

LAUDICÉIA GIACOMETTI LOPES

ESTUDO SOBRE A OCORRÊNCIA DE ESTROGÊNIOS EM ÁGUAS NATURAIS E  
TRATADAS DA REGIÃO DE JABOTICABAL - SP

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

Orientadora: Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi

ARARAQUARA  
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

L864e      Lopes, Laudicéia Giacometti  
            Estudo sobre a ocorrência de estrógenos em águas naturais e tratadas da  
            região de Jaboticabal - SP / Laudicéia Giacometti Lopes. -- Araraquara : [s.n],  
            2007  
            121 f. il.

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

            1. Química ambiental. 2. Bacias hidrográficas. 3. Água potável - Análise.  
            4. Perturbadores endócrinos. 5. Tratamento de água – Jaboticabal (SP).  
            I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de  
Araraquara

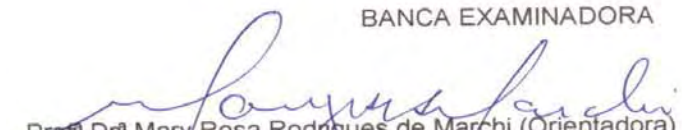
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

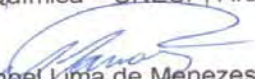
LAUDICÉIA GIACOMETTI LOPES


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


Araraquara; 18 de janeiro de 2007.

BANCA EXAMINADORA

  
Profª Drª Mary Rosa Rodrigues de Marchi (Orientadora)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

  
Prof. Dr. Manoel Lima de Menezes  
Faculdade de Ciências – UNESP, Bauru

  
Profª Drª Eny Maria Vieira  
Instituto de Química – USP, São Carlos

  
Profª Drª Maria Lucia Arruda de Moura Campos  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto

  
Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

LAUDICÉIA GIACOMETTI LOPES - filha de Maria Cleide Zuquette Giacometti e Adão Sebastião Giacometti, nasceu em Jaboticabal, São Paulo, no dia 27 de fevereiro de 1976. cursou o primeiro grau em Jaboticabal - SP. Em dezembro de 1993, concluiu o curso de Técnico em Alimentos na Escola Técnica Estadual Dr. Adail Nunes da Silva, em Taquaritinga - SP. Em janeiro de 1994, ingressou na USP (Câmpus de Ribeirão Preto) onde obteve o título de bacharel em Química, em dezembro de 1997. Em dezembro de 1999, também pela USP (Câmpus de Ribeirão Preto) concluiu o curso de bacharel em Química com Atribuições Tecnológicas. Em julho de 1998, iniciou o curso de mestrado em Microbiologia, na UNESP, *Campus* de Jaboticabal. Em janeiro de 1999, ingressou por meio de concurso público no Serviço Autônomo de Água e Esgoto de Jaboticabal, junto à Estação de Tratamento de Água. Em 2001, iniciou o curso de especialização em Engenharia do Saneamento Básico pela Universidade Federal de São Carlos. Em 2002, concluiu o curso de mestrado e o curso de especialização. Em 2003, pela UNESP (Câmpus de Araraquara), iniciou o curso de doutorado em Química, concluindo-o em 2007.

## **DEDICATÓRIA**

A meus pais: Adão Sebastião Giacometti e Maria Cleide Zuquette Giacometti.

A minha irmã: Flávia Giacometti Lopes.

Ao meu esposo: Afonso Lopes.

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi, pelos ensinamentos, pela disponibilidade e pela oportunidade concedida.

Ao Eng<sup>o</sup>. Civil Wilson Luís Italiano e Victor Toyoshi Nozaki, Presidentes do SAAEJ na gestão 2001-2004, e à Prefeita Municipal de Jaboticabal, Maria Carlota Niero Rocha, gestão 2001-2004, pelo apoio.

Ao Sr. Ricardo Bellodi Bueno, Presidente do SAAEJ na gestão 2005-2008, e ao Prefeito Municipal de Jaboticabal, José Carlos Hori, gestão 2005-2008, pelo apoio.

À FAPESP, pelo apoio ao projeto de políticas públicas no qual este trabalho está inserido, e ao Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral, coordenador do projeto de políticas públicas e grande incentivador.

Ao Prof. Dr. Clóvis Augusto Ribeiro, pela oportunidade concedida por meio da minha orientação no início do curso.

Aos colegas de trabalho na ETA do SAAEJ, em especial ao Pelão, pelo incentivo, e ao Pingüim, pelo apoio nas coletas. Ao Engenheiro Lourenço (Prefeitura Municipal de Jaboticabal), pelo apoio na confecção de mapas.

A todas as amigas do GRESCO, em especial à Carolina, Ana Paula e Karina.

A todos os amigos do GRESCO, em especial ao João Batista e José Antônio, que multiplicaram meus esforços no trabalho desenvolvido.

À Profa. Dra. Raquel Fernandes Pupo Nogueira, pela permissão da utilização do equipamento de análise de Carbono Orgânico Dissolvido.

À Profa. Dra. Maria Lúcia Ribeiro, pela utilização do HPLC/UV, e ao Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli, do Departamento de Bioquímica, do Instituto de Química da UNESP, pela utilização do espectrofotômetro de fluorescência.

Aos meus pais, Adão Sebastião Giacometti e Maria Cleide Zuquette Giacometti, por tudo que fizeram para o meu crescimento científico e pelo exemplo do gosto pelo conhecimento; a minha irmã, Flávia Giacometti, minha incentivadora.

Ao meu esposo Afonso Lopes, pela compreensão e exemplo a ser seguido.

A Deus, por todas as bênçãos recebidas ao longo da vida, principalmente durante o período de desenvolvimento deste trabalho.

### ***O Tejo é mais Belo***

O Tejo é mais belo que o rio que corre pela minha aldeia,  
Mas o Tejo não é mais belo que o rio que corre pela minha aldeia  
Porque o Tejo não é o rio que corre pela minha aldeia.

O Tejo tem grandes navios  
E navega nele ainda,  
Para aqueles que vêm em tudo o que lá não está,  
A memória das naus.

O Tejo desce da Espanha  
E o Tejo entra no mar em Portugal.

Toda a gente sabe isso.  
Mas poucos sabem qual é o rio da minha aldeia  
E para onde ele vai  
E donde ele vem.  
E por isso porque pertence a menos gente,  
É mais livre e maior o rio da minha aldeia.

Pelo Tejo vai-se para o Mundo  
Para além do Tejo há a América  
E a fortuna daqueles que a encontram  
Ninguém nunca pensou no que há para além  
Do rio da minha aldeia.

O rio da minha aldeia não faz pensar em nada.  
Quem está ao pé dele está só ao pé dele.

Alberto Caeiro

## RESUMO

Os hormônios estrogênicos naturais  $17\beta$  estradiol e estrona estão presentes nos efluentes domésticos e na excreta de animais e, após atingirem os corpos d'água superficiais, podem alcançar a água de abastecimento público se persistirem ao processo de tratamento. Diante disso, este trabalho teve como objetivo validar um método para análise de  $17\beta$  estradiol e estrona em água e aplicar o mesmo para estudo do sistema de abastecimento público de Jaboticabal - SP. O método validado inclui a análise por cromatografia líquida com detector de fluorescência, com eluição isocrática Água/Acetonitrila (1:1), volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$  e coluna  $\text{C}_{18}$  PAH (250 mm de comprimento, 4,6 mm d.i., partículas 5  $\mu\text{m}$ ), sendo a detecção feita a 230 nm (excitação) e 306 nm (emissão). O preparo da amostra, também otimizado, inclui a extração em fase sólida com cartuchos contendo 500 mg de  $\text{C}_{18}$ , pré-condicionados com Hexano/Acetona/Metanol/Água pH 3 e eluição dos analitos de interesse com acetona. Sob essas condições otimizadas, o limite de quantificação para a estrona foi de 0,6  $\mu\text{g L}^{-1}$  e para o  $17\beta$  estradiol 7,5  $\text{ng L}^{-1}$ , para água superficial e potável antes da cloração. Para o estudo do sistema de abastecimento de Jaboticabal, foram coletadas amostras na nascente do Córrego Rico, no município de Monte Alto (CR1); no córrego, após recebimento de afluentes que passam pela área urbana de Monte Alto (CR2); na captação de água para abastecimento público do município de Jaboticabal (CR3), e na saída da estação de tratamento de água de Jaboticabal (PT4). Os resultados referentes à validação do método mostraram níveis aceitáveis para a recuperação (entre 83 e 128%) e para o coeficiente de variação (entre 3 e 24%), o que atesta a exatidão e a precisão do mesmo para os níveis de concentração estudados, para todas as matrizes: água superficial e potável antes da cloração. Os resultados do estudo do sistema de abastecimento mostraram a presença de estrogênio em 22% das amostras em concentração de 6,9  $\text{ng L}^{-1}$  (água potável) a 30,6  $\text{ng L}^{-1}$  (nascente) para  $17\beta$  estradiol, e de 0,6  $\mu\text{g L}^{-1}$  para estrona (córrego). O ponto CR1 foi afetado provavelmente por resíduos animais e o ponto CR2 por resíduos animais e por lançamento de efluentes da estação de tratamento de esgoto de Monte Alto. O ponto CR3 pode ter sido influenciado por lançamentos de esgotos domésticos não-tratados de propriedades rurais. Conclui-se que, com exceção da água potável, as demais amostras estudadas apresentam hormônios em níveis possíveis de exercer efeito biológico.

**Palavras-chave:**  $17\beta$  estradiol; estrona; bacia hidrográfica



## ABSTRACT

The natural estrogenic hormones 17  $\beta$  estradiol and estrone are present in domestic effluents and animal excreta, and after arrive at superficial water bodies, they can reach public water supply if remains to the treatment process. Based in that, this work had as aim to acknowledge a method to analyze 17  $\beta$  estradiol and estrone in water and apply it to study the system of public water supply from Jaboticabal (State of Sao Paulo – Brazil). The acknowledged method includes analysis by liquid chromatography with fluorescence detector, using elution isocratic water/acetonitrile (1:1), injection volume of 20  $\mu$ L and column C<sub>18</sub> PAH (250 mm of length, 4,6 mm d.i., particles of 5  $\mu$ m). The detection was made at 230 nm (excitation) and at 306 nm (emission). The preparation of the sample was optimized, and includes the extraction of the solid phase with cartridge containing 500 mg de C<sub>18</sub>, preconditioned with hexane/acetone/methanol/water pH 3 and elution of interest analytics with acetone. Under such optimized conditions, the limit of quantification to estrone was 0,6  $\mu$ g L<sup>-1</sup> and to 17  $\beta$  estradiol was 7,5 ng L<sup>-1</sup> in the superficial water and potable water before cloration. To the study of the system of water supply from Jaboticabal, samples were collected from the riverhead of Córrego Rico, Monte Alto municipality (CR1), in the stream after receiving effluent from the urban area of Monte Alto (CR2), at the captation of the public water supply from Jaboticabal municipality (CR3) and at the discharge of the water treatment station from Jaboticabal (PT4). The results about the acknowledgment of the method have shown acceptable levels to recuperation (between 83 and 128%) and to the variation rate (between 3 and 24%), what certifies its occurrence and precision to the studied concentration levels to both matrixes: superficial water and potable water before cloration. The results of the system of water supply have shown the presence of estrogens in 22% of the samples in concentration of 6,9 ng L<sup>-1</sup> (potable water) to 30,6 ng L<sup>-1</sup>(riverhead) for 17  $\beta$  estradiol and 0,6  $\mu$ g L<sup>-1</sup> of estrone (stream). The point CR1 was probably affected by animal wastes and the point CR2 by animal wastes and by the discharge from waste water treatment station from Monte Alto. The point CR3 maybe affected by discharges of domestic effluent without treatment from rural proprieties. The conclusion is that, except the potable water, the other studied samples have shown levels of hormones that could bring biological effects.

