracetamol, AAS, diclofenaco e ibuprofeno em dez diferentes locais de coleta e em quatro campanhas amostrais. Nesses corpos d'água houve baixa incidência dos compostos dessa classe, quando comparados aos demais compostos estudados, com exceção do ribeirão Anhumas onde foram detectados três dos quatro fármacos analisados.

O ibuprofeno não foi detectado em nenhuma amostra em concentrações acima de 51 ng L^{-1} , a qual corresponde ao limite de detecção do método empregado nesse trabalho para análise desse composto em 1 litro de amostra, o que já era esperado por se tratar de um fármaco pouco consumido no Brasil. Em países como Alemanha, Finlândia e Suíça, as concentrações detectadas nos rios estão entre 0,6 e 37 ng L^{-1} , inferiores ao LD estabelecido (Ternes, 2001; Weigel *et al.*, 2002; Lindqvist *et al.*, 2005; Marin *et al.*, 2005). Já no rio Tyne na Inglaterra são detectados concentrações mais elevadas de ibuprofeno, próximas a 600 ng L^{-1} (Roberts e Thomas, 2006).

O diclofenaco foi determinado apenas nas amostras dos ribeirões Pinheiros e Anhumas durante a quarta campanha amostral em concentrações de 96 e 115 ng L^{-1} , respectivamente. O LD estabelecido para esse fármaco foi de 13 ng L^{-1} para o volume de 1 L de amostra. Concentrações semelhantes àsquelas encontradas em rios da Alemanha (Ternes, 1998; Ternes, 2001). Porém, na Finlândia e na Áustria as

concentrações em rios não ultrapassam 35,5 ng L⁻¹ (Lindqvist *et al.*, 2005; Ahrer *et al.*, 2001).

Em junho de 1997, foram monitorados durante seis dias a ocorrência de onze fármacos, incluindo o ibuprofeno e diclofenaco, no rio Paraíba do Sul (RJ). Nesse período de estiagem, foram determinadas concentrações de diclofenaco entre 10 e 60 ng L⁻¹, mas o ibuprofeno não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas em concentração superior ao limite de detecção que, para esse caso foi estabelecido em 10 ng L⁻¹ (Ternes, 1999).

O paracetamol foi encontrado nos períodos de estiagem em amostras do ribeirão Anhumas em concentrações de 13.440 e 280 ng L⁻¹, nas segunda e terceira campanhas, respectivamente. Essas são concentrações similares às detectadas em estações de tratamento de esgoto de países como EUA, Inglaterra e Alemanha (Kolpin *et al.*, 2002; Glassmeyer *et al.*, 2005; Roberts e Thomas, 2006; Bound e Voulvoulis, 2006; Ternes, 1998). Nas demais amostras, esse fármaco não foi encontrado em concentrações maiores que o limite de detecção que foi estabelecido em 33 ng L⁻¹ para o volume de 1 L de amostra.

Diferente do paracetamol, o AAS foi determinado no ribeirão Anhumas nas quatro campanhas amostrais. As concentrações variaram significativamente com o aumento no volume das chuvas. Nas duas campanhas realizadas no período de estiagem as concentrações de paracetamol no ribeirão Anhumas foram de 20.960 e 12.212 ng L⁻¹ nas segunda e terceira campanhas, respectivamente. Com o aumento do volume dos rios essas concentrações diminuíram para 476 e 619 ng L⁻¹, durante a primeira e quarta campanhas, realizadas nos meses de março de 2006 e janeiro de 2007. Além do ribeirão Anhumas, o AAS foi determinado na amostra do rio Jundiaí durante a campanha realizada em junho de 2006 em concentração igual a 567 ng L⁻¹, e no ribeirão Pinheiros na quarta campanha em concentração de 1.036 ng L⁻¹. Na Alemanha a concentração máxima encontrada em rios foi de 340 ng L⁻¹ de acordo com Ternes (1998). O AAS é um composto facilmente biodegradado no meio aquático e a presença dele em amostras como as do ribeirão Anhumas, reforça o estágio de degradação que se encontra esse corpo d'água que é agravado pelo aporte constante de esgoto

doméstico ao longo de seu curso. O limite de detecção para a análise desse composto em 1 litro de amostra foi de 49 ng L^{-1} .

A presença de fármacos em águas naturais tem sido atribuída ao lançamento de efluentes de estações de tratamento de esgotos e do próprio esgoto doméstico bruto que são lançados diariamente e em grande volume ao longo dos cursos d'água (Ternes, 1998; Hirsch *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2002). O aporte de esgoto doméstico é, praticamente, constante ao longo do ano. Porém, no período de menor pluviosidade as concentrações de compostos oriundos da atividade antrópica aumentam devido à ausência do efeito de diluição promovido pela alta pluviosidade predominante no verão.

4.3.2. CAFEÍNA

A cafeína é considerada uns dos principais indicadores no aporte de espécies antrópicas em sistemas aquáticos naturais (Siegener e Chen, 2002). A presença deste composto está relacionada diretamente com o despejo de esgoto doméstico não tratado nessas matrizes, o que indica o elevado nível de degradação em que se encontram os rios da RMC. As concentrações de cafeína nos dez locais de amostragem durante as quatro campanhas estão mostradas na Tabela 19 juntamente com a estimativa desvio padrão (s) obtida nas replicatas feitas na quarta campanha.

A cafeína foi encontrada em todos os pontos amostrais e mostrou-se presente tanto no período de maior pluviosidade, como no período de estiagem. As maiores concentrações foram verificadas nas segunda e terceira campanhas. Concentrações inferiores ao LD, estabelecido em $0,01 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para o volume de 1 L de amostra, foram determinadas apenas na quarta campanha e somente nas amostras do rio Atibaia nos pontos P7 e P8, referentes à Represa de Salto Grande e, próximo a sua foz, no rio Piracicaba. Concentrações bastante elevadas foram encontradas nas amostras coletadas no Ribeirão Anhumas. Este corpo d'água caracteriza-se por receber elevada quantidade de efluentes provenientes diretamente da região mais densamente urbanizada, respondendo pela maior carga orgânica pontual lançada na bacia do rio Atibaia. A Figura 34 mostra a variação na concentração de cafeína que ocorreu nas

amostras entre a terceira e quarta campanhas, realizadas em períodos de baixa e alta vazão dos rios, respectivamente.

Tabela 19: Concentração de cafeína, em $\mu\text{g L}^{-1}$, determinada nas amostras durante as quatro campanhas de amostragem.

Pontos de amostragem		1 ^a campanha março/06	2 ^a campanha jun/06	3 ^a campanha ago/06	4 ^a campanha jan/07 (s)
P1	Rio Atibaia / Atibaia	0,2	3,3	2,1	0,4 (+/- 0,2)
P2	Rio Atibaia / Sousas	-	3,8	1,3	0,3 (+/- 0,1)
P3	Ribeirão Pinheiros	-	9,6	3,6	0,6 (+/- 0,2)
P4	Rio Atibaia / captação	0,7	5,5	1,8	0,6 (+/- 0,2)
P5	Ribeirão Anhumas	3,3	127	73,9	5,8 (+/- 0,6)
P6	Rio Atibaia / Paulínia	0,3	16,9	6,9	4,8 (+/- 0,8)
P7	Rio Atibaia / Represa	-	-	0,7	< LD ^a
P8	Rio Atibaia / Foz	-	-	2,2	< LD ^a
P9	Rio Capivari	0,5	16,9	7,2	1,1 (+/- 0,4)
P10	Rio Jundiá	2,0	23,1	10,5	0,8 (+/- 0,3)

^a LD: limite de detecção para cafeína igual a $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$, (-): não analisado.

Os pontos de amostragem localizados no rio Atibaia, na cidade de Atibaia (P1), e no início da cidade de Campinas (P2), apresentaram baixa contaminação por cafeína. Porém observou-se que o ribeirão Pinheiros (P3), que é um afluente direto do rio Atibaia, provoca um aumento na concentração de cafeína neste corpo próximo ao local de captação de água da SANASA (P4), quando se compara as concentrações obtidas no ponto P2 localizado no rio Atibaia à montante da afluência do ribeirão Pinheiros com o ponto P4. Entretanto, após atravessar a cidade de Campinas, observa-se um aumento na concentração desta substância no ponto de amostragem P6 localizado na cidade de Paulínia, principalmente durante as campanhas realizadas no período de estiagem. Este local localizado à jusante da cidade de Campinas e do aporte do ribeirão Anhumas recebe grande volume de esgoto ao atravessar o município campineiro. Nos rios Jundiá e Capivari também foram observadas concentrações elevadas de cafeína, e de maneira geral, maiores que aquelas encontradas ao longo de todo rio Atibaia.

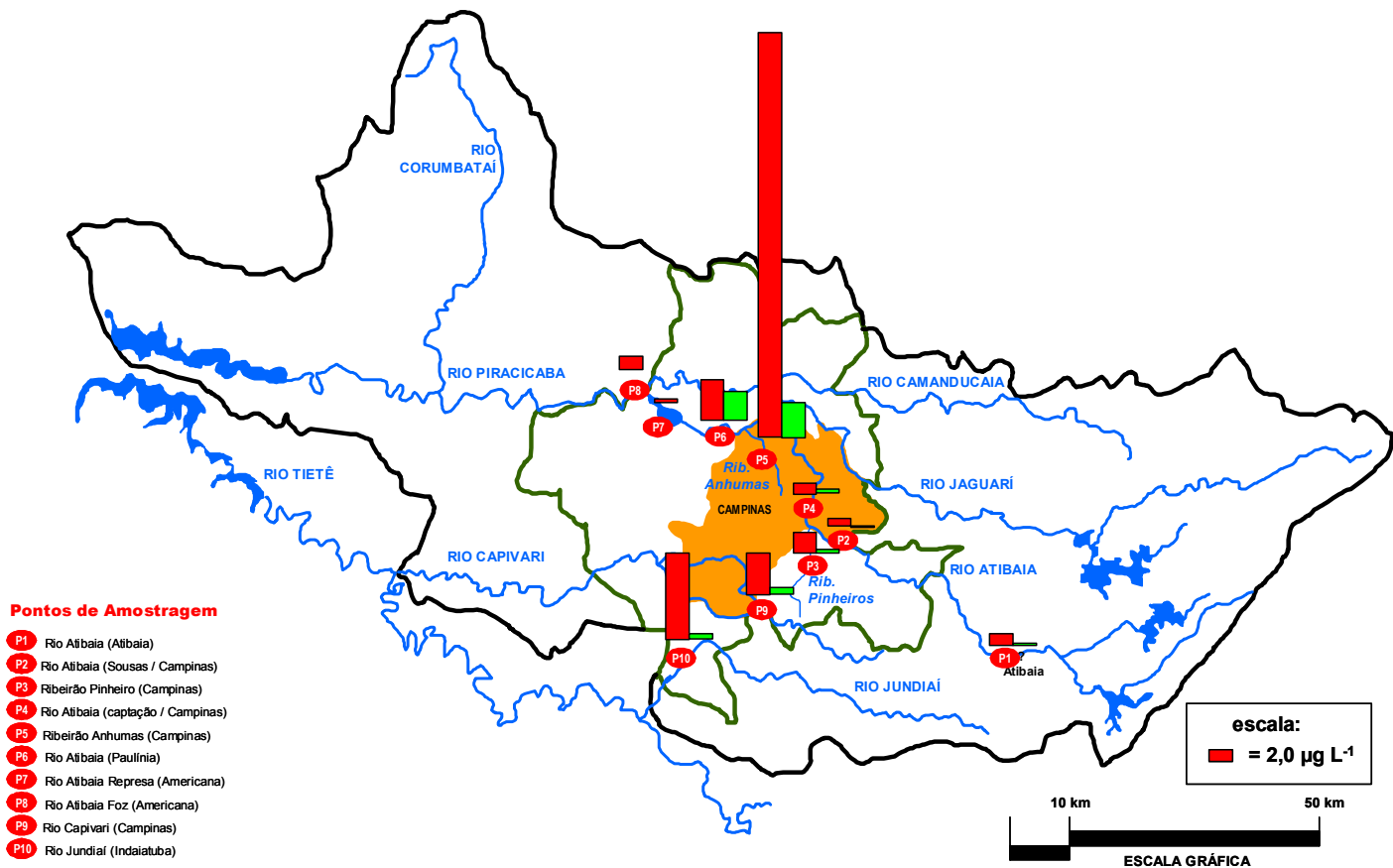


Figura 34: Mapa referente a UGRHI 5 onde estão inseridos os rios em estudo e as concentrações de cafeína presentes nos dez pontos amostrais determinadas na terceira campanha (barra vermelha) e quarta campanha (barra verde).

Em um trabalho realizado em rios da cidade de Miami, nos Estados Unidos, Gardinali e Zhao (2002), encontraram concentrações de cafeína entre 6 e 41 ng L⁻¹. Estes valores são muito inferiores aos encontrados nos rios da RMC. Esta diferença pode ser explicada com base na situação dos serviços de água e esgoto em ambos os países. Nos Estados Unidos, a grande maioria do esgoto doméstico produzido é tratado, enquanto que o Brasil ainda enfrenta problemas relacionados ao lançamento de esgotos nos sistemas aquáticos naturais. Na RMC apenas 15% do esgoto coletado recebem tratamento (IBGE, 2002). Os níveis de concentração encontrados para a cafeína nas águas superficiais da RMC, na faixa de 0,2 a 127,1 µg L⁻¹, são compatíveis aos teores determinados em amostras de esgoto na Alemanha, com valores médios de 54,7 µg L⁻¹ (Weigel *et al.*, 2004).

4.3.3. INTERFERENTES ENDÓCRINOS

Considerando-se as 34 amostras coletadas referentes aos dez locais de coleta e às quatro campanhas amostrais, em 94 % das amostras foram determinadas substâncias químicas consideradas interferentes endócrinos. Este resultado é bastante similar ao encontrado em estudos realizados pelo centro de pesquisas geológicas dos Estados Unidos (USGS) que avaliaram a presença de 95 compostos em 139 corpos de água encontrando traços de substâncias emergentes em 80 % das amostras (Kolpin *et al.*, 2002). Mais do que isso, estes resultados mostram a relevância dos dez compostos classificados como interferentes endócrinos selecionados no presente trabalho quanto à possibilidade de serem encontrados em águas naturais. Dentre eles, mais do que um foi determinado em 56 % das amostras. Oito substâncias químicas foram detectadas ao menos uma vez nas amostras. São elas, dibutilftalato, bisfenol A, 17 β -estradiol, 17 α -EE2, progesterona, levonorgestrel, 4-octilfenol e 4-nonilfenol. Destes, os três primeiros foram determinados em todas as campanhas realizadas, enquanto que o 17 α -EE2 não foi determinado na terceira campanha e esteve presente em apenas 5 das 34 amostras analisadas. Já os quatro últimos foram determinados apenas na quarta campanha, realizada em janeiro de 2007. O dietilftalato e a estrona não foram detectados nas amostras em concentrações superiores aos seus limites de detecção que foram estabelecidos em 33 e 16 ng L⁻¹ para cada um, respectivamente.

Dentre os três compostos dessa classe mais freqüentemente detectados nas 34 amostras, o dibutilftalato foi encontrado em maior número de vezes (94 %) seguido do bisfenol A que apareceu em 56 % das amostras e do 17 β -estradiol que foi determinado em 35 % das amostras. As concentrações dos quatro compostos mais freqüentemente determinados nas amostras, incluindo a cafeína também detectada em 94 % delas, são mostradas na Figura 35 onde se observa que as concentrações dos cinco compostos variaram em até quatro ordens de magnitude. A menor variabilidade foi verificada para o dibutilftalato, cujas concentrações médias e medianas foram de 9.342 e 7.414 ng L⁻¹, respectivamente. Ao contrário do comportamento observado para o dibutilftalato, os demais compostos mostrados nessa Figura apresentaram uma grande variabilidade dos resultados. As concentrações de bisfenol A variaram de 139 a 11.725 ng L⁻¹,

enquanto que para o 17 β -estradiol foram detectados valores mínimos e máximos de 106 e 6.806 ng L⁻¹, respectivamente. No caso da cafeína, os níveis determinados variaram entre 247 e 127.092 ng L⁻¹. Vethaak e colaboradores (2005) realizaram um estudo sobre a ocorrência de interferentes endócrinos em diversas matrizes ambientais e verificaram que a concentração de alguns interferentes endócrinos variou em até duas ordens de magnitude.