**Keywords:** 17  $\beta$  estradiol; estrone; watershed

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1 - Rota de exposição de hormônios estrogênicos no ambiente. Adaptado de Halling-Sorensen et al. (1988).....	24
Figura 2 - Estrutura dos principais estrogênios. Fonte: Ying & Kookana (2002).....	31
Figura 3 - Ilustração esquemática do modelo de ligação do 17 $\beta$ estradiol (E2) com o receptor estrogênico humano. Fonte: Okho et al., (2002). His = histidina; Glu = glicina; Arg = arginina.....	31
Figura 4 - Reação do grupo silanol com silano para preparação de fase ligada utilizada em cromatografia líquido-líquido. Fonte: Sewell & Clarke (1987).....	34
Figura 5 - Características de um cromatógrafo com fase líquida. Fonte: Mendham et al. (2002) .....	35
Figura 6 - Espectrofotômetro de fluorescência convencional. Fonte: adaptado de Shelly & Warner (1983) .....	36
Figura 7 - Etapas do condicionamento de sílica ligada a octadecil. A - sem condicionamento. B - parcialmente condicionado. C - totalmente condicionado. Fonte: Pesek & Matyska (2000) .....	38
Figura 8 - Etapas da extração em fase sólida: condicionamento (A), passagem da amostra (B), lavagem do cartucho (C) e eluição (D). Fonte: Mendham et al. (2002) .....	38
Figura 9 - Percentagem média de remoção de hormônios durante a passagem por filtro biológico e lodo ativado em ETE brasileira. Adaptado de Ternes et al. (1999).....	49
Figura 10 - Tecnologia de tratamento completo de água destinada ao consumo humano (Di Bernardo, 1993).....	50

Figura 11 - Representação esquemática de uma partícula de argila. Fonte: Olphen (1977), citado por Di Bernardo (1993).....	52
Figura 12 - Esquema da coagulação de partículas coloidais nos mecanismos de neutralização de carga (turbidez alta) e varredura (turbidez baixa). Fonte: Amirtharajah & Mills (1982), citado por Di Bernardo (1993) .....	52
Figura 13 - Esquema do método validado e utilizado para análise de 17 $\beta$ estradiol e estrona em águas naturais e tratadas .....	64
Figura 14 - Arranjo experimental utilizado para extração em fase sólida .....	65
Figura 15 - Esquema da investigação realizada sobre a validação de análise de hormônios em água potável .....	66
Figura 16 - Bacia Hidrográfica do Rio Mogi Guaçu. Fonte: Jaboticabal (2006).....	68
Figura 17 - Região Administrativa de Ribeirão Preto. Fonte: Jaboticabal (2006).....	69
Figura 18 - Vazão do Córrego Rico no período de maio/2002 a fevereiro/2003, no ponto de captação de água de abastecimento. Fonte: Lopes et al. (2003).....	70
Figura 19 - Localização das principais fontes de lançamento de esgoto entre os pontos de coleta CR1 e CR2, no município de Monte Alto - SP. Fonte: Google Earth (2006)a .....	71
Figura 20 - Localização da suinocultura e do tratamento dos resíduos gerados lançados em afluente do Córrego Rico a montante do ponto de coleta CR2. Fonte: Google Earth (2006)b.....	71

Figura 21 - Pontos de coleta na Sub-Bacia Hidrográfica do Córrego Rico. Fonte: Amaral (2005). Elaborado com fotos cedidas pela CATI, Secretaria Estadual da Agricultura .....	73
Figura 22 - Nascente do Córrego Rico utilizada para coleta (CR1).....	74
Figura 23 - Conjunto de filtração e resultado da análise da contagem de coliformes fecais no ponto de coleta CR3.....	75
Figura 24 - Etapas do tratamento de água da ETA de Jaboticabal - SP .....	76
Figura 25 - Espectro de UV da Estrona (solvente: acetonitrila).....	77
Figura 26 - Espectro de UV do 17 $\beta$ estradiol (solvente: acetonitrila).....	77
Figura 27 - Espectro de emissão de fluorescência após excitação em 229 nm (em que: estrona, linha vermelha; 17 $\beta$ estradiol, linha azul; solvente - acetonitrila, linha mostarda) .....	79
Figura 28 - Espectro de excitação com emissão de fluorescência em 305 nm (em que: 17 $\beta$ estradiol, linha vermelha; estrona, linha rosa; solvente - acetonitrila, linha verde) .....	79
Figura 29 - Espectro de fluorescência 3 D de emissão e excitação do 17 $\beta$ estradiol (solvente: acetonitrila) .....	80
Figura 30 - Espectro de fluorescência 3 D de emissão e excitação da estrona (solvente: acetonitrila) .....	80
Figura 31 - Cromatograma dos hormônios estrogênicos com comprimento de excitação de 280 nm (A) e 230 nm (B). Condições: coluna C <sub>18</sub> PAH (250 mm de comprimento, 4,6 mm d.i., partículas 5 $\mu$ m), volume de injeção de 20 $\mu$ L, fluxo de 1,0 mL min <sup>-1</sup> , eluição isocrática H <sub>2</sub> O/ACN 1:1. Concentração: estrona, 1,0 mg L <sup>-1</sup> , 17 $\beta$ estradiol, 12,5 $\mu$ g L <sup>-1</sup> .....	81

- Figura 32 - Cromatograma referente aos padrões de 17  $\beta$  estradiol e estrona (A) e o branco da extração em fase sólida (B). Condições: coluna C<sub>18</sub> PAH (250 mm de comprimento, 4,6 mm d.i., partículas 5  $\mu$ m), volume de injeção de 20  $\mu$ L, fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, eluição isocrática H<sub>2</sub>O/ACN 1:1. Concentração: estrona, 1,0 mg L<sup>-1</sup>, 17  $\beta$  estradiol, 12,5  $\mu$ g L<sup>-1</sup> ..... 84
- Figura 33 - Cromatogramas referentes ao ensaio de recuperação de água superficial; amostra testemunha não-fortificada (A) e amostra fortificada (B). Condições: coluna C<sub>18</sub> PAH (250 mm de comprimento, 4,6 mm d.i., partículas 5  $\mu$ m), volume de injeção de 20  $\mu$ L, fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, eluição isocrática H<sub>2</sub>O/ACN 1:1. Concentração: estrona, 1,5  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, 17  $\beta$  estradiol, 30 ng L<sup>-1</sup> ..... 85
- Figura 34 - Cromatogramas referentes ao estudo de recuperação no nível médio para água potável (A) e água superficial (B). Condições: coluna C<sub>18</sub> PAH (250 mm de comprimento, 4,6 mm d.i., partículas 5  $\mu$ m), volume de injeção de 20  $\mu$ L, fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, eluição isocrática H<sub>2</sub>O/ACN 1:1. Concentração: estrona, 1,5  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, 17  $\beta$  estradiol, 30 ng L<sup>-1</sup> ..... 86
- Figura 35 - Extração sem *aging* de amostra de água filtrada fortificada da ETA de Jaboticabal - SP, sem cloro (B) e com 1,4 mg L<sup>-1</sup> de cloro residual livre (A). Condições: coluna C<sub>18</sub> PAH (250 mm de comprimento, 4,6 mm d.i., partículas 5  $\mu$ m), volume de injeção de 20  $\mu$ L, fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, eluição isocrática H<sub>2</sub>O/ACN 1:1. Concentração: estrona, 0,6  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, 17  $\beta$  estradiol, 7,5 ng L<sup>-1</sup> ..... 88

<p>Figura 36 - Extração com <i>aging</i> de amostra de água filtrada fortificada da ETA de Jaboticabal - SP, sem cloro (B) e com 1,4 mg L<sup>-1</sup> de cloro residual livre (A). Condições: coluna C<sub>18</sub> PAH (250 mm de comprimento, 4,6 mm d.i., partículas 5 μm), volume de injeção de 20 μL, fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, eluição isocrática H<sub>2</sub>O/ACN 1:1. Concentração: estrona, 0,6 μg L<sup>-1</sup>, 17 β estradiol, 7,5 ng L<sup>-1</sup> .....</p>	88
<p>Figura 37 - Concentrações de nitrato nas amostras de água da nascente (CR1) à captação de água (CR3), no período de outubro/2004 a fevereiro/2005. Fonte: Amaral (2005).....</p>	93

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
Tabela 1 - Concentrações de estrogênios no afluente e no efluente de ETEs, em água superficial e potável de vários países. ....	25
Tabela 2 - Propriedades físicas e químicas de alguns estrogênios.....	32
Tabela 3 - Alguns métodos analíticos utilizados para determinação de hormônios estrogênicos em águas naturais ou tratadas .....	40
Tabela 4 - Efeito de tratamentos para estocagem e a influência na recuperação de quatro estrogênios presentes em água fluvial na concentração de 10 ng L <sup>-1</sup> .....	40
Tabela 5 - Precisão aceitável, expressa como coeficientes de variação, em função do nível de concentração do analito .....	44
Tabela 6 - Recuperação aceitável do analito em função da concentração. ....	45
Tabela 7 - Parâmetros da validação analítica para alguns dos métodos disponíveis na literatura para análise de hormônios estrogênicos em águas naturais .....	47
Tabela 8 - Procedimentos de extração em fase sólida testados com água subterrânea .....	62
Tabela 9 - Níveis de fortificação utilizados para teste de extração em fase sólida com água subterrânea.....	63
Tabela 10 - Localização, com coordenadas do Sistema de Projeção UTM, dos pontos de coleta no Córrego Rico, Jaboticabal - SP.....	72
Tabela 11 - Equações da curva analítica, intervalo de trabalho, coeficientes de correlação e de variação do fator de resposta do sistema cromatográfico HPLC/UV.....	78

Tabela 12 - Equações da curva analítica, intervalo de trabalho e coeficientes de correlação e de variação do fator de resposta do sistema cromatográfico HPLC/FLU.....	82
Tabela 13 - Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) determinados experimentalmente para os hormônios para o sistema cromatográfico HPLC/FLU.....	82
Tabela 14 - Recuperações percentuais para os métodos de extração avaliados com água subterrânea.....	83
Tabela 15 - Recuperações percentuais (intervalo e média), desvio-padrão e coeficiente de variação dos compostos analisados pelo método proposto.....	84
Tabela 16 - Recuperações percentuais (intervalo e média), desvio-padrão e coeficiente de variação dos compostos analisados pelo método proposto para água superficial.....	85
Tabela 17 - Resultados referentes ao ensaio de recuperação de 17 $\beta$ estradiol nas etapas pós-filtração do tratamento de água convencional.....	87
Tabela 18 - Resultados referentes ao ensaio de recuperação de estrona nas etapas pós-filtração do tratamento de água convencional.....	87
Tabela 19 - Recuperações percentuais (intervalo e média), desvio-padrão e coeficiente de variação dos compostos analisados pelo método proposto para água filtrada.....	89
Tabela 20 - Limite de quantificação (LQ) determinado experimentalmente para os hormônios para o método proposto para água superficial e filtrada.....	90



Tabela 21 - Resultados de parâmetros indicadores de qualidade de água e concentração de estrona e 17 $\beta$ estradiol nas coletas efetuadas em 2006 na sub-bacia hidrográfica do Córrego Rico, em Jaboticabal e Monte Alto - SP. Localização dos pontos - Figura 21 .....	92
Tabela 22 - Concentrações de estrogênios obtidas neste estudo para o sistema de abastecimento de Jaboticabal - SP, e em estudos descritos na literatura.....	94
Tabela 23 - Valores máximos permitidos para os parâmetros de qualidade de água analisados em amostras do estudo de caso de Jaboticabal - SP, de acordo com legislação vigente .....	96

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AceOEt - Acetato de etila

ACN - Acetonitrila

Acet - Acetona

C<sub>18</sub> - Sílica gel de fase reversa tipo octadecil silano

CG/MS - Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas

CG/MS/MS - idem a CG/MS

CG/NCI/MS - Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas com ionização química negativa

DCM - Diclorometano

ETA - Estação de tratamento de água

ETE - Estação de tratamento de esgoto

Hex - Hexano

HPLC/FLU - Cromatógrafo líquido acoplado a espectrofotômetro de fluorescência

HPLC/UV - Cromatógrafo líquido acoplado a espectrofotômetro de ultravioleta

MeOH - Metanol

SDB-XC - Copolímero de poliestireno-divinilbenzeno

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>I INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>II REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>22</b>
1 Destinação de estrogênios no ambiente .....	22
2 Efeitos da contaminação ambiental por hormônios estrogênicos.....	27
3 Características físicas e químicas dos estrogênios .....	30
4 Análise de hormônios estrogênicos.....	33
4.1 Técnicas cromatográficas.....	33
4.2 Extração em fase sólida .....	37
4.3 Análise de estrogênios em águas naturais e tratadas.....	39
4.4 Validação de métodos cromatográficos .....	42
5 Os hormônios estrogênicos e o saneamento básico.....	48
5.1 Tratamento de esgoto doméstico .....	48
5.2 Tratamento de água .....	50
<b>III MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>56</b>
1 Materiais, equipamentos, reagentes .....	56
1.1 Materiais.....	56
1.2 Equipamentos .....	57
1.3 Reagentes, solventes e padrões .....	58
2 Lavagem da vidraria.....	58
3 Preparação das soluções-estoque .....	58

	<b>Página</b>
4 Seleção e otimização do sistema cromatográfico .....	59
4.1 Resolução cromatográfica do sistema GC/MS .....	59
4.2 Resolução cromatográfica do sistema HPLC/UV .....	59
4.3 Resolução cromatográfica do sistema HPLC/FLU .....	60
5 Validação do método.....	61
6 Estudo de caso aplicado ao sistema de abastecimento de Jaboticabal - SP	68
6.1 Características da área em estudo.....	68
6.2 Coleta, transporte e análise das amostras .....	72
<b>IV RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>77</b>
1 Seleção e otimização do sistema cromatográfico .....	77
2 Validação do método.....	83
3 Estudo de caso aplicado ao sistema de abastecimento de Jaboticabal - SP	91
<b>V CONCLUSÕES.....</b>	<b>97</b>
<b>VI DIFICULDADES ENCONTRADAS .....</b>	<b>99</b>
<b>VII ESTUDOS FUTUROS .....</b>	<b>100</b>
<b>VIII REFERÊNCIAS .....</b>	<b>101</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>111</b>

## I INTRODUÇÃO

Um dos primeiros estudos correlacionando a presença de estrogênios naturalmente excretados por humanos e efeitos ecotoxicológicos foi realizado na Inglaterra revelando que peixes encontrados à jusante de pontos de lançamento de Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) apresentaram alterações fisiológicas. Nesse caso, os peixes machos apresentam a proteína denominada vitelogenina, normalmente produzida por fêmeas sob a influência do hormônio estrogênico  $17\beta$  estradiol (FENT, 1996).

Muitas substâncias consideradas contaminantes de água atuam diretamente no sistema endócrino. São exemplos dessas, os pesticidas como o metoxicloro e o DDT, e os produtos de decomposição de surfactantes não-iônicos alquilfenóis polietoxilados (como o 4-nonilfenol) (FENT, 1996; FOLMAR et al., 2002; VADJA, 2006).