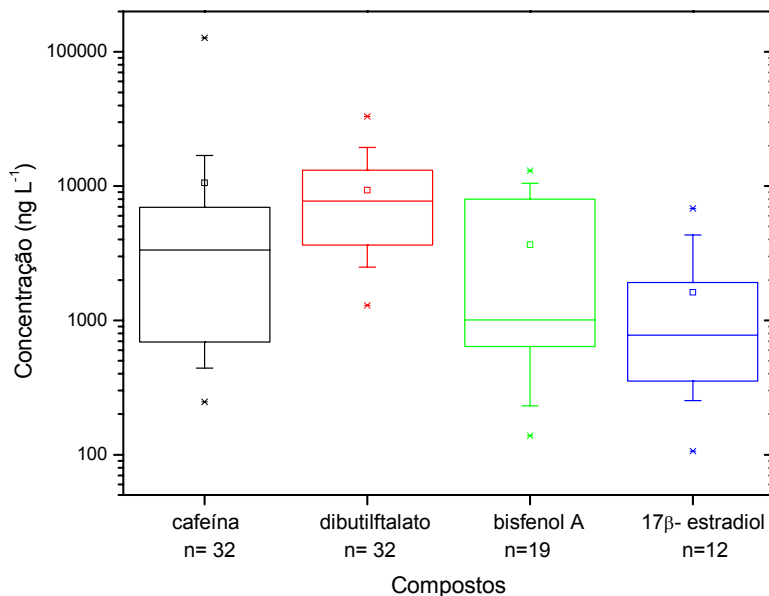


Figura 35: Concentração dos quatro compostos determinados com mais freqüência nos rios estudados em todas as campanhas amostrais. A média aritmética é representada pelo círculo. As linhas horizontais da caixa representam 25, 50 (mediana) e 75 % dos valores; barras de erro indicam 5 e 95 %; (X) expressa 1 e 99 % e (–) corresponde aos valores máximos e mínimos, n indica o número de determinações para cada composto.

As concentrações de dibutylftalato nos dez locais de amostragem e nas quatro campanhas estão mostradas na Tabela 20, onde se nota que o composto foi encontrado em quase todos os pontos amostrais e em todas as campanhas, com exceção das amostras referentes aos pontos P7 e P8, localizados em Americana. A estimativa do desvio padrão (s) das replicatas realizadas na quarta campanha também estão indicados entre parênteses nessa tabela.

Tabela 20: Concentração de dibutilftalato ($\mu\text{g L}^{-1}$) encontrada durante as quatro campanhas de amostragem.

Pontos de amostragem		1 ^a campanha março/06	2 ^a campanha jun/06	3 ^a campanha ago/06	4 ^a campanha jan/07 (s)
P1	Rio Atibaia / Atibaia	2,8	13,1	1,3	3,2 (+/- 0,6)
P2	Rio Atibaia / Sousas	-	17,6	< LD ^a	2,4 (+/- 0,5)
P3	Ribeirão Pinheiros	-	25,9	5,4	3,8 (+/- 0,3)
P4	Rio Atibaia / captação	2,6	22,3	< LD ^a	2,9 (+/- 0,7)
P5	Ribeirão Anhumas	10,4	33,1	7,1	4,3 (+/- 0,2)
P6	Rio Atibaia / Paulínia	9,6	19,4	7,7	3,5 (+/- 0,8)
P7	Rio Atibaia / Represa	-	-	4,0	2,0 (+/- 0,3)
P8	Rio Atibaia / Foz	-	-	4,9	1,8 (+/- 0,3)
P9	Rio Capivari	3,8	15,5	3,6	5,5 (+/- 0,8)
P10	Rio Jundiá	7,7	13,9	3,6	8,8 (+/- 1,2)

^a LD: limite de detecção para dibutilftalato igual a $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$, (-): não analisado.

Maiores concentrações do composto foram determinadas na segunda campanha amostral, realizada durante o período de estiagem. Como mostrado no gráfico de precipitação úmida diária da Figura 7, na data que foi realizada a segunda campanha havia um período de estiagem de cerca de 50 dias. Já antes da terceira campanha, esse período sem chuvas foi de apenas 10 dias, pois eventos de chuvas em alguns dias isolados, por menor que foram, favoreceram a diminuição da concentração dos compostos quando comparado àquelas determinadas na campanha anterior.

Além disso, não houve grande variação na concentração do dibutilftalato entre as amostras de uma mesma campanha. Este é um composto persistente no ambiente e seu aporte para sistemas de água doce pode ocorrer por meio de diversas fontes, dentre elas o descarte de lixos e esgotos doméstico e industrial e o lançamento direto de efluentes industriais (Birkett e Lester, 2003).

Essas concentrações de dibutilftalato são cerca de 10 vezes maiores do que àquelas encontradas em rios da África do Sul (Fatoki e Noma, 2002) e em efluentes de ETE da Inglaterra (Oliver *et al.*, 2005). E, apesar de nesses locais também terem sido

detectados concentrações de dietilftalato próximas as do dibutilftalato, este último não foi determinado nos rios da RMC em concentrações superiores a 33 ng L^{-1} (LD para o volume de 1 L de amostra analisada).

As concentrações de bisfenol A nos dez locais de amostragem e nas quatro campanhas estão mostradas na Tabela 21, juntamente com a estimativa desvio padrão (s) obtida nas replicatas feitas na quarta campanha.

Observa-se que o bisfenol A foi determinado, em concentrações mais elevadas, apenas nas amostras referentes ao período de estiagem, refletindo mais uma vez a influência do aporte de esgoto. Foram determinadas concentrações extremamente elevadas de bisfenol A nas amostras do ribeirão Anhumas, principalmente na quarta campanha amostral (13.016 ng L^{-1}) onde as concentrações deste composto nas demais amostras estiveram abaixo de 650 ng L^{-1} . Verificou-se também que o rio Atibaia, na cidade de Paulínia (P6) é diretamente influenciado pelas altas concentrações do ribeirão Anhumas, além de estar à jusante de um grande pólo industrial.

Tabela 21: Concentração de bisfenol A (ng L^{-1}) nas amostras durante as quatro campanhas de amostragem.

Pontos de amostragem		1 ^a campanha março/06	2 ^a campanha jun/06	3 ^a campanha ago/06	4 ^a campanha jan/07 (s)
P1	Rio Atibaia / Atibaia	< LD ^a	< LD ^a	< LD ^a	< LD ^a
P2	Rio Atibaia / Sousas	-	< LD ^a	< LD ^a	< LD ^a
P3	Ribeirão Pinheiros	-	11.725	6.718	204 (+/- 50)
P4	Rio Atibaia / captação	< LD ^a	844	< LD ^a	< LQ ^b
P5	Ribeirão Anhumas	808	8.002	10.518	13.016 (+/-360)
P6	Rio Atibaia / Paulínia	231	1.005	1.889	632 (+/- 24)
P7	Rio Atibaia / Represa	-	-	< LD ^a	< LD ^a
P8	Rio Atibaia / Foz	-	-	< LD ^a	< LD ^a
P9	Rio Capivari	257	8.241	641	139 (+/- 73)
P10	Rio Jundiá	1.006	2.660	932	< LQ ^b

^a LD: limite de detecção para bisfenol A igual a 38 ng L^{-1} , ^b LQ: limite de quantificação para o bisfenol A igual a 128 ng L^{-1} , (-): não analisado.

Nas amostras do rio Atibaia / captação e do rio Jundiá, foram detectadas a presença de bisfenol A na quarta campanha, porém estas estavam entre o limite de quantificação ($LQ = 128 \text{ ng L}^{-1}$) e limite de detecção do método ($LD = 38 \text{ ng L}^{-1}$). O bisfenol A é um composto empregado em diversas atividades industriais atuando como constituinte de várias resinas epóxi. No ambiente, este composto apresenta uma elevada persistência. Os valores determinados em rios da RMC são muito superiores aos comumente descritos na literatura. Suzuki e colaboradores (2004) determinaram concentrações máximas de 230 ng L^{-1} no rio Tama do Japão e Heisterkamp e colaboradores (2004) detectaram valores ainda menores, cerca de 40 ng L^{-1} , no rio Bilina na Alemanha. Em amostras de efluentes de estações de tratamento de esgoto detectaram concentrações entre 85 e 28.000 ng L^{-1} .

O 17β -estradiol foi detectado em 12 das 34 amostras analisadas nesse trabalho. A Tabela 22 mostra as concentrações desse esteróide determinadas nas amostras durante as quatro campanhas, juntamente com a estimativa desvio padrão (s) obtida na quarta campanha e considerando o LD de 45 ng L^{-1} para a análise de 1 L de amostra,.

Tabela 22: Concentração de 17β -estradiol (ng L^{-1}) nas amostras durante as quatro campanhas de amostragem.

Pontos de amostragem		1 ^a campanha março/06	2 ^a campanha jun/06	3 ^a campanha ago/06	4 ^a campanha jan/07 (s)
P1	Rio Atibaia / Atibaia	< LD ^a	< LD ^a	< LD ^a	< LD ^a
P2	Rio Atibaia / Sousas	-	< LD ^a	< LD ^a	< LD ^a
P3	Ribeirão Pinheiros	-	< LD ^a	< LD ^a	354 (+/- 29)
P4	Rio Atibaia / captação	< LD ^a	< LD ^a	< LD ^a	106 (+/- 6)
P5	Ribeirão Anhumas	464	6.806	2.273	1.313 (+/- 18)
P6	Rio Atibaia / Paulínia	< LD ^a	< LD ^a	< LD ^a	319 (+/- 43)
P7	Rio Atibaia / Represa	-	-	< LD ^a	< LD ^a
P8	Rio Atibaia / Foz	-	-	< LD ^a	< LD ^a
P9	Rio Capivari	< LD ^a	< LD ^a	< LD ^a	252 (+/- 81)
P10	Rio Jundiá	779	4.325	1.912	456 (+/- 111)

^a LD: limite de detecção para 17β -estradiol igual a 45 ng L^{-1} , (-): não analisado.

Esse estrogênio natural foi determinado em todas as campanhas no ribeirão Anhumas e no rio Jundiá. As concentrações variaram significativamente, sendo mais elevadas nos períodos de estiagem evidenciando o impacto de ambos os corpos de água em função da atividade antrópica, em especial, do aporte de esgoto doméstico. Além desses dois, outros quatro locais amostrados na quarta campanha apresentaram concentrações de 17β -estradiol entre 106 e 456 ng L⁻¹. Foram eles: o ribeirão Pinheiros, o rio Capivari e o rio Atibaia nos pontos P4 e P6, em Campinas e Paulínia, respectivamente. Essas são concentrações extremamente elevadas quando comparada às aquelas encontradas em águas superficiais de países como EUA, Alemanha, Holanda, Inglaterra e França onde são detectadas concentrações máximas de 7,1 ng L⁻¹. Mesmo nas ETE desses países e outros como Austrália, Itália, Portugal e China, as concentrações não ultrapassam 225 ng L⁻¹ no esgoto bruto (Dorabawila e Gupta, 2005; Kolodziej *et al.*, 2004; Kuch e Ballschmiter, 2001; Belfroid *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2005; Cargouet *et al.*, 2004; Braga *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2000; Maurício *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2005). O mesmo acontece com a concentração de estrona, outro esteróide natural analisado nesse trabalho, o qual não foi detectado nos rios da RMC em concentrações superiores ao LD estabelecido em 16 ng L⁻¹.

O 17β -estradiol é um estrogênio pertencente à classe dos estrenos. Juntamente com o estríol e o estreno, são considerados uns dos principais hormônios produzidos no corpo humano, exercendo papel fundamental no controle do ciclo menstrual em conjunto com a progesterona. Sua presença em águas naturais é um forte indício da contaminação pelo aporte de esgoto doméstico (Desbrow, 1998).

Já a progesterona foi detectada apenas na quarta campanha nas amostras do ribeirão Anhumas e rio Capivari em concentrações de 195 e 87 ng L⁻¹, respectivamente, que são próximas à detectada em ETE dos EUA por Wolpin e colaboradores (2002) onde a concentração média foi de 110 ng L⁻¹. O limite de detecção para esse hormônio foi de 19 ng L⁻¹ para análise de 1 L de amostra.

O 17α -etinilestradiol é um hormônio sintético utilizado principalmente em medicamentos anticoncepcionais. No corpo humano, apenas 15 % da substância é metabolizada enquanto que o restante é eliminado pela urina. Devido a esta

característica, o 17 α -EE2 também é considerado um indicador da contaminação fecal. Belfroid e colaboradores (1999) encontraram concentrações médias 17 α -EE2 de 4,3 ng L⁻¹ em águas superficiais de Amsterdam, na Holanda. Aqui no Brasil, nesse trabalho realizado nos rios da RMC as concentrações foram na faixa de 106 e 4.390 ng L⁻¹. Mas ele foi encontrado em concentrações superiores ao LD estabelecido em 16 ng L⁻¹, em apenas cinco amostras sendo apenas uma no período de estiagem (Tabela 23). Assim como o 17 β -estradiol, o 17 α -EE2 é encontrado em águas superficiais de países como Alemanha, Holanda e França em concentrações entre 0,1 e 5,1 ng L⁻¹, e em efluentes de ETE em concentrações máximas de 17 ng L⁻¹ (Kuch e Ballschmiter, 2001; Belfroid *et al.*, 1999; Cargouet *et al.*, 2004).

Tabela 23: Concentração de 17 α -etinilestradiol (ng L⁻¹) nas amostras durante as quatro campanhas de amostragem.

Pontos de amostragem		1 ^a campanha março/06	2 ^a campanha jun/06	3 ^a campanha ago/06	4 ^a campanha jan/07 (s)
P1	Rio Atibaia / Atibaia	< LD ^a	< LD ^a	< LD ^a	< LD ^a
P2	Rio Atibaia / Sousas	-	< LD ^a	< LD ^a	< LD ^a
P3	Ribeirão Pinheiros	-	< LD ^a	< LD ^a	< LD ^a
P4	Rio Atibaia / captação	< LD ^a	< LD ^a	< LD ^a	< LD ^a
P5	Ribeirão Anhumas	981	4.390	< LD ^a	< LD ^a
P6	Rio Atibaia / Paulínia	< LD ^a	< LD ^a	< LD ^a	< LD ^a
P7	Rio Atibaia / Represa	-	-	< LD ^a	< LD ^a
P8	Rio Atibaia / Foz	-	-	< LD ^a	< LD ^a
P9	Rio Capivari	337	< LD ^a	< LD ^a	501 (+/- 33)
P10	Rio Jundiaí	725	< LD ^a	< LD ^a	< LD ^a

^a LD: limite de detecção para 17 β -estradiol igual a 16 ng L⁻¹, (-): não analisado.

Além desses compostos, o levonorgestrel foi determinado em apenas duas amostras da quarta campanha. No ribeirão Pinheiros em concentração de 663 ng L⁻¹ e no rio Jundiaí em concentração de 641 ng L⁻¹. O limite de detecção do método empregado nesse trabalho para a análise desse composto em 1 L de amostra foi de 19 ng L⁻¹. O rio Jundiaí também apresentou concentrações de 4-octilfenol e 4-nonilfenol de 1.029 e 218 ng L⁻¹, respectivamente. O 4-octilfenol é considerado como um dos

alquilfenóis mais tóxicos e a concentração máxima detectada em estações de tratamento de esgoto dos EUA foi três vezes menor que a encontrada no rio Jundiá, cerca de 360 ng L^{-1} (Glassmeyer *et al.*, 2005). Os demais corpos d'água estudados não apresentaram concentrações desses alquilfenóis acima do limite de detecção estabelecido em 20 e 17 ng L^{-1} para o 4-octilfenol e 4-nonilfenol, respectivamente.