No Brasil, os pesticidas são legalmente reconhecidos como contaminantes de água desde a década de 1980. Com o advento dessas novas observações relacionadas à exposição de organismos aquáticos ao esgoto, surge interesse a respeito de outras classes de substâncias que começaram também a ser consideradas como contaminantes dos recursos hídricos. Diante da necessidade de relacionar os efeitos tóxicos dos contaminantes clássicos, tais como os pesticidas, frente aos contaminantes reconhecidos mais recentemente, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas para fornecer as respostas.

Estudos baseados na síntese de vitelogenina revelaram que a atividade estrogênica do 4-nonilfenol é máxima quando atinge cerca de  $16\ \mu\text{M}$ . Essa concentração encontra-se de  $10^4$  a  $10^6$  acima da concentração a partir da qual o

17  $\beta$  estradiol manifesta atividade estrogênica (FENT, 1996). Tal informação demonstra a importância dos hormônios estrogênicos como contaminantes ambientais, pois os mesmos estão dispersos no ambiente em concentrações cujo potencial estrogênico pode ser significativo. Com base no exposto, este trabalho teve como objetivos otimizar e validar um método para a determinação de 17  $\beta$  estradiol e estrona em água natural e tratada, assim como avaliar o sistema de abastecimento público de Jaboticabal, considerando o manancial superficial Córrego Rico, em relação à contaminação de água com 17  $\beta$  estradiol e estrona.

## II REVISÃO DE LITERATURA

Hormônios estrogênicos na água apresentam vários aspectos a serem observados; como exemplo, destaca-se a dinâmica ou “balanço” ambiental dessas substâncias. O balanço compreende o entendimento de todas as fontes que podem contribuir com o aporte de hormônios para os compartimentos do ambiente, tais como as águas superficiais, subterrâneas e o solo, e os mecanismos de transporte existentes entre eles. Paralelamente, devem ser também entendidos os mecanismos que colaboram como depuração, reduzindo as concentrações desses nas matrizes citadas.

### 1 Destinação de estrogênios no ambiente

Os hormônios estrogênicos são produzidos naturalmente pelos organismos e/ou sintetizados industrialmente a fim de serem utilizados como reguladores endócrinos e contraceptivos.

Os estrogênios naturais compõem um dos três grupos de hormônios esteróides sexuais, classificados como estrogênicos, androgênicos e progestênicos. Os estrogênicos são produzidos principalmente pelos ovários sob o comando de hormônios proteínóides liberados pela pituitária na corrente sangüínea (FIESER & FIESER, 1959). Segundo os autores, tais substâncias são responsáveis pelo desenvolvimento de características femininas no início da puberdade e pelo aumento das glândulas mamárias durante a gravidez. Além dessas funções, também assumem importante papel na diferenciação sexual e no desenvolvimento de características femininas pré e pós-nascimento. Podem-se citar, como exemplo

desses, o 17  $\beta$  estradiol e a estrona. Nos organismos superiores, a estrona é produzida como um metabólito do 17  $\beta$  estradiol.

Quanto aos estrogênios sintéticos, são exemplos o valerato de estradiol, o estriol, o sulfato de estrona, o etinilestradiol, o mestranol e o dienolestrol (RANG et al., 2001). As aplicações clínicas dos estrogênios variam de acordo com a dose utilizada, e as principais finalidades são, a terapia de reposição hormonal e a contracepção.

Para fins terapêuticos, as substâncias mais utilizadas são a estrona (estrogênios conjugados), o 17  $\beta$  estradiol, o estriol e o etinilestradiol (GENÉRICO INFO, 2004; BULÁRIO, 2004).

Uma vez que esses hormônios são produzidos naturalmente ou consumidos como medicamentos, são eliminados e encaminhados por diferentes rotas ao ambiente. Na Figura 1, ilustra-se uma proposta de rota ambiental que relaciona o processo de ingestão (ou produção) com a excreção de hormônios e a poluição das águas superficiais e potáveis.

Conforme mostrado na Figura 1, primeiramente há produção nos organismos (seres humanos e animais) ou ingestão na forma de medicamentos. Posteriormente, há excreção, na forma conjugada (ligado ao ácido glucurônico ou a sulfato), para a rede coletora de esgotos no caso dos humanos. Em seguida, em alguns casos, o esgoto é lançado *in natura* nos corpos d'água, porém, em outros, o esgoto passa por tratamento em ETEs, e o efluente é lançado no corpo d'água. Para a excreção animal, geralmente o destino é o solo que, por sua vez, atinge o manancial superficial por escoamento, ou subterrâneo por infiltração. Essas fontes fornecem água para o abastecimento público após passagem por tratamento em Estações de Tratamento de Água (ETAs). Dessa forma, as substâncias não-removidas nos



processos de tratamento de esgoto e de água retornam ao início da rota e são consumidas pela população, dando origem a um círculo vicioso.

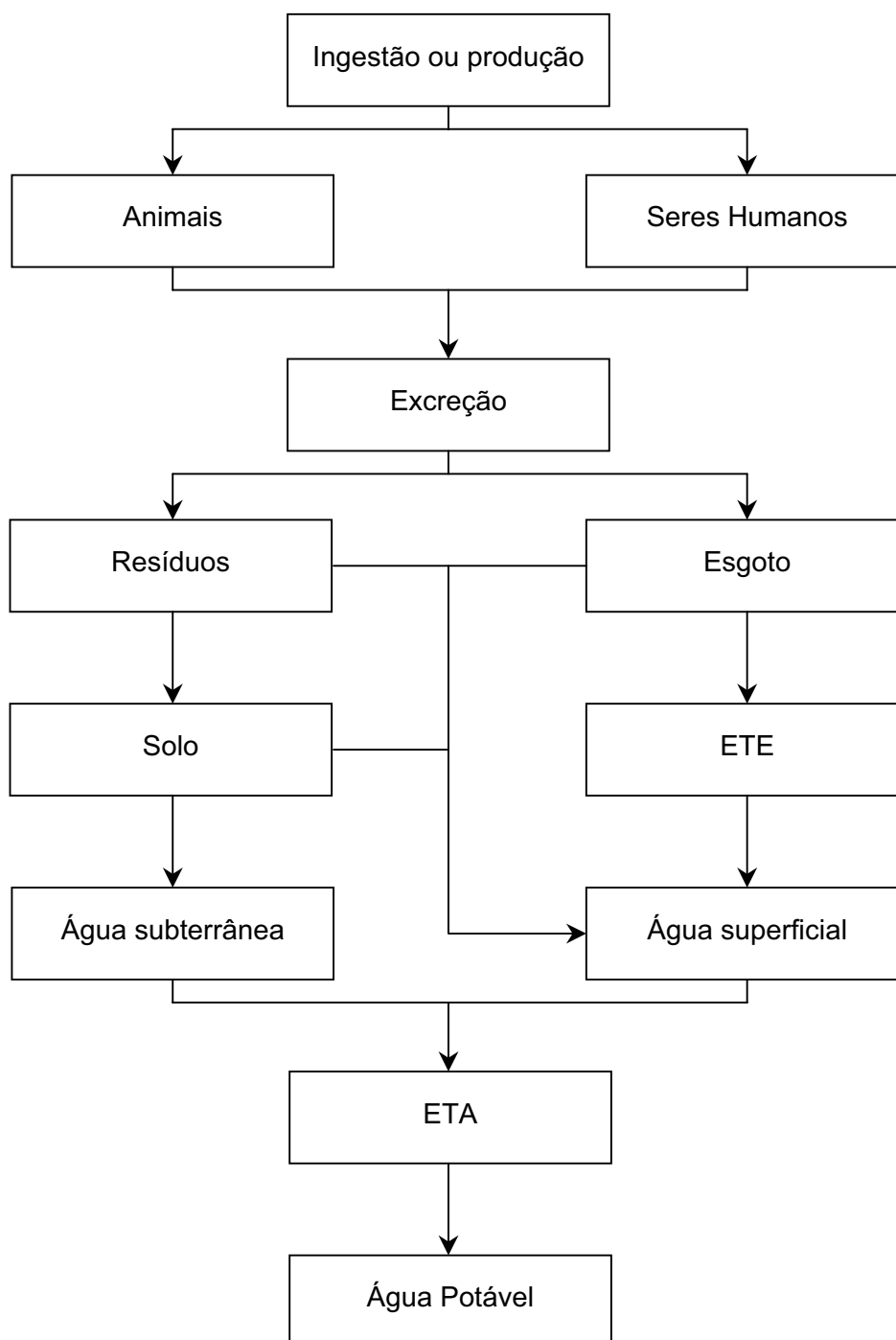


Figura 1 - Rota de exposição de hormônios estrogênicos no ambiente. Adaptado de Halling-Sorensen et al. (1998).

Na Tabela 1, encontram-se os níveis de hormônios reportados por alguns autores para esgoto *in natura* (afluente ETEs), esgoto tratado (efluente de ETEs), água superficial e potável.

Tabela 1 - Concentrações de estrogênios no afluente e no efluente de ETEs, em água superficial e potável de vários países.

Origem	Estrogênios (ng L <sup>-1</sup> )				Fonte
	17 $\beta$ Estradiol	Estrona	Estriol	Etinilestradiol	
<i>Afluente ETE</i>					
Canadá	15	41	250		Lee & Peart (1998)
Itália	12	52	80	3,0	Baronti et al. (2000)
Brasil (Rio de Janeiro, ETE Penha)	21	40			Ternes et al. (1999)
Alemanha	15	27			Ternes et al. (1999)
Brasil (Campinas)	6.700	4.800			Ghiselli (2006)
Brasil (Araraquara)	31				Araújo (2006)
<i>Efluente ETE</i>					
Canadá	< 5	14	30		Lee & Peart (1998)
Canadá	6	3		9	Ternes et al. (1999)
Itália	1,0	9,3		0,45	Baronti et al. (2000)
Brasil (Rio de Janeiro, ETE Penha)	< 1	7			Ternes et al. (1999)
Holanda	0,9	4,5		< LD <sup>a</sup>	Belfroid et al. (1999)
Alemanha	< 1	9		1	Ternes et al. (1999)
Inglaterra	10	76		4,3	Desbrow et al. (1998)
Brasil (Campinas)	5.600	4.100			Ghiselli (2006)
<i>Água superficial</i>					
Alemanha	3,6	4,1		5,1	Kuch & Ballschmiter (2001)
Holanda		0,3			Belfroid et al. (1999)
Inglaterra				2 a 15	Aherne & Briggs (1989)
Brasil (Campinas) <sup>b</sup>	6.000	5.000			Ghiselli (2006)
Espanha	< 2,5	22	< 2,5	< 2,5	Rodriguez-Mozaz et al.(2004)
EUA	< 0,1	< 0,3			Boyd et al. (2003)
Israel			8,8	6,1	Barel-Cohren (2006)
<i>Água potável</i>					
Alemanha	2,1	0,6		0,50	Kuch & Ballschmiter (2001)
Inglaterra				< 1 a 4	Aherne & Briggs (1989)
Brasil (Campinas)	2.600	< 1,059			Ghiselli (2006)
Espanha	< 2,5	< 2,5	< 2,5	< 2,5	Rodriguez-Mozaz et al.(2004)
EUA	< 0,1	< 0,3			Boyd et al. (2003)

<sup>a</sup> LD: 0,3 a 1,8 ng L<sup>-1</sup>.

<sup>b</sup> Captação do rio Atibaia.

De acordo com a Tabela 1, observa-se que, embora tais substâncias presentes no esgoto, na maioria dos estudos, estejam em baixos níveis, as mesmas atingem os mananciais e a água potável em níveis acima de 1 ng L<sup>-1</sup> (etinilestradiol) e de 10 ng L<sup>-1</sup> (estrone e 17  $\beta$  estradiol), doses mínimas a apresentar efeito biológico (BAREL-COHEN et al., 2006).

Paralelamente, destaca-se que a pecuária é bastante significativa no Brasil e não pode ser desconsiderada como fonte de hormônios para o ambiente. O aumento

da população mundial acompanhado pelo aumento da necessidade de produção de alimentos promove crescimento na produção animal, que faz com que a sua contribuição para a contaminação ambiental por estrogênios seja relevante. No nordeste do Arkansas, região com intensiva criação de aves e gado, foram encontradas nascentes de água com 17  $\beta$  estradiol, de 6 a 66 ng L<sup>-1</sup> (PETERSON et al., 2000).

Além das fontes de lançamento de estrogênios para o ambiente, alguns mecanismos contribuem para a redução da concentração dos mesmos à jusante ou nos pontos onde são lançados. Esses mecanismos consistem, principalmente, na biodegradação, na sorção aos sedimentos suspensos e aos sedimentos do leito do corpo d'água, na adsorção ao solo e na fotólise (BAREL-COHEN et al., 2006).

A adsorção ao sedimento do leito do corpo d'água ocorre, preferencialmente, nas primeiras 24 horas de contato, sendo maior para os hormônios com maior coeficiente de partição octanol água ( $K_{ow}$ ) e para as partículas de menor tamanho. Quanto ao sedimento suspenso, o mesmo é responsável pela remoção de menos que 1% dos estrogênios presentes na coluna d'água (HOLTHAUS et al., 2002). Sendo assim, uma vez que a saturação dos sedimentos é atingida, o potencial desse mecanismo para atuar em novos lançamentos torna-se praticamente nulo.

O potencial de adsorção em argilas é bastante insignificante (entre 0 e 5%, para hematita), e é melhorado quando a argila se encontra associada à matéria orgânica (atinge valores máximos próximos a 20%) (SCHÄFER et al., 2003). O aumento da salinidade também promove o aumento da adsorção dos hormônios às partículas de sedimento (LAI et al., 2000), provavelmente pela redução da solubilidade dos hormônios em água.