4.3.4. OUTROS PARÂMETROS DOS RIOS DA RMC

O Carbono Orgânico Total (TOC) foi analisado para todas as amostras durante as quatro campanhas amostrais. A Tabela 24 mostra os valores obtidos, onde se observa que concentrações mais elevadas foram obtidas nas amostras do ribeirão Anhumas (entre $7,7$ e $43,6 \text{ mg C L}^{-1}$), sendo que para as demais amostras as concentrações de TOC variaram entre $2,7$ e $9,1 \text{ mg C L}^{-1}$.

Tabela 24: Carbono Orgânico Total (TOC) (valores em mg C L^{-1}) nas amostras analisadas nas campanhas amostrais.

Pontos de amostragem		1ª campanha março/06	2ª campanha jun/06	3ª campanha ago/06	4ª campanha jan/07
P1	Rio Atibaia / Atibaia	5,4	2,7	3,0	5,7
P2	Rio Atibaia / Sousas	-	4,9	3,4	5,5
P3	Ribeirão Pinheiros	-	21,3	6,6	5,9
P4	Rio Atibaia / captação	4,5	5,7	3,1	5,6
P5	Ribeirão Anhumas	7,7	43,6	13,8	10,2
P6	Rio Atibaia / Paulínia	6,7	3,5	3,6	6,4
P7	Rio Atibaia / Represa	-	-	9,1	5,8
P8	Rio Atibaia / Foz	-	-	4,1	6,5
P9	Rio Capivari	5,2	2,8	4,1	7,4
P10	Rio Jundiá	7,0	7,8	8,0	5,9

(-): não analisado.

Durante as coletas da quarta campanha amostral, realizadas em três dias consecutivos e no período da manhã, foram medidos alguns parâmetros físico-químicos das amostras coletadas. As medidas foram realizadas *in situ* e os dados referentes à temperatura, pH, condutividade e oxigênio dissolvido estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25: Parâmetros físico-químicos das amostras medidas *in situ* durante as coletas da quarta campanha amostral, realizada em janeiro de 2007.

Pontos de amostragem		Temperatura (° C)	pH	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	O₂ dissolvido (mg L⁻¹)
P1	Rio Atibaia / Atibaia	22,4	6,7	61	5,4
P2	Rio Atibaia / Sousas	24,4	7,4	79	7,0
P3	Ribeirão Pinheiros	22,9	7,2	241	2,9
P4	Rio Atibaia / captação	24,1	7,4	91	5,8
P5	Ribeirão Anhumas	23,1	7,1	133	1,9
P6	Rio Atibaia / Paulínia	23,7	7,5	225	5,8
P7	Rio Atibaia / Represa	25,5	7,3	126	3,1
P8	Rio Atibaia / Foz	25,4	7,2	125	3,0
P9	Rio Capivari	23,8	7,1	157	5,7
P10	Rio Jundiá	24,6	7,2	163	6,1

A Tabela 25 mostrou alguns parâmetros físico-químicos das amostras em um período de alta pluviosidade, o que provoca um ambiente de cheia dos rios. De maneira geral, nessas condições, a temperatura dos corpos d’água oscilou entre 22,4 e 25,5 °C, o pH variou entre 6,7 e 7,5. O maior valor de condutividade foi obtido para amostra do ribeirão Pinheiros (241 $\mu\text{S cm}^{-1}$), seguida do rio Atibaia / Paulínia (225 $\mu\text{S cm}^{-1}$). As demais amostras apresentaram condutividade entre 61 e 163 $\mu\text{S cm}^{-1}$, sendo que os menores valores foram detectados para as amostras do rio Atibaia localizadas à montante da cidade de Campinas (P1, P2 e P4). O oxigênio dissolvido variou significativamente entre as amostras desde 1,9 mg L⁻¹ para o ribeirão Anhumas até 7,0 mg L⁻¹ de O₂ para o ponto amostral P2, referente ao rio Atibaia / Sousas.

Os dados de condutividade e oxigênio dissolvido foram similares com os registrados pela CETESB no seu Relatório de Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo de 2006.

O rio Atibaia, ao longo do seu curso, apresentou variação na concentração de oxigênio dissolvido entre 5,4 e 7,0 mg L⁻¹ de O₂ desde a cidade de Atibaia (P1) até Paulínia (P6). Já na cidade de Americana foram determinados valores de aproximadamente 3 mg L⁻¹ de O₂ nos dois locais de coleta. A diminuição na qualidade da água também pode ser verificada pelo aumento no valor de condutividade das amostras localizadas à jusante da cidade de Campinas.

Com relação à presença dos contaminantes emergentes estudados nesse trabalho, observou-se uma tendência no aumento do número desses compostos presentes ao longo do rio. Nos dois primeiros pontos de coleta, na estação de captação de água do município de Atibaia (SAAE) e no ponto P2 em Campinas, na divisa com o município de Valinhos, foram determinados apenas cafeína e dibutilftalato. A aproximadamente dois quilômetros do segundo ponto tem-se o terceiro local de amostragem ao longo do rio Atibaia (P4), na estação de captação de água do município de Campinas. Neste local foram detectados mais dois compostos, o bisfenol A e o 17β-estradiol. O ribeirão Pinheiros, tributário do rio Atibaia, localizado à jusante do P2 e a montante deste ponto possivelmente contribui para a degradação da qualidade da água do rio Atibaia, já que é um corpo d'água Classe 3 (CONAMA 357/05) e recebe grande parte da carga orgânica poluidora dos municípios de Valinhos e Vinhedo. Segundo a CETESB, o ribeirão Pinheiros também contribui para elevados valores de fósforo e *Coliformes termotolerantes* presentes neste local, que na maior parte dos meses de 2006 foram encontrados em concentrações que ultrapassaram o limite estabelecido para a Classe 2, segunda a Resolução CONAMA 357/05.

O ribeirão Pinheiros apresentou elevada condutividade e baixos valores de oxigênio dissolvido, 241 µS cm⁻¹ e 2,9 mg L⁻¹ de O₂, respectivamente. Nesse trabalho foram encontrados cafeína, dibutilftalato e bisfenol A em todas as campanhas amostrais, além de terem sido detectados, na quarta campanha, 17β-estradiol, levonorgestrel, diclofenaco e AAS.

O próximo ponto amostral do rio Atibaia, se encontra à jusante do município de Campinas, sob a ponte da rodovia SP332 em Paulínia. Este local é importante, pois avalia o impacto causado no corpo d'água após atravessar uma cidade como Campinas, e, além disso, recebe o aporte do ribeirão Anhumas altamente impactado. Neste ponto também foram encontrados os mesmos quatro compostos presentes próximo à captação da SANASA, cafeína, dibutilftalato, 17 β -estradiol e bisfenol A. Porém, este último composto, que foi detectado apenas na época de estiagem no P4, esteve presente em todas as campanhas amostrais neste ponto, assim como a cafeína e o dibutilftalato. Apenas o 17 β -estradiol foi detectado somente na última campanha.

Segundo a CETESB em seu Relatório de qualidade das águas interiores no Estado de SP de 2006, houve um melhora na qualidade da água do rio Atibaia destinada ao abastecimento público, porém a média anual para esse ano foi considerada regular no ponto de captação de água da SANASA. Já no ponto à jusante da cidade de Campinas, o índice médio foi considerado ruim. Com relação à preservação da vida aquática esse relatório aponta piora na qualidade da água após atravessar a cidade.