A biodegradação consiste em mecanismo mais eficiente que a adsorção para a remoção dos hormônios estrogênicos do ambiente. Na avaliação da biodegradabilidade dos estrogênios, foi observado que, em um dia, cerca de 88% do 17  $\beta$  estradiol pode ser biodegradado aerobicamente e, em cinco dias, 50% dele é biodegradado anaerobicamente. No entanto, a biodegradação do 17  $\beta$  estradiol é acompanhada pelo aumento da concentração de estrona e, posteriormente, de outros produtos que também apresentam potencial estrogênico (LEE & LIU, 2002).

A fotólise, com 12 horas de luz/dia e sem redução dos níveis de luz devido à turbidez e à cor aparente da água, contribui para a degradação dos estrogênios. Nesse caso, o 17  $\beta$  estradiol e etinilestradiol apresentam a meia-vida de 10 dias (JÜRGENS et al., 2002). De acordo com os autores, a fotólise é lenta quando comparada à biodegradação, principalmente para o 17  $\beta$  estradiol, e não se deve esperar que seja um mecanismo de remoção eficiente.

## **2 Efeitos da contaminação ambiental por hormônios estrogênicos**

Dados sobre toxicidade aguda (doses altas em curto espaço de tempo) são claros para o dietilestilbestrol que foi utilizado para a manutenção da gravidez em pacientes com histórico de abortos espontâneos entre as décadas de 1940 e 1960. Duas décadas depois, descobriu-se que a exposição neonatal produzia adenocarcinoma vaginal nas filhas adultas (DASTON et al., 1997). Na ocasião dessa descoberta, tanto dietilestilbestrol quanto 17  $\beta$  estradiol e etinilestradiol estimularam alterações semelhantes no aparelho reprodutivo de cobaias (DASTON et al., 1997).

Além disso, o 17  $\beta$  estradiol pode ser transformado em metabólitos, resultando na formação de cateolestrogênios, como o 2- e o 4-hidroxiestradiol e as

formas correspondentes hidroxiladas da estrona. Esses catecóis, principalmente as formas 4-hidroxi, podem causar mutações gênicas. Outros metabólitos, como 2-metoxiestradiol e 2-metoxiestrona, também são mutagênicos (JOOSTEN et al., 2004).

Quanto à exposição crônica (doses baixas em tempo prolongado), há indícios de que homens expostos a compostos estrogênicos podem apresentar redução na fertilidade e desenvolver características secundárias do sexo feminino, como aumento das mamas (ginecomastia). Existem evidências também de que o aumento da incidência de câncer de testículos e de outros males como a infertilidade masculina podem estar relacionados com a ingestão de estrogênios por meio da alimentação ou da água (SHARPE & SKAKKEBAEK, 1993; PETERSON et al., 2000). A exposição prolongada aos estrogênios também tem sido associada com o aumento da incidência de câncer de mama em mulheres (DASTON et al., 1997).

Para peixes, a primeira observação sobre os efeitos causados por compostos estrogênicos foi feita em 1994, na Inglaterra (Purdom et al., 1994, apud DESBROW et al., 1998). Na ocasião, observaram que efluentes de ETEs são estrogênicos para os mesmos. Posteriormente, esses efluentes foram fracionados e testados em bioensaios com levedura. As frações que apresentaram potencial estrogênico foram identificadas por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/MS); 17  $\beta$  estradiol e estrona foram identificados como componentes dessas frações (DESBROW et al., 1998).

Esse fato foi confirmado com a constatação de alta incidência de intersexualidade em peixes (carpa; *Rutilus rutilus*) do Reino Unido em áreas à jusante do lançamento de efluentes de ETEs (JOBILING et al., 1998). Nesses casos, vários machos intersexuais não apresentaram ductos para condução de esperma, o

que prejudica a reprodução dessa espécie, sugerindo que a extinção pode ser consequência ecológica em longo prazo do impacto ambiental que os estrogênios causam.

A redução da fecundidade e as alterações do comportamento sexual também foram observadas em peixes medaka (*Oryzias latipes*) adultos expostos a 17  $\beta$  estradiol (OSHIMA et al., 2003). Em machos de carpas, a exposição no período de diferenciação sexual a concentrações de 0,01 mg L<sup>-1</sup> de 17  $\beta$  estradiol levou ao desenvolvimento de ovidutos, que consistem em características apresentadas por fêmeas (GIMENO et al., 1996).

Para machos de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), ocorreu a indução da síntese de vitelogenina, proteína precursora do núcleo do óvulo e produzida como resposta aos estrogênios circulantes no plasma, na concentração de 10 ng L<sup>-1</sup> de 17  $\beta$  estradiol. A mesma resposta é obtida para doses de estrona duas a cinco vezes superior a essa, indicando que o 17  $\beta$  estradiol possui efeito estrogênico maior que a estrona (ROUTLEDGE et al., 1998). Em outro ensaio, trutas arco-íris expostas a 17  $\beta$  estradiol apresentaram necroses nos rins e no fígado dos animais (HERMAN & KINCAID, 1988).

A importância da água como veículo para contaminação de organismos com estrogênios foi comprovada por meio de experimentos efetuados com peixes. Peixes da espécie *Carassius auratus* foram expostos aos mesmos níveis de 17  $\beta$  estradiol adicionado a água e ao alimento (BJERSELIUS et al., 2001). Os indivíduos expostos pela água apresentaram alterações em aspectos fisiológicos e comportamentais da reprodução, contra nenhuma alteração nos que foram alimentados com ração contendo 17  $\beta$  estradiol.

Diante da sensibilidade dos organismos aquáticos a essas substâncias, restam ainda muitas questões a respeito do comportamento das mesmas na cadeia alimentar. O mecanismo de bioacumulação foi comprovado para ostras (*Crassostrea gigas*). Observou-se que, após 48 horas em contato com o hormônio 17  $\beta$  estradiol dissolvido em água do mar, houve a concentração de 31 vezes no tecido mole do mecanismo de alimentação das ostras (LE CURIEUX-BELFOND et al., 2005).

Existem poucos dados sobre a manifestação de tais efeitos nos organismos presentes nos mananciais brasileiros. Sabe-se que peixes curimatás (*Prochilodus lineatus*) do Rio Mogi Guaçu estão atingindo maturidade sexual em tamanho e idade inferior ao normal. Esse fato também tem sido atribuído aos estrogênios, uma vez que 40% da população humana dos municípios dessa bacia hidrográfica são mulheres em idade reprodutiva e cerca de 80% dessas fazem uso de anticoncepcional (RAMOS, 2002).

Há também poucos dados sobre o impacto da contaminação das águas por estrogênios à flora. Foi encontrado que, nas concentrações entre 0,005 e 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  na água de irrigação, ocorre aumento do crescimento, e entre 50 e 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , concentrações presentes no esgoto, o crescimento vegetativo de alfafa é reduzido quando comparado com o grupo-controle (SHORE et al., 1992).

### **3 Características físicas e químicas dos estrogênios**

As estruturas dos principais estrogênios naturais são mostradas na Figura 2.

Essas substâncias possuem esqueleto comum denominado ciclopentanoperhidrofenantreno e são biossintetizadas a partir do colesterol. Os quatro anéis apresentados pela estrutura comum são denominados pelas letras A, B, C e D, a partir do anel aromático. O anel aromático denominado A é responsável

pela transmissão da informação biológica por meio da realização de ligações de hidrogênio com o receptor estrogênico humano (OKHO et al., 2002), conforme pode ser observado na Figura 3.

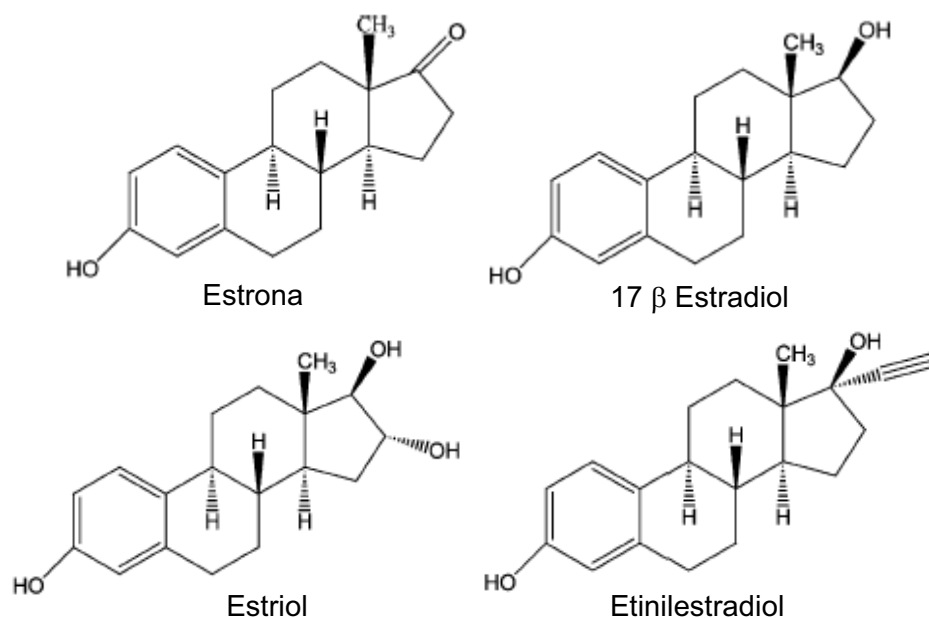


Figura 2 - Estrutura dos principais estrogênios. Fonte: Ying & Kookana (2002).

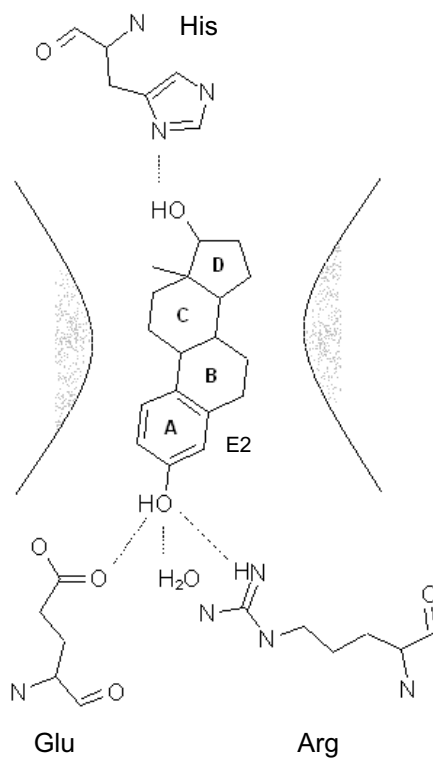


Figura 3 - Ilustração esquemática do modelo de ligação do 17β estradiol (E2) com o receptor estrogênico humano. Fonte: Okho et al. (2002). His = histidina; Glu = glicina; Arg = arginina.



As características físicas e químicas são importantes para as previsões das rotas a serem percorridas pelos hormônios no ambiente. Os altos valores de  $\log K_{ow}$  (Tabela 2) apresentados pelos estrogênios indicam, por exemplo, que a interação com a matéria orgânica do solo é favorecida, tornando a infiltração ou a percolação limitadas. No entanto, os hormônios poderiam chegar aos corpos d'água por escoamento superficial (assoreamento), quando ocorre aplicação de bio-sólido ou excretas de animais no solo (LEE et al., 2003).

Tabela 2 - Propriedades físicas e químicas de alguns estrogênios.

Estrógeno	Solubilidade em água (mg L <sup>-1</sup> a 20 °C)	Pressão de vapor (mm Hg)	$\log K_{ow}$ <sup>a</sup>
Estrona	13	$2,3 \times 10^{-10}$	3,43
17 $\beta$ estradiol	13	$2,3 \times 10^{-10}$	3,94
Estriol	13	$6,7 \times 10^{-15}$	2,81
Etinilestradiol	4,8	$4,5 \times 10^{-11}$	4,15
Mestranol	0,3	$7,5 \times 10^{-10}$	4,67

<sup>a</sup> Coeficiente de partição octanol-água. Fonte: LAI et al. (2000).

Quanto à solubilidade (Tabela 2), pode-se observar que a mesma é muito alta quando comparada à concentração mínima capaz de causar efeito biológico em organismos aquáticos (10 ng L<sup>-1</sup>, BAREL-COHEN et al., 2006).

O conhecimento das características físicas e químicas dos estrogênios também facilita o planejamento de métodos para a determinação de estrogênios em matrizes ambientais. Neste caso, as baixas pressões de vapor apontam para a dificuldade da análise por cromatografia gasosa diretamente, uma vez que as substâncias são pouco voláteis, a qual tem sido superada pela utilização de cromatografia líquida ou derivação para análise por cromatografia gasosa.

## 4 Análise de hormônios estrogênicos

### 4.1 Técnicas cromatográficas

Cromatografia (escrita colorida, do grego) é uma técnica de separação pela qual os componentes de uma mistura podem ser separados da amostra (analitos) ao serem transportados através de um material empacotado (a fase estacionária) por um fluido móvel (SEWELL & CLARKE, 1987). Se o fluido móvel, também chamada fase móvel, é um gás, a técnica é conhecida como cromatografia gasosa; se for líquida, é chamada cromatografia líquida.

O termo “cromatografia líquida” tem sido usado para descrever vários sistemas cromatográficos que empregam líquido como fase móvel. Os principais tipos, de acordo com Mendham et al. (2002), são os seguintes:

- Cromatografia sólido-líquida: baseia-se em interações dos solutos em sítios ativos de um adsorvente sólido finamente dividido, usado como fase estacionária;
- Exclusão por volume (ou tamanho): a separação ocorre de acordo com o volume da molécula em solução e do tamanho dos poros da resina (ou gel) utilizada;
- Troca iônica: baseia-se na separação de cátions e ânions por meio da utilização de resinas trocadoras de íons;
- Cromatografia líquido-líquido: baseia-se na distribuição de moléculas do soluto entre duas fases imiscíveis, de acordo com as solubilidades relativas. Neste caso, o meio de separação é um sólido inerte, finamente dividido, que suporta uma fase líquida fixa (estacionária). A separação é

feita passando-se a fase móvel sob a fase estacionária, normalmente empacotada em uma coluna. Nos casos em que a fase estacionária é polar e a fase móvel é apolar, denomina-se cromatografia líquido-líquido em fase normal. Para os casos em que a fase estacionária é apolar e a fase móvel polar, denomina-se cromatografia em fase reversa.

Os problemas relacionados à utilização de líquido como fase móvel na cromatografia líquido-líquido têm sido superados por meio de estabelecimento de ligações entre a fase estacionária e suportes de sílica (SEWELL & CLARKE, 1987). As fases ligadas são preparadas a partir da reação de grupos silanóis com clorossilano (Figura 4).

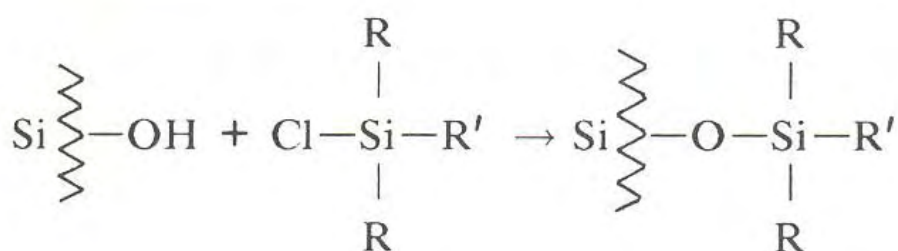


Figura 4 - Reação do grupo silanol com silano para preparação de fase ligada utilizada em cromatografia líquido-líquido. Fonte: Sewell & Clarke (1987).

Neste caso, geralmente os grupos R são metilas (CH<sub>3</sub>). A natureza do grupo R' pode variar de acordo com a polaridade desejada para a fase estacionária. Geralmente R' é uma cadeia hidrocarbônica (C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub>) a qual confere característica apolar à fase estacionária (SEWELL & CLARKE, 1987). De acordo com os autores, tal apolaridade pode ser reduzida com a substituição do grupo CH<sub>3</sub> terminal da cadeia carbônica por um grupo ciano (CN) ou amino (NH<sub>2</sub>).

O primeiro cromatógrafo líquido de uso prático foi construído por Csaba Horvath, na Universidade de Yale, em 1964 (Mortimer, 1967, citado por MENDHAM

et al., 2002). De acordo com Mendham et al. (2002), atualmente, os cromatógrafos de fase líquida são compostos de:

- Sistema alimentador de solvente: composto por bombas, controladores de pressão, controles de fluxo e filtro de entrada;
- Sistema de injeção da amostra;
- Coluna;
- Detector;
- Controle e visualização de dados.

Na Figura 5, apresenta-se um esquema da configuração dos cromatógrafos líquidos.

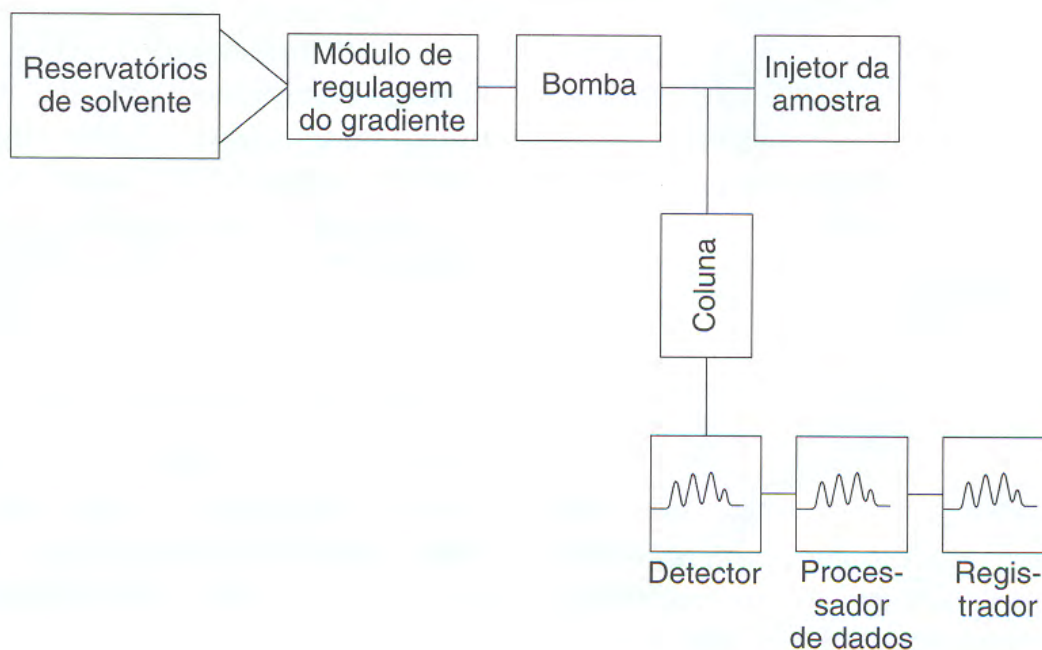


Figura 5 - Características de um cromatógrafo com fase líquida. Fonte: Mendham et al. (2002).

Existem diversos detectores possíveis de utilização em cromatografia líquida. A detecção por fluorescência destaca-se pela grande seletividade, pois poucas moléculas fluorescem quando comparadas ao número de moléculas que absorvem

radiação eletromagnética (SHELLY & WARNER, 1983). De acordo com os autores, o espectrofotômetro de fluorescência convencional é composto de cinco partes:

- a) Fonte de radiação: pode ser composta de uma lâmpada de xenônio (ampla faixa de espectro), mercúrio (maior energia de excitação) ou de xenônio-mercúrio associados;
- b) Sistema de seleção do comprimento de onda de excitação: consiste em filtro ou monocromador com a função de selecionar a radiação monocromática para excitação da amostra;
- c) Célula da amostra: célula com microfluxo (menor que 20  $\mu\text{L}$ ) construída em quartzo;
- d) Sistema de seleção do comprimento de onda de emissão: similar ao sistema de seleção do comprimento de onda de excitação. É instalado em ângulo de  $90^\circ$  em relação ao eixo de excitação para evitar a interferência de radiação dispersa;
- e) Detector: tubo fotomultiplicador situado na saída do monocromador de emissão.

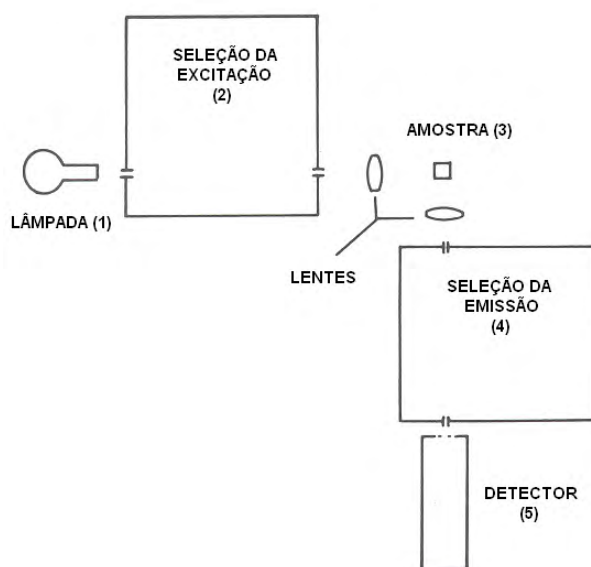


Figura 6 - Espectrofotômetro de fluorescência convencional. Fonte: adaptado de Shelly & Warner (1983).

Diante da complexidade das amostras ambientais, não é possível a injeção direta das mesmas no sistema cromatográfico, sendo necessário, geralmente, o preparo por meio da pré-concentração e da limpeza (*clean up*) do extrato concentrado.

## 4.2 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE) é uma das várias técnicas disponíveis a ser aplicada entre a coleta e a análise da amostra. Essa técnica ganhou destaque nos anos de 1970 quando surgiram os cartuchos contendo sílica modificada, fato que ampliou a aplicabilidade para amostras aquosas (SIMPSON & WELLS, 2000). De acordo com os autores, a extração em fase sólida pode ser utilizada para alcançar os seguintes objetivos:

- Concentração do analito;
- Remoção de moléculas indesejáveis da amostra (*clean up*);
- Remoção da matriz da amostra / troca de solvente.

Esses objetivos são alcançados nos quatro passos que envolvem a extração por SPE. O primeiro passo deve ser executado antes da passagem da amostra, sendo denominado condicionamento. Esse consiste na passagem seguida de solventes com polaridade crescente para promover arranjo das cadeias carbônicas do adsorvente de forma a facilitar o acesso do analito às mesmas, viabilizando a recuperação desejável (PESEK & MATYSKA, 2000). Na Figura 7, utiliza-se C<sub>18</sub> como exemplo para mostrar a ação do condicionamento sob tais cadeias carbônicas. As etapas que seguem o condicionamento do cartucho na extração em fase sólida são mostradas na Figura 8.

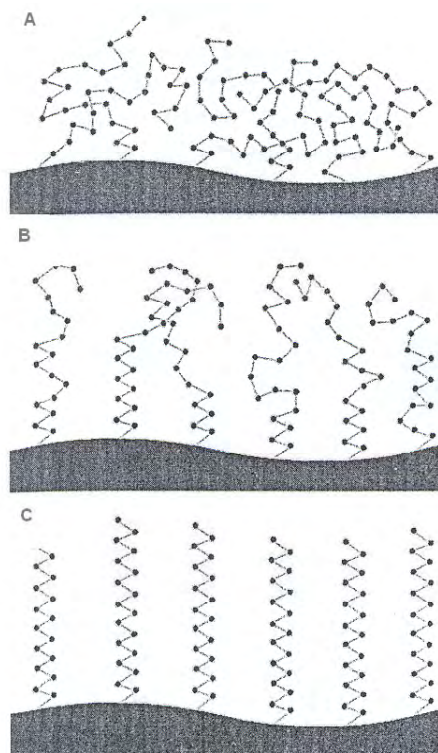


Figura 7 - Etapas do condicionamento de sílica ligada a octadecil. A - sem condicionamento. B - parcialmente condicionado. C - totalmente condicionado. Fonte: Pesek & Matyska (2000).

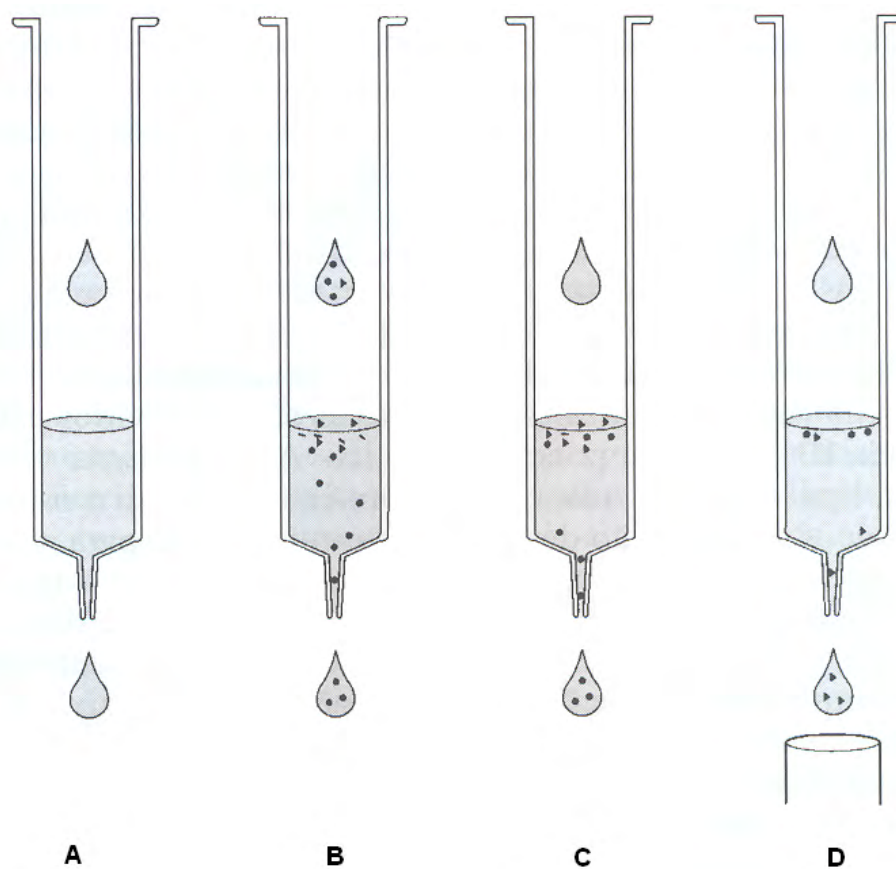


Figura 8 - Etapas da extração em fase sólida: condicionamento (A), passagem da amostra (B), lavagem do cartucho (C) e eluição (D). Fonte: Mendham et al. (2002).