Os dois pontos estudados no município de Americana foram na Represa de Salto Grande (P7), com as águas provenientes do rio Atibaia e, próximo a sua afluição com o rio Jaguari, onde juntos formam o rio Piracicaba, à jusante da represa (P8). Estes dois pontos foram avaliados apenas nas terceira e quarta campanhas, realizadas nos períodos de seca e cheia, respectivamente. Nessas amostras foram determinadas concentrações de dibutilftalato nas duas campanhas, porém, inferiores àquelas encontradas nos três pontos localizados em Campinas, mas ainda assim, foram maiores que àquelas determinadas no município de Atibaia, no primeiro ponto amostral. Apesar de ser um composto persistente, o período em que permanecem na represa, além do efeito de diluição, devido ao acúmulo de grande volume de água, podem sofrer fotodegradação, diminuindo assim a concentração deles no meio. Além do dibutilftalato, a cafeína foi determinada tanto na represa como no P8, durante a campanha realizada no período de seca. As concentrações foram as menores detectadas ao longo de todo o rio (Figura 34), o que pode ser atribuído dentre outros motivos, à facilidade de biodegradação deste composto.

O ribeirão Anhumas foi o corpo d'água mais impactado dentre os cinco analisados nesse trabalho. Nele foram encontrados nove dos quinze compostos de interesse sendo que, cinco deles (a cafeína, o dibutilftalato, o bisfenol A, o 17 β -estradiol e o AAS), estiveram presentes em todas as quatro campanhas amostrais. Já o 17 α -etinilestradiol e o paracetamol foram detectados em apenas duas campanhas.

O rio Capivari é classificado como Classe 4 no local de amostragem desse trabalho que é próximo ao local onde a SANASA faz a captação da água para abastecimento dos moradores da zona oeste de Campinas, cerca de 5 % da população do município. Neste local foram encontrados seis dos quinze compostos de interesse, sendo que a cafeína, o dibutilftalato e o bisfenol A foram determinados nas quatro campanhas; o 17 α -etinilestradiol foi determinado nas duas campanhas realizadas no período de cheia; e o 17 β -estradiol e a progesterona foram detectados apenas na última campanha, também no período de elevada vazão dos rios.

No rio Jundiaí, foram encontrados nove dos quinze compostos estudados, porém, diferente do ribeirão Anhumas, apenas a cafeína, o dibutilftalato e o 17 β -estradiol foram determinados nas quatro campanhas; o bisfenol A foi encontrado apenas nos períodos de estiagem, e o 17 α -etinilestradiol, levonorgestrel, AAS, 4-octilfenol e 4-nonilfenol foram encontrados em apenas uma campanha amostral. Este rio recebe o esgoto doméstico do município de Indaiatuba. Nesse município são coletados 96 % do esgoto, mas apenas 10 % sofrem algum tipo de tratamento antes de serem lançados nos corpos d'água. Por esse motivo, em período de grande estiagem, a CETESB proíbe a captação de água para abastecimento público neste local.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho contribui para o entendimento de um tema pouco estudado no país, o qual gerou dados que permitiram conhecer o estado de degradação dos principais corpos d'água com vistas ao abastecimento público da RMC em relação a alguns compostos considerados interferentes endócrinos, bem como fármacos e a cafeína.

O método analítico empregando SPE e HPLC-DAD/FL se mostrou eficiente na determinação dos quinze compostos de interesse usando um volume de amostra de 1 litro. As concentrações de bisfenol A, 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol, presentes na faixa de nanogramas por litro só foram possíveis de serem determinadas devido à elevada detectabilidade e seletividade obtida com o detector por fluorescência. Os parâmetros de validação verificados para o procedimento proposto aumentaram a confiabilidade dos resultados apresentados, uma vez que ainda não se tem um método oficial para a determinação simultânea desses compostos. Esse procedimento poderá ainda servir como base para se iniciar estudos de monitoramento desses compostos em diversas matrizes aquáticas.

Dentre os interferentes endócrinos, o dibutilftalato foi o composto que esteve presente na maioria das amostras e em concentrações bastante elevadas, seguido do bisfenol A e dos hormônios, 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol.

Dentre os fármacos investigados, o AAS esteve presente em 6 das 34 amostras analisadas, o paracetamol e o diclofenaco foram detectados em duas amostras e o ibuprofeno esteve em concentrações inferiores ao limite de detecção estabelecido em 51 ng L^{-1} em todas as amostras analisadas.

A cafeína foi usada como um traçador de atividade antrópica, sendo encontrada nos dez pontos de coleta em concentrações que variaram tanto temporal como espacialmente, sendo maiores nos períodos de estiagem e em regiões com maior densidade populacional.

Neste contexto, podemos entender que o Brasil se encontra em um nível inferior com relação aos países europeus e os EUA no que se refere ao controle destes compostos. Essa dissertação mostrou que as concentrações dos compostos estudados encontrados nas águas superficiais da RMC são semelhantes às aquelas presentes em efluentes de ETE destes países, reflexo da precariedade em que se encontra sistema de saneamento básico no país.

Os dados aqui apresentados podem servir como base norteadora para a elaboração de uma legislação que contemple a presença desses novos compostos no meio aquático, muito embora estudos adicionais ainda sejam necessários a fim de que se conheçam os riscos referentes à exposição crônica causados por eles, principalmente ao ser humano.

Como perspectivas a novos trabalhos, sugere-se um estudo mais abrangente da presença, principalmente destas substâncias em outros corpos d'água, como águas subterrâneas, por exemplo, uma vez que muitos municípios no Estado de São Paulo e outras regiões do Brasil utilizam essa fonte para abastecimento público. Também seria interessante um estudo que avaliasse a eficiência das estações de tratamento de água e esgoto com relação à remoção destes compostos, bem como o desenvolvimento ou a aplicação de métodos de tratamento complementares que promovam a degradação completa desses contaminantes.

A avaliação da capacidade de biodegradação das substâncias nas águas naturais brasileiras e a formação de derivados mais ou menos tóxicos que os compostos originais também poderiam ser melhor avaliadas em estudos complementares.

E finalmente, devido à elevada concentração dos compostos estudados, especialmente aqueles com comprovada ação sobre o sistema endócrino, recomenda-se estudos nas águas tratadas desses mananciais a fim de se monitorar os níveis de exposição da população abastecida.

REFERÊNCIAS

- AGRITEMPO; Sistema de Monitoramento Agrometeorológico, [http://www.agritempo.gov.br/agroclima/pesquisaWeb?uf=SP]; 2007.
- Ahel M., Giger W., Koch M.; Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment- I. Occurrence and transformation in sewage treatment.; *Water Res*; 28; 1131-1142; 1994.
- Ahrer W., Scherwenk E., Buchberger W.; Determination of drug residues in water by the combination of LC or capillary electrophoresis with ESI-MS.; *J. Chromatogr. A*; 910; 69-78; 2001.
- ANVISA; Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução - RE nº 475, de 19 de março de 2002.
- ANVISA; Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003.
- Belfroid A.C., Van der Horst A., Vethaak A.D., Schafer A.J., Rijs G.B.J., Wegener J., Cofino W.P.; Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands.; *Sci. Total Environ.*; 225; 101-108; 1999.
- Bila D. M., Dezotti M.; Fármacos no meio ambiente.; *Quím. Nova*; 26; 523-530; 2003.
- Birkett J. W., Lester J. N.; Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes; ISBN 1-56670-601-7; disponível em [www.crcpress.com]; 2003.
- BKH Consulting Engineers; Chemical study on Bisphenol A, Ministerie van Verkeer en Waterstaat, Directoraat-Generaal Rijkswaterstaat, Rijksinstituut voor Kust en Zee/RIKZ, The Neatherlands; 2005.
- Bound J. P., Voulvoulis N.; Predicted and measured concentrations for selected pharmaceuticals in UK rivers: implications for risk assessment.; *Water Res.*; 40; 2885-2892; 2006.
- Braga O., Smythe G.A., Schafer A.I., Feitz A.J.; Fate of steroid estrogens in Australian inland and coastal wasterwater treatment plants.; *Environ. Sci. Technol.*; 35; 3351-3358; 2005.
- Buerge I.J., Poiger T., Muller M.D., Buser H.R.; Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters.; *Environ. Sci. Technol.*; 37; 691-700; 2003.
- Buser H-R., Poiger T., Müller M. D.; Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater; *Environ. Sci. Technol.*; 33; 2529-2535, 1999.