Conforme Figura 8, depois do condicionamento do cartucho, é feita a passagem da amostra pelo adsorvente, onde há a retenção do analito e de outras substâncias com afinidade a esse (SIMPSON & WELLS, 2000). De acordo com os autores, em seguida, é realizada a lavagem do adsorvente para a liberação das substâncias indesejáveis retidas e, finalmente, a eluição dos analitos com um solvente adequado.

### **4.3 Análise de estrogênios em águas naturais e tratadas**

Com base nas semelhanças entre as propriedades físicas e químicas dos estrogênios, os mesmos podem ser analisados simultaneamente (TERNES, 2001). Os métodos publicados na literatura para a determinação de estrogênios em água são principalmente baseados em extração em fase sólida, derivação (silação) e detecção por CG/MS ou CG/MS/MS (TERNES, 2001). Outras alternativas consistem na cromatografia líquida com detecção por fluorescência, radioimunoensaio (SNYDER et al., 1999) ou espectrometria de massas (BARONTI et al., 2000).

Na Tabela 3, apresentam-se alguns aspectos dos métodos mais utilizados para a determinação de estrogênios em águas naturais e tratadas.

Além da análise química dos estrogênios, é fundamental que as etapas de coleta e de preservação da amostra garantam boa recuperação para posterior análise. Na Tabela 4, são apresentados resultados de teste de preservação de amostra em frascos sob refrigeração com adição de 1% de formalina (formol 37%) e nos cartuchos de extração em fase sólida, com lavagem (com água ou metanol) e refrigeração.



Tabela 3 - Alguns métodos analíticos utilizados para determinação de hormônios estrogênicos em águas naturais ou tratadas.

Referência	Volume de água (L)	Analito <sup>1</sup>	Técnica	Cartucho	Condicionamento	Eluente	Clean up	Lavagem	Derivação
Belfroid et al. (1999)	1	E2, E1, EE2 e E2-G	CG/MS/MS	SDB-XC (disco)	Acet MeOH	MeOH	Cartucho C <sub>18</sub> e Amino	-	Reagente Sil A
Ternes et al. (1999)	1	E1, E2, EE2 e outros	CG /MS/MS	C <sub>18</sub>	Hex Acet MeOH H <sub>2</sub> O pH 3	Acet	Cartucho Sílica	-	MSTFA <sup>2</sup> TMSI <sup>3</sup> DTE <sup>4</sup>
Snyder et al. (1999)	5	E2 e EE2	HPLC/FLU	SDB-XC (disco)	-	Acet MeOH Hex	-	Acet DCM MeOH	-
Jeannot et al. (2002)	1	E2, EE2 e E1	CG/MS	Oasis HLB	Éter dietílico MeOH H <sub>2</sub> O	MeOH/ Éter dietílico (10:90)	-	MeOH/ H <sub>2</sub> O (40:60) H <sub>2</sub> O MeOH/NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O (10:2:88)	BSTFA <sup>5</sup>
Xiao et al. (2001)	2,5	E1, E2, E3 e EE2	GC/NCI/MS	SDB-XC (disco)	MeOH MeOH/ACN (1:1) MeOH/ H <sub>2</sub> O (4:1) MeOH/ H <sub>2</sub> O (1:1) H <sub>2</sub> O	MeOH/H <sub>2</sub> O (4:1) MeOH/ACN (1:1)	-	MeOH/DCM (2:3)	PFBO <sup>6</sup>
Matsumoto et al. (2002)	0,5	E1, E2, EE2 e E3	HPLC/FLU	C <sub>18</sub>	ACN H <sub>2</sub> O AceOEt H <sub>2</sub> O	AceOEt	Cartucho Amino	-	CDPP <sup>7</sup>
Kuch & Ballschmiter (2001)	2 ou 5	E1, E2, EE2 e outros	HRGC/NCI/MS	Lichrolut EN	ACE MeOH H <sub>2</sub> O pH 4	ACE MeOH	-	-	KOH PFBCI <sup>6</sup>
Boyd et al. (2003)	1	E1, E2 e outros	CG/MS	SDB-XC (disco)	MeOH DCM MeOH H <sub>2</sub> O	MeOH DCM MeOH	Sílica	-	BSTFA
Rodríguez-Mozaz et al. (2004)	0,5	E1, E2, EE2, E3 e outros	LC/ESI/MS	Lichrolut RP-18	MeOH H <sub>2</sub> O	MeOH	-	-	-

<sup>1</sup> E2, 17 β estradiol; E1, Estrona; EE2, Etinilestradiol; E2-G, 17 β estradiol conjugado; E3, estriol.

<sup>2</sup> N metil N (trimetilsilil) trifluoroacetamida.

<sup>3</sup> Trimetilsilil imidazol.

<sup>4</sup> Ditioeritrol.

<sup>5</sup> Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida.

<sup>6</sup> Cloreto de pentafluorobenzoila.

<sup>7</sup> 5-(4"-clorosulfônico-1",1"difenil-4"-yl)-1,1,1,2,2-pentafluoro-3,5-pentanodiona.

- Informação não fornecida no artigo.

Tabela 4 - Efeito de tratamentos para estocagem e a influência na recuperação de quatro estrogênios presentes em água fluvial na concentração de 10 ng L<sup>-1</sup>.

Características do teste	Recipiente						
	Frasco <sup>a</sup>			Cartucho Carbograph™			
	Tratamento						
Tempo (dias)	14	28	60	14	14	60	60
T (°C)	4	4	4	20	20	- 18	- 18
Lavagem				H <sub>2</sub> O	MeOH	H <sub>2</sub> O	MeOH
Estrogênio	Recuperação (%)						
Estriol	87	89	65	60	87	77	92
17 β estradiol	89	86	58	64	91	75	89
Etinilestradiol	88	84	63	59	92	71	92
Estrona	90	89	114	77	90	76	93

<sup>a</sup> Com adição de 1% de solução de formol 37 % (v/v) como preservativo.

Fonte: Baronti et al. (2000).

O estudo de estocagem de amostra realizado (BARONTI et al., 2000) indica que a melhor estratégia para evitar a degradação de estrogênios consiste na passagem das amostras pelos cartuchos para extração em fase sólida, lavagem com metanol e estocagem a -18 °C.

Além da análise química direta, a literatura apresenta bioensaios ou biomarcadores que podem ser utilizados para complementar as informações fornecidas pela análise química.

Trutas arco-íris machos, carpas e enguias têm sido utilizadas como bioindicadores. Nessas, depois de expostos em viveiros ou em vida livre, a vitelogenina do plasma ou da fração citosólica do fígado dessas espécies é coletada e analisada por radioimunoensaio (SOLÉ et al., 2001). O aumento da vitelogênese expressa maior potencial estrogênico da amostra, no entanto não atribui esse efeito a uma substância específica.

Os bioensaios podem ser realizados com diversos organismos. Uma das alternativas consiste no uso de leveduras modificadas geneticamente. Essas, na presença de estrogênios, produzem a enzima  $\beta$  galactosidase, que é secretada no meio onde metaboliza um substrato cromogênico amarelo (clorofenol vermelho- $\beta$ -D-galactosídeo), resultando em um produto mensurável por absorvância a 540 nm (DESBROW et al., 1998).

Outra alternativa é o teste de multiplicação de células de câncer de mama, denominadas MCF 7. Primeiramente, as células são cultivadas por um dia em meio de cultura livre de estrogênios e depois semeadas em diluições da amostra. Em seguida, a multiplicação das células é avaliada pela análise do conteúdo protéico total usando sulforonamida B e leitura da absorvância em 550 nm (KÖRNER et al., 1999). Os hormônios consistem em um fator de crescimento para essas células, e

quanto maior a concentração de estrogênios na amostra, maior será o conteúdo protéico encontrado depois da incubação.

Outras medidas fisiológicas ou bioquímicas podem ser conduzidas em estudos multidisciplinares, tais como o índice gonadossomático (IGS), ou seja, a massa relativa da gônada referente à massa do restante do peixe, sendo que quanto maior a exposição a compostos estrogênicos, maior o IGS (JOBILING et al., 1998).

#### **4.4 Validação de métodos cromatográficos**

A validação de métodos analíticos é necessária para o reconhecimento das limitações e confiabilidade dos resultados obtidos.

O processo de validação consiste na avaliação de diversos critérios, tais como seletividade, linearidade, sensibilidade, limite de detecção e quantificação, e precisão.

Diferentes normas, editadas por vários órgãos nacionais ou internacionais, estabelecem critérios para a validação de métodos analíticos. As diretrizes brasileiras mais relevantes são a Resolução - RE 899, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003) e o DOQ-CGCRE-008, do Instituto Nacional de Metrologia (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL, 2003).

A seguir, são descritas as definições de cada critério de acordo com as normas mais relevantes (RIBANI et al., 2004).

**Seletividade:** é a capacidade de avaliar de forma inequívoca as substâncias em exame, na presença de componentes que podem interferir na determinação de analitos em uma amostra complexa. A primeira forma de avaliar consiste em comparar a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com a

substância (padrão); para este caso, nenhum outro composto deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse.

**Linearidade e faixa de aplicação:** a linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação.

A relação entre o sinal e a concentração deve ser determinada empiricamente a partir de sinais medidos para concentrações conhecidas. Essa relação pode ser expressa por meio de uma equação de reta chamada curva analítica. Por meio da regressão linear, podem-se obter os coeficientes angular (a), linear (b) e de correlação (r). Esse último oferece informações a respeito da qualidade da curva analítica, pois, quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão dos pontos.

A faixa de aplicação corresponde ao intervalo entre o valor superior e o inferior da substância em exame que atenda aos requisitos de precisão e exatidão.

**Precisão:** expressa dispersão dos resultados de ensaios repetidos para mesma amostra ou padrão.

A precisão pode ser expressa em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetitividade representa a reprodução dos resultados de medições sucessivas efetuadas num curto espaço de tempo e sob as mesmas condições: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento e mesmo local. A precisão intermediária indica a variação referente a alterações dentro do mesmo laboratório: dias diferentes, analistas diferentes ou equipamentos diferentes. A reprodutibilidade é o resultado de estudos de colaboração em que vários laboratórios analisam uma amostra em comum. Ela é importante para a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos no CODEX ou em farmacopéias.

A precisão pode ser expressa pelo desvio-padrão absoluto, pelo desvio-padrão relativo (coeficiente de variação, CV) ou pelo intervalo de confiança. O limite de precisão aceito varia de acordo com a concentração do analito, conforme mostrado na Tabela 5.

Tabela 5 – Precisão aceitável, expressa como coeficientes de variação, em função do nível de concentração do analito.

Concentração do analito (%)	Coeficiente de variação (%)
1 (100 %)	2
$10^{-1}$	2,8
$10^{-2}$ (1%)	4
$10^{-3}$	5,6
$10^{-4}$	8
$10^{-5}$	11
$10^{-6}$ (ppm)	16
$10^{-7}$	23
$10^{-8}$	32
$10^{-9}$ (ppb)	45

Fonte: Brito et al. (2003).

**Exatidão:** representa o grau de concordância entre o resultado obtido para um determinado ensaio e um valor aceito como verdadeiro.

A exatidão pode ser avaliada pela utilização de materiais de referência certificados (CRM), os quais podem ser adquiridos em órgãos reconhecidos, como o NIST (*National Institute of Standards and Technology – USA*), e são acompanhados de um certificado que possui o valor e a incerteza para a concentração de uma dada substância. Outra forma de avaliação da exatidão consiste na comparação dos resultados obtidos empregando-se novo método e método oficial ou de referência.

Os ensaios de recuperação consistem em outra alternativa para a determinação da exatidão. A recuperação é definida como a quantidade de substância presente ou adicionada ao material de teste, que é extraída e passível de ser quantificada. Ela deve ser avaliada adicionando-se a substância de interesse à matriz em estudo, em, pelo menos, três concentrações.

Na Tabela 6, apresenta-se o intervalo de recuperação aceito referente a diversas faixas de concentração do analito a ser analisado.

Tabela 6 - Recuperação aceitável do analito em função da concentração.

Concentração do analito (%)	Intervalo de recuperação aceito (%)
> 10	98 – 102
> 1	97 – 103
> 0,1	95 – 105
> 0,01	90 – 107
> 0,001 - > 0,00001	80 – 110
> 0,000001	60 – 115
> 0,0000001	40 – 120

Fonte: Brito et al. (2003); González et al. (1999).

**Limite de detecção (LD):** representa a menor concentração da substância que pode ser detectada pelo método, mas não necessariamente quantificada. O LD pode ser calculado de três maneiras:

- a) Método visual: é utilizado para determinar o limite de detecção empregando a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de tal modo que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável). Esse procedimento também pode ser feito por meio do instrumento utilizando parâmetros de detecção no método de integração.
- b) Método da relação sinal-ruído: aplica-se somente a métodos que apresentam ruídos na linha de base. Para determinar a relação sinal-ruído, é feita a comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz e um branco (matriz isenta do composto de interesse). Assim, é estabelecida a concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal-ruído pode ser 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitas como estimativas de LD.

- c) Método baseado em parâmetros da curva analítica: neste caso, o LD pode ser expresso como  $LD = 3,3 \times s/S$ . Em que,  $s$  é a estimativa de desvio-padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio-padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação, e  $S$  é a inclinação (*slope*) ou coeficiente angular da curva analítica. Para calcular esses dados, uma curva analítica deve ser feita utilizando a matriz contendo o composto de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de detecção.

**Limite de quantificação (LQ):** representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida. O LQ pode ser determinado pelos mesmos métodos para a determinação de LD. No método da relação sinal-ruído, o critério a ser adotado passa a ser a taxa 10:1, para sinal-ruído. No método baseado em parâmetros da curva analítica, a equação adotada para o cálculo seria a seguinte:  $LQ = 10 \times s/S$ . Em que,  $s$  é a estimativa de desvio-padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio-padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação, e  $S$  é a inclinação (*slope*) ou coeficiente angular da curva analítica.

**Robustez:** mede a sensibilidade de um método frente a pequenas variações, como o pH e a força iônica da fase móvel, programação de temperatura, tempo de extração, etc.

Na Tabela 7, encontram-se alguns dados a respeito da validação dos métodos da Tabela 3, disponíveis sobre a análise de hormônios estrogênicos em águas tratadas e naturais.

Observa-se que o maior limite de detecção ( $1.600 \text{ ng L}^{-1}$ ) foi apresentado pelo método de Snyder et al. (1999) para análise de  $17 \beta$  estradiol e etinilestradiol, que

utilizou a cromatografia líquida e a detecção por fluorescência (MATSUMOTO et al., 2002).

Tabela 7 – Parâmetros da validação analítica para alguns dos métodos disponíveis na literatura para análise de hormônios estrogênicos em águas naturais.

Referência	Volume de amostra (L)	Analito <sup>1</sup>	Técnica	LD (ng L <sup>-1</sup> )	LQ (ng L <sup>-1</sup> )	Recuperação (%)	Coefficiente de variação (%)
Belfroid et al. (1999)	1	E2, E1, EE2 e E2-G	CG/MS/MS	0,1 a 0,6	-	88 a 98	-
Ternes et al. (1999)	1	E1, E2, EE2 e outros	CG/MS/MS	0,5 a 2,0	-	41 a 90	0 a 14
Snyder et al. (1999)	5	E2 e EE2	HPLC/FLU	1.600	-	63 a 72	3 a 7 <sup>2</sup>
Jeannot et al. (2002)	1	E2, EE2 e E1	CG/MS	-	2 a 10	94 a 109	2 a 5
Xiao et al. (2001)	2,5	E1, E2, E3 e EE2	CG/NCI/MS	0,2	-	84 a 116	11 a 22
Matsumoto et al. (2002)	0,5	E1, E2, E3 e EE2	HPLC/FLU	600 a 650	-	86 a 105	4 a 5,8
Kuch & Ballschmiter (2001)	2 ou 5	E1, E2, EE2 e outros	HRGC/NCI/MS	0,05 a 0,15	-	-	34 a 125
Boyd et al. (2003)	1	E1, E2 e outros	CG/MS	0,1 a 0,3	-	118 a 130	15 a 22
Rodríguez-Mozaz et al. (2004)	0,5	E1, E2, EE2, E3 e outros	LC/ESI/MS	0,53 a 14,79	-	70 a 119	4 a 23

<sup>1</sup> E2, 17  $\beta$  estradiol; E1, Estrona; EE2, Etinilestradiol; E2-G, 17  $\beta$  estradiol conjugado; E3, estriol

<sup>2</sup> Desvio-padrão.

O método de Matsumoto et al. (2002) baseou-se na análise por HPLC/FLU, que utilizou a derivação pré-coluna com 5-(4"-clorossulfônico-1',1"difenil-4'-yl)-1,1,1,2,2-pentafluoro-3,5-pentanodiona. Nesse caso, os limites de detecção estiveram acima dos demais métodos descritos na literatura, indicando que essa derivação não consiste em boa alternativa para análise por cromatografia líquida.

Os métodos com base em cromatografia gasosa (BELFROID et al., 1999; BOYD et al., 2003) apresentaram os menores limites de detecção dentre os métodos consultados (0,1 a 0,6 ng L<sup>-1</sup>).



## 5 Os hormônios estrogênicos e o saneamento básico

### 5.1 Tratamento de esgoto doméstico

Antes da abordagem sobre a eficiência dos diversos tipos de tratamentos existentes, devem-se destacar as diferenças existentes entre a forma com que os hormônios são excretados e a forma em que exercem atividade biológica.

A excreção diária de hormônios pelas mulheres é de 106; 14 e 32  $\mu\text{g}$  de estriol, 17  $\beta$  estradiol e estrona, respectivamente. Na excreção, os mesmos encontram-se conjugados, ou seja, ligados ao ácido glucurônico (17  $\beta$  estradiol) ou ao sulfato (estrona) (D'ASCENZO et al., 2003). Os hormônios, quando conjugados, encontram-se na forma inativa, pois perdem completamente a capacidade de ligação ao receptor estrogênico. O processo de quebra da conjugação ocorre no percurso do esgoto entre as residências até as ETEs ou dentro das ETEs. Isso ocorre pelo contato com a elevada população de *Escherichia coli* produtora das enzimas glucuronidase e arilsulfatase (D'ASCENZO et al., 2003). Dessa forma, a rede coletora e as ETEs podem ser consideradas reatores que convertem estrogênios da forma inativa (conjugada) em ativa (livre).

Outra questão relevante consiste no fato de que alguns hormônios estão em equilíbrio entre si, tais como o 17  $\beta$  estradiol (forma reduzida) e a estrona (forma oxidada). Durante os processos de tratamento, pode haver a conversão de um estrogênio em outro, em função das condições oxidantes/redutoras do meio.

Apesar das ressalvas apresentadas, até o momento não se sabe qual das alternativas de tratamento de esgoto tem maior capacidade para a remoção de estrogênios nas condições climáticas brasileiras. Na Figura 9, ilustra-se uma

comparação realizada em 1997, na ETE da Penha, no Rio Janeiro. Nessa estação de tratamento, logo após a entrada, cerca de 70% do esgoto era encaminhado para o tratamento pelo processo de lodos ativados e 30% para o processo de filtro biológico (ambos aeróbios). Observa-se que a remoção pelo processo de lodos ativados apresenta maior remoção para 17  $\beta$  estradiol e etinilestradiol (TERNES et al., 1999).

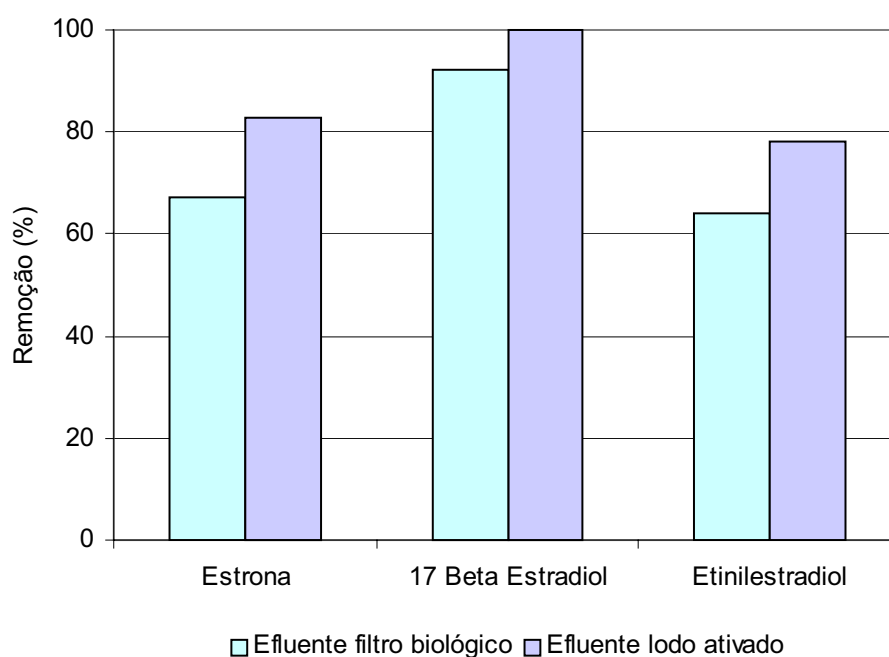


Figura 9 - Percentagem média de remoção de hormônios durante a passagem por filtro biológico e lodo ativado em ETE brasileira. Adaptado de Ternes et al. (1999).

Em estudo realizado no Estado do Arkansas (USA), observou-se que, para o tratamento de esgotos com lodo ativado, a remoção de hormônios foi mais eficiente nos processos em que ocorreu a remoção de nutrientes, ou seja, o tratamento terciário responsável pela remoção de nitrogênio e fósforo. Nesse caso, o lodo possui tempo de detenção de 11 a 13 dias e ocorre a multiplicação de microrganismos capazes de degradar os estrogênios, fato que não ocorre em processos convencionais com tempo de detenção do lodo menor que quatro dias (ANDERSEN et al., 2003).

## 5.2 Tratamento de água

De acordo com Parsekian (1998), as águas para abastecimento podem ser provenientes de dois tipos de mananciais: superficial e subterrâneo. Normalmente, o manancial subterrâneo necessita de operações simples, como desinfecção e fluoretação, para atingir as condições de potabilidade. Quando a captação de água é proveniente de manancial superficial, são necessários outras operações e processos além da desinfecção e da fluoretação. A seqüência dos processos envolvidos no tratamento convencional de águas superficiais em ETAs é mostrada na Figura 10.

A seguir, cada etapa mostrada na Figura 10 é descrita, de acordo com adaptações de Parsekian (1998).

**Pré-tratamento, captação e adução:** antes de ser captada, a água passa por pré-tratamento, geralmente realizado por grade e caixa de areia onde se retêm impurezas grosseiras e sedimentam-se partículas em suspensão.



Figura 10 - Tecnologia de tratamento completo de água destinada ao consumo humano (DI BERNARDO, 1993).

**Coagulação:** as argilas presentes na água encontram-se com cargas negativas na superfície (Figura 11), as quais impedem o aglutinamento das mesmas. Para remoção, é necessário aplicar coagulantes que neutralizam essas cargas, possibilitando a aproximação das partículas, que são removidas posteriormente na decantação. As substâncias mais utilizadas como coagulantes são o sulfato de alumínio, o cloreto férrico, o sulfato férrico e o policloreto de alumínio.

A coagulação é resultado de quatro mecanismos distintos: compressão da camada difusa, neutralização de cargas, varredura e formação de ponte. Em estações que empregam o tratamento completo, o mecanismo de varredura é o mais recomendado, pois os flocos formados são maiores e apresentam velocidades de sedimentação relativamente altas. Nesse mecanismo (Figura 12), há a formação excessiva de precipitados de forma que os colóides são aprisionados nos mesmos.

**Floculação:** após aplicar o coagulante, efetua-se mistura rápida de forma a possibilitar a distribuição uniforme do coagulante e que todas as partículas tenham contato com as espécies hidrolisadas. Posteriormente a essa mistura, segue-se mistura lenta, a qual se denomina floculação.

**Decantação:** a decantação, também denominada sedimentação, é definida como fenômeno físico, em que as partículas suspensas apresentam movimento descendente em meio líquido de menor massa específica, devido à ação da gravidade.

**Filtração:** esta etapa é uma das barreiras sanitárias, na qual as impurezas são retidas pela passagem de água em meio poroso. Os filtros denominados rápidos, compostos de areia e antracito, são aqueles em que predominam a ação da profundidade.

**Desinfecção, fluoretação e correção de pH:** a desinfecção é feita principalmente pela adição de cloro gasoso ( $\text{Cl}_2$ ). A adição do cloro é restrita pela Portaria 518/04 (BRASIL, 2004) a concentrações entre 0,2 e 2,0  $\text{mg L}^{-1}$  de cloro residual livre.

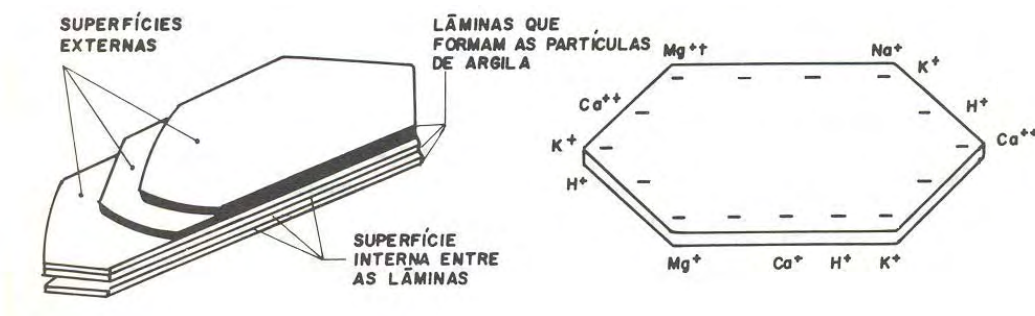


Figura 11 - Representação esquemática de uma partícula de argila. Fonte: Olphen (1977), citado por Di Bernardo (1993).