- Carballa M., Omil F., Lema J.M.; Removal of cosmetic ingredients and pharmaceuticals in sewage primary treatment.; *Water Res.*; 39; 4790-4796; 2005.
- Cargouet M., Perdiz D., Mouatassim-Souali A., Tamisier-Karolak S., Levi Y.; Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France); *Sci. Total Environ.*; 324; 55-66; 2004.
- CETESB; *Relatório de Qualidade das Águas Interiores no Estado de São Paulo 2006*. Série Relatórios, São Paulo, 2007.
- Chen P., Pavelic P., Dillon P., Naidu R.; Determination of caffeine as a tracer of sewage effluent in natural waters by SPE-LC-DAD.; *Water Res.*, 36; 4830-4838; 2002.
- Cheng C.Y., Wu C.Y., Wang W.H., Ding W.H.; Determination and distribution characteristics of degradation products of nonylphenol polyethoxylates in the rivers of Taiwan.; *Chemosphere*; 65; 2275- 2281; 2006.
- Cunningham A.R., Klopman G., Rosenkranz H.S.; A dichotomy in the lipophilicity of natural estrogens, xenoestrogens, and phytoestrogens.; *Environ. Health Perspect.*; 105; 665–668; 1997.
- Damstra T., Barlow S., Bergman A., Kavlock R., van Der Kraak G.; Global Assessment Of The State-Of-The-Science Of Endocrine Disruptors; International Programme On Chemical Safety; *WHO*; Geneva; 515p, 2002.
- Daughton C.G.; Environmental stewardship and drugs as pollutants.; *Lancet*; 360; 1035-1036; 2002.
- De Moura A. F.; A inovação tecnológica e o avanço científico: A química em perspectiva; *Quim. Nova*; 23; 851-853; 2000.
- Desbrow C., Routledge E.J., Brighty G.C., Sumpter J.P.; Identification of estrogenic chemicals in STW effluente. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening.; *Environ. Sci. Technol.*; 32; 1549-1558; 1998.
- Dodds E. C., Lawson W.; Nature 137; 996. Syntetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus; 1936.
- Dorabawila N., Gupta G.; Endocrine disrupter-estradiol in Chesapeake Bay tributaries.; *J. Hazard. Mater.A*; 114; 1276-1282; 2005.
- European Union Council; Decision nº 2455/2001/EC establishing the list of priority substances in the field of water policy amending Directive 2000/60/EC *Off. J. Eur. Commun.* L 331 1; 2001.
- Farabee M. J.; The endocrine system.; disponível em [www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/biobk/BioBookENDOCR.html]; 2001.

- Fatoki, O. S., Noma, A.; SPE method for selective determination of phthalate esters in the aquatic environment.; *Water, Air, Soil Pollut.*, 140, 85-98; 2002.
- Fromme H., Kuchler T., Otto T., Pilz K., Muller J., Wenzel A.; Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment.; *Water Res.*; 36; 1429-1438; 2002.
- Gardinali P.R., Zhao X.; Trace determination of caffeine in surface water samples by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (LC-APCI-MS).; *Environ. Int.*; 28; 521-528; 2002.
- GARP; Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas; *Manual de resíduos de pesticidas em alimentos*; 1999.
- Ghiselli G.; Avaliação das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP). *Tese de Doutorado*; 2006.
- Glassmeyer S.T., Furlong E.T., Kolpin D.W., Cahill J.D., Zaugg S.D., Werner S.L., Meyer M.T., Kryak D.D.; Transport of Chemical and Microbial Compounds from Known Wastewater Discharges: Potential for Use as Indicators of Human Fecal Contamination; *Environ. Sci. Technol.*; 39; 5157-5169; 2005.
- Gutendorf B., Westendorf J.; Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens; *Toxicol.*; 166; 79-89; 2001.
- Heberer T.; Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water; *J. Hydrol.*; 266; 175- 189; 2002.
- Heisterkamp I., Ganrass J., Ruck W.; Biossay-directed chemical analysis utilizing LC-MS: a tool for identifying estrogenic compounds in water samples; *Anal. Bional. Chem.*; 378; 709-715; 2004.
- Hilton M. J., Thomas K. V.; Determination of selected human pharmaceuticals compounds in effluent and surface water samples by HPLC-ESI-MS.; *J. Chromatogr. A*; 1015; 129-141; 2003.
- Hirsch R., Ternes T., Haberer K., Kratz K.L.; Occurrence of antibiotics in the aquatic environment.; *Sci. Total Environ.*; 225; 109-118; 1999.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Senso 2006.
- IBGE; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; Departamento de População e Indicadores Sociais, Rio de Janeiro; *Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2000*; 2002.
- IPCS; International Programme on Chemical Safety, International Chemical Safety Cards [<http://www.who.int/ipcs/publications/icsc/en/>] 2006.

- INMETRO; Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*; DOQ-CGCRE-008, março de 2003.
- Jardim W. F., Montagner C. C., Locatelli M. A. F., Sodré F. F.; Interferentes endócrinos no ambiente ; *Caderno Temático 05*; disponível em [<http://lqa.iqm.unicamp.br>]; 2007.
- Jiang J. Q., Yin Q., Zhou J. L., Pearce P.; Occurrence and treatment trials of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in wastewaters; *Chemosphere*; 61; 544- 550; 2005.
- Johansen B. E.; *The Dirty Dozen*; Praeger/Greenwood; London, 312p; 2003.
- Johnson A. C., Belfroid A., Di Corcia A. ; Estimating steroid oestrogen input into activated sludge treatment works and observation on their removal from the effluent.; *Sci. Total Environ.*; 256; 163- 173; 2000.
- Jones O. A. H., Voulvoulis N., Lester J. N. ; Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals; *Water Res.*; 36; 5013-5022; 2002.
- Kolpin D. W., Furlong E. T., Meyer M. T., Thurman E. M., Zaugg S. D., Barber L. B., Buxton H. T.; Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance; *Environ. Sci. Technol.*; 36, 1202-1211; 2002.
- Kolodziej *et al.*, 2004; Kolodziej E. P., Harter T., Sedlak D. L.; Dairy wastewater, aquaculture, and spawning fish as sources of steroid hormones in the aquatic environment.; *Environ. Sci. Technol.*; 38; 6377- 6384; 2004.
- Kuch H. M., Ballschmiter K.; Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range; *Environ. Sci. Technol.*; 35; 3201-3206; 2001.
- Lamartiniere C. A., Moore J. B., Brown N. M., Thompson R., Hardin M. J.; Barnes S.; Genistein suppresses mammary cancer in rats.; *Carcinogenesis*; 16; 2833-2840; 1995.
- Lark S. M.; *The estrogen decision self help book*; Celestial Arts; New York; 320p; 1999.
- Lintelmann J., Katayama A., Kurihara N.; Endocrine disruptors in the environment.; *Pure Appl.Chem.*; 75; 631-681; 2003.
- López de Alda M. J., Barceló, D.; Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by LC-DAD-MS.; *J. Chromatogr. A*; 892; 391-406; 2000.
- López de Alda M. J., Barceló D.; Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line SPE-LC-DAD.; *J. Chromatogr. A*; 911; 203-210; 2001.