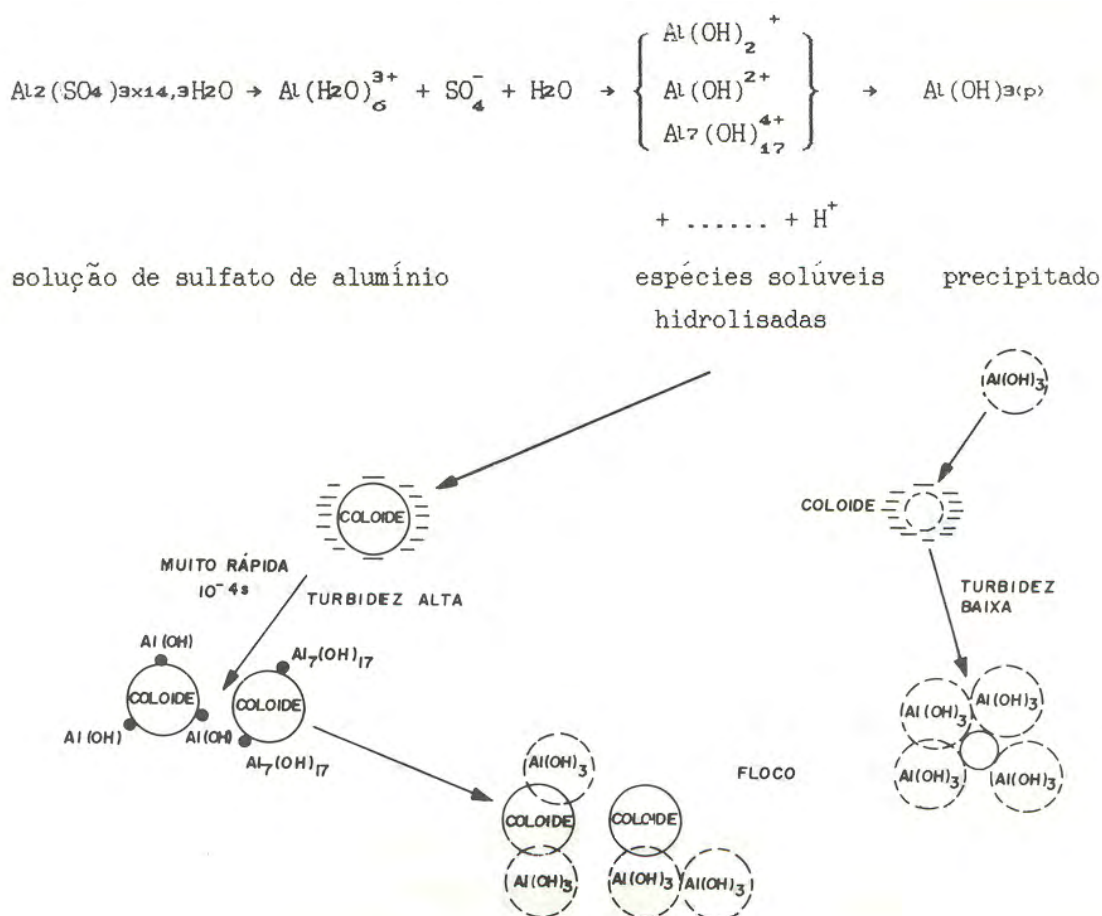
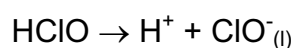
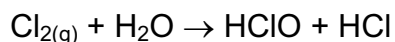


FIGURA 12 – Esquema da coagulação de partículas coloidais nos mecanismos de neutralização de carga (turbidez alta) e varredura (turbidez baixa). Fonte: Amirtharajah & Mills (1982), citado por Di Bernardo (1993).

A ação desinfetante é obtida por meio do contato do cloro com a água e formação de hipoclorito, de acordo com a seguinte equação:



A fluoretação ocorre por meio da aplicação de solução de ácido fluorsilícico ( $\text{H}_2\text{SiF}_8$ ), fluoreto de cálcio ( $\text{CaF}_2$ ), fluossilicato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SiF}_6$ ) ou de fluoreto de sódio ( $\text{NaF}$ ) (BRASIL, 1975). O valor máximo permitido está em  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  para o Brasil (BRASIL, 2004) e entre  $0,6$  e  $0,8 \text{ mg L}^{-1}$  de fluoreto para o Estado de São Paulo (BRASIL, 1975).

Em seguida, deve ser feita a aplicação de suspensão da cal hidratada de 8% a 10% (m/v) para a correção de pH com vistas a assegurar que não haja formação de depósitos ou corrosão na rede de abastecimento. O pH recomendado para água de abastecimento está entre  $6,0$  e  $9,5$  (BRASIL, 2004).

A remoção de estrogênios em águas de mananciais superficiais tem sido pesquisada quanto aos processos de tratamento para potabilização com tecnologias convencionais e avançadas.

Sabe-se que o ozônio reage com grande número de compostos. A constante de velocidade de reação do dióxido de cloro é duas ordens de magnitude menor que a do ozônio, no entanto é maior que o cloro gasoso. Ambos os oxidantes, dióxido de cloro e cloro gasoso, reagem primariamente com grupos funcionais ricos em elétrons, como fenóis e aminas, portanto são efetivos na oxidação de estrogênios quando aplicados no tratamento de água (HUBER et al., 2005).

Além da desinfecção, vários materiais apresentam capacidade de adsorver estrogênios quando presentes em água e poderiam ser utilizados no tratamento

convencional. Dentre os materiais, podem-se citar o carvão ativado granular, a quitosana, a quitina e adsorvente orgânico preparado a partir de lodo de ETE calcinado (ZHANG & ZHOU, 2005). Em comparação feita por esses autores, o adsorvente orgânico apresentou melhor desempenho (87.500 mL g<sup>-1</sup> para E1 e 116.000 mL g<sup>-1</sup> para E2), seguido pelo carvão ativado granulado (9.290 mL g<sup>-1</sup> para E1 e 12.200 mL g<sup>-1</sup> para E2). A desvantagem da utilização do método de adsorção para a remoção dos hormônios consiste no tempo para atingir o equilíbrio, que pode ser de até 125 horas para o carvão ativo granular, conforme observado pelos mesmos autores.

Além das técnicas convencionais de tratamento de água, existem tecnologias avançadas a serem utilizadas quando as técnicas convencionais não são aplicáveis. A utilização de membranas para a remoção de compostos orgânicos de baixa massa molecular tem sido proposta como alternativa para a remoção de hormônios de águas.

Nessa classe de tecnologias, estão inseridas a osmose reversa, a nanofiltração e a ultrafiltração. Em todos os casos, a remoção se dá devido à carga e ao tamanho molecular. A nanofiltração difere da osmose reversa porque a primeira retém somente íons multivalentes. As membranas de nanofiltração possuem características intermediárias entre a ultrafiltração e a osmose reversa (SCHÄFER et al., 2003).

Para processos de nanofiltração com membranas de poliamida-uréia, com o diâmetro de poro inferior ao da molécula, o mecanismo predominante é de “peneiramento molecular”. A nanofiltração apresenta capacidade de remoção entre 95 e 99% na faixa de concentração entre 1 e 1.000 ng L<sup>-1</sup> (SCHÄFER et al., 2003).

Quanto à osmose reversa, para membranas de poliamida com diâmetro do poro maior que da molécula de estrona, prevalece o mecanismo de retenção por adsorção por meio da formação de ligações de hidrogênio. Essa retenção se mantém acima de 95% e reduz até 10% para soluções com pH maior que o pka da estrona (10,5), pelo comprometimento da formação de ligações de hidrogênio (NGHIEM et al., 2002).

Outra técnica avançada de tratamento que pode ser utilizada, é a degradação por fotocatalise com  $\text{TiO}_2$  (OKHO et al., 2002), a qual apresenta degradação de mais de 99% de  $17\beta$  estradiol em 30 minutos, em solução com concentração  $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Nesse caso, os produtos gerados foram identificados como sendo  $10\epsilon$ - $17\beta$ -diidroxil- $1,4$ -estradienona3 (DEO), androsta- $4,16$ -dienona (ADO) e testosterona (TS).

A fotodegradação da estrona também é possível com o sistema foto-Fenton [UV-VIS/ $\text{Fe(III)}/\text{H}_2\text{O}_2$ ]. No arranjo testado por Feng et al. (2005), utilizando concentrações de  $185 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $60 \text{ mg L}^{-1}$ , em solução-padrão), a eficiência de remoção foi de 98,4% após 160 minutos de irradiação.



### III MATERIAIS E MÉTODOS<sup>1</sup>

#### 1 Materiais, equipamentos, reagentes

##### 1.1 Materiais

- vidraria de uso comum em laboratório (béquer, erlenmeyer, pipeta, balão volumétrico);
- seringa de vidro de 5 mL, fabricada pela YALE;
- microsseringa de vidro de 100 e 250  $\mu$ L, fabricada pela HAMILTON;
- unidade filtrante PVDF (fluoreto de polivilideno), Durapore, MILIPORE, 0,45  $\mu$ m de diâmetro de poro e 13 mm diâmetro do filtro;
- filtro de fibra de vidro GF-C, 47 mm de diâmetro, 1,2  $\mu$ m de diâmetro de poro, marca Schleicher & Schuell;
- coluna capilar de sílica fundida SBP-5 (5% difenil e 95% dimetil polissiloxano) com 30 cm de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,25  $\mu$ m, da SUPELCO;
- pré-coluna com 30 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro, fabricada pela PHENOMENEX;
- coluna C18 com 250 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro e tamanho de partículas de 5  $\mu$ m, fabricada pela PHENOMENEX;
- coluna C18 PAH com 250 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro e tamanho de partículas de 5  $\mu$ m, fabricada pela SUPELCO;
- conjunto de filtração para extração em fase sólida, com 19 posições, WATERS;

- conjunto de filtração, marca MILLIPORE;
- compressor-aspirador modelo DIA PUMP CAL, marca FANEM;
- cartucho para extração em fase sólida ACCUBOND C18 de 500 mg e 6 mL, AGILENT-HP, e
- outros materiais: suporte, garra, papel indicador de pH colorpHast.

## 1.2 Equipamentos

- banho de ultra-som, 40 Hz, 20 L, Thornton;
- balança analítica METTLER TOLEDO AG 245;
- cromatógrafo a gás VARIAN, modelo 3800, acoplado a um espectrômetro de massas VARIAN, modelo MS/MS 2000;
- cromatógrafo líquido WATERS, modelo 501, acoplado a integrador WATERS, modelo 746, com detector uv/vis variável, modelo 486;
- cromatógrafo líquido Pro Star, com detector de fluorescência, modelo 360, e injetor automático modelo 400, acoplado a uma workstation VARIAN;
- espectrofotômetro uv/vis, modelo Lambda 14 P, marca PERKIN ELMER;
- espectrofotômetro de fluorescência VARIAN, modelo Cary Eclipse;
- analisador de carbono TOC, modelo 5000 A, marca SHIMADZU, e
- GPS GARMIN eTrex Vista.

### 1.3 Reagentes, solventes e padrões

- detergente alcalino Extran, MERCK;
- metanol (grau HPLC) e acetonitrila (grau HPLC) da J.T.BAKER, hexano e acetona (grau HPLC) da MALLINCKRODT;
- água deionizada obtida do sistema Milli-Q plus MILLIPORE, e
- padrões de hormônios, com grau de pureza entre 100 e 99,4%, para 17  $\beta$  estradiol e estrona, respectivamente, da marca FLUKA; mirex, da marca SIGMA-ALDRICH, 98,8% de pureza.

## 2 Lavagem da vidraria

A vidraria foi lavada utilizando o detergente alcalino Extran (2%). Em seguida, foram enxaguadas com água de torneira, água destilada, água deionizada e secas ao ar.

## 3 Preparação das soluções-estoque

Foram preparadas soluções-padrão de concentração nominal  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (massa do padrão por volume de acetonitrila para HPLC/UV e HPLC/FLU e massa do padrão por volume de metanol para GC/MS) para cada um dos analitos de interesse. A partir das soluções-estoque, foram preparadas soluções mistas com diferentes concentrações dos padrões, de modo a adequar-se à sensibilidade dos sistemas cromatográficos avaliados.

## **4 Seleção e otimização do sistema cromatográfico**

### **4.1 Resolução cromatográfica do sistema GC/MS**

Para a separação e a detecção dos analitos, primeiramente, foi utilizado um sistema GC/MS (Cromatógrafo Gasoso acoplado a um detector de Espectrometria de Massas) sem derivação dos analitos, conforme Soliman et al. (2004). O padrão interno (mirex) e as condições cromatográficas foram utilizados conforme recomendação de Ternes et al. (1999).

Essa técnica apresentou duas desvantagens: baixa sensibilidade pelo fato de ter sido possível detectar apenas concentrações em torno de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  e baixa repetitividade. Diante disso, a continuidade da utilização dessa técnica deveria dar-se de modo a alterar o preparo da amostra, acrescentando uma etapa de derivação após a extração. Essa etapa conferiria maior volatilidade aos analitos e resultaria em melhoria na qualidade da resposta. No entanto, devido ao alto custo dos reagentes de derivação à elevada toxicidade dos mesmos e à demora do processo de derivação, optou-se pela tentativa de utilização de cromatografia líquida para a elaboração do método, conforme descrito a seguir.

### **4.2 Resolução cromatográfica do sistema HPLC/UV**

Para os estudos do sistema HPLC/UV (Cromatógrafo Líquido acoplado a um detector de UV), foram utilizadas soluções-padrão mistas, em acetonitrila, com concentrações variando entre  $2,5$  e  $12,5 \text{ mg L}^{-1}$ , preparadas a partir da diluição das soluções-estoque.

O equipamento utilizado foi um Cromatógrafo Líquido com detector de UV em 281 nm. O volume injetado (injetor manual), utilizando-se de microsseringa, foi de 20  $\mu\text{L}$ . Empregou-se vazão de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$  do sistema eluente e as condições cromatográficas descritas por Snyder et al. (1999): gradiente linear de  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ , de 50 a 76% de ACN em 10 minutos (2,6% de ACN/min). Foi construída curva analítica com cinco concentrações dos padrões e número de repetições para cada ponto igual a dois.

A curva analítica forneceu informações sobre a linearidade da faixa estudada por meio do cálculo do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) e coeficiente de variação dos fatores de resposta (Área/Concentração, A/C). Nesse cálculo, utilizou-se da relação descrita a seguir (BRITO et al., 2003):

$$CV(\%) = \left( \frac{S}{M} \right) \times 100$$

Em que: S, desvio-padrão; M, média.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do sistema cromatográfico