- López de Alda M. J., Barceló D.; Use of SPE in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water.; *J. Chromatogr. A*; 938; 145-153; 2001.
- López de Alda M. J., Barceló D.; López de Alda M. J., Barceló D. J.; Review of analytical methods for the determination of estrogens and progestogens in waste waters.; *Fresenius J. Anal. Chem.*; 371; 437-447; 2001.
- López de Alda M. J., Cruz S. D., Petrovic, M., Barceló, D.; LC-(tandem) MS of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the water environment.; *J. Chromatogr. A*, 1000; 503-526; 2003.
- Maldener G.; *Chromatographia*; n.28; p.85; 1989.
- Marin A., Espada A., Vidal P., Barbas C. ; Major degradation product identified in several pharmaceutical formulations against the common cold.; *Anal.Chem.*; 77; 471-477; 2005.
- Maurício R., Diniz M., Petrovic M., Amaral L., Peres I., Barceló D., Santana F.; A characterization of selected endocrine disruptor compounds in a portuguese wastewater treatment plant; *Environ. Monit. Assess.*; 118; 75-87; 2006.
- MLLEo-da-Silva C. A., Fruchtengarten L.; Riscos químicos ambientais à saúde da criança; *J. Pediatr.*; 81; 205-211; 2005.
- MERCK & Co; *The Merck Index*; 12 ed.; Whitehouse Station; New Jersey; 95p, 1996.
- Mozaz S. R., López de Alda M. J., Barceló D.; Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by SPE-LC-MS.; *J. Chromatogr. A*; 1045; 85-92; 2004.
- Muller S., Schlatter C.; Natural and anthropogenic environmental oestrogens:the scientific basis for risk assessment.; *Pure Appl.Chem.*; 70; 1847- 1853; 1998.
- Murrill W. B., Brown N. M., Zhang J.-X., Manzolillo P. A., Barnes S., Lamartiniere C. A.; Prepubertal genistein exposure suppresses mammary cancer and enhances gland differentiation in rats.; *Carcinogenesis*; 17; 1451-1457; 1996.
- Nassif M. C., Cimarosti H. I., Zamin L. L., Salbego C. G.; Estrógeno versus isquemia cerebral: hormônio feminino como agente neuroprodutor.; *Infarma*; 17; 57-65; 2005.
- NLM; National Library of Medicine; disponível em [<http://www.nlm.nih.gov/mesh/2006/MBrowser.html>] 2006.
- Oliver R., May E., Williams J.; The occurrence and removal of phthalates in a trickle filter STW.; *Water Res.*; 39; 4436- 4444; 2005.

- Österlund M. K., Hurd Y.L.; Estrogen receptors in the human forebrain and relation to neuropsychiatric disorders.; *Prog. Neurobiol.*; 64; 251-267; 2001.
- Piocos E. A., de la Cruz A. A.; SPE-HPLC-DAD of chemical indicators of human fecal contamination in water.; *JLC&RTech*; 23; 1281-1291; 2000.
- Rao K. S., Schwetz B. A.; Reproductive toxicity of environmental agents.; *Ann. Rev. Public Health*; 3; 1-27; 1982.
- Ravina M., Campanella L., Kiwi J.; Accelerated mineralization of the drug Diclofenac via Fenton reactions in a concentric photo-reactor.; *Water Res.*; 36; 3553-3560, 2002.
- Roberts P. H., Thomas K. V.; The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment.; *Sci. Total Environ.*; 356; 143-153; 2006.
- Routledge E. J., Sheahan D., Desbrow C., Brighty G. C., Waldock M., Sumpter J. P.; Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach; *Environ. Sci. Technol.*; 32; 1559-1565; 1998.
- RowLLE C., Carpenter D. M., Lamartiniere C. A.; Chemoprevention of breast cancer, proteomic discovery of genistein action in the rat mammary gland; *J. Nutr.*; 135; 2953- 2959; 2005.
- SANASA; Sociedade de Abastecimento e Saneamento S/A
[http://www.sanasa.com.br/noticias/not_con3.asp?par_nrod=288&flag=PC], 2007.
- Serôdio P., Nogueira J. M. F.; Considerations on ultra-trace analysis of phthalates in drinking water.; *Water Res.*; 40; 2572-2585; 2006.
- Setti A. A., Lima J. E. F. W., Chaves A. G. M., Pereira I. C.; Introdução ao Gerenciamento de recursos hídricos.; Agência Nacional de Águas (ANA), Agência nacional de Energia Elétrica (ANEEL) e Organização de Metrologia Mundial (OMM), disponível em [www.ana.gov.br]; 2001.
- Siegener R., Chen R. F.; Caffeine in Boston Harbor seawater; *Mar.Pollut.Bull.*; 44; 383-387; 2002.
- Sonnenschein C., Soto A. M.; An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*; 65; 143-150; 1998.
- Sumpter J. P., Johnson A. C.; Lessons learned from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment.; *Environ. Sci. Technol.*; 39; 4321-4332; 2005.
- Suzuki T., Nakagawa Y., Takano I., Yasuda K.; Environmental fate of bisphenol A and its metabolites in river water and their xenoestrogenc activity.; *Environ. Sci. Technol.*; 38; 2389- 2396; 2004.

- Swan S. H., Liu F., Overstreet J. W., Brazil C., Skakkebaek N. E.; Semen quality of fertile US males in relation to their mothers' beef consumption during pregnancy.; *Hum. Reprod.*; 6p. DOI:10.1093; 2007.
- Tapiero H., Nguyen-Ba G., Tew K. D.; Estrogens and environmental estrogens. *Biomed. Pharmacother.*; 56; 36-44; 2002.
- Ternes T. A.; Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers.; *Water Res.*; 32; 3245-3260; 1998.
- Ternes T. A., Stumpf M., Müller J., Haberer K., Wilken R.-D., Servos M.; Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants: I. Investigations in Germany, Canada and Brazil.; *Sci. Total Environ.*; 225; 91-99; 1999.
- Ternes T. A.; Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples.; *Trends Anal. Chem.*; 20; 419- 434; 2001.
- The Merck index, versão 12:2 [CD ROM] Chapman & Hall, New York; 1997.
- USEPA; National primary drinking water regulations federal register, part 12, 40 CFR, part 141, 395, 1991.
- USEPA; Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis; 120 p; 1997.
- USEPA; *Método 3510C: Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction*, Disponível em <http://www.epa.gov/sw-846/pdfs/3510c.pdf>; 2006.
- USEPA; United States Environmental Protection Agency [http://www.epa.gov/safewater/mcl.html]; 2006.
- USFDA; United States, Food and Drug Administration; Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation, 2000.
- Vethaak A. D., Lahr J., Schrap S. M., Belfroid A. C., Rijs G. B. J., Gerritsen A., de Boer J., Bulder A. S., Grinwis G. C. M., Kuiper R. V., Legler J., Murk T. A. J., Peijnenburg W., Verhaar H. J. M., de Voogt P.; An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands.; *Chemosphere*; 59; 511-524; 2005.
- Von Brandis H. J.; *Anatomia e Fisiologia para profissionais da equipe de saúde*; editora Pedagógica e Universitária LTDA; São Paulo; vol 3; 95-105; 1977.
- Xiao *et al.*, 2001; Xiao X. Y., McCalley D. V., McEvoy J.; Analysis of estrogens in river water and effluents using SPE-GC-APCI-MS-MS of the pentafluorobenzyl derivatives.; *J. Chromatogr. A*; 923; 195- 204; 2001.
- Wang Y., Hu W, Cao Z., Fu X., Zhu T.; Occurrence of endocrine-disrupting compounds in reclaimed water from Tianjin, China.; *Anal. Bional. Chem.*; 383; 857-863; 2005.

- Weigel S., Kuhlmann J., Huhnerfuss H.; Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea.; *Sci. Total Environ.*; 295 ; 131- 141; 2002.
- Weigel S., Berger U., Jensen E., Kallenborn R., Thoresen H., Huhnerfuss H.; Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites.; *Chemosphere*; 56; 583-592; 2004.
- Wester P. W., Canton J.H.; Histopathological study of *Oryzias latipes* (medaka) after long-term beta-hexachlorocyclohexane exposure.; *Aquatic Toxicol.*; 9; 21-45; 1986.
- World Health Organization; Chemical aspects, guidelines for drinking water quality; *World Health Organization*, cap. 8, 3^o ed. Geneva, 2003.
- Yoon Y., Westerhoff P., Snyder S. A., Esparza M.; HPLC-fluorescence detection and adsorption of bisphenol A, 17 β -estradiol, and 17 α -ethynylestradiol on powdered activated carbon.; *Water Res.*; 37; 3530-3537; 2003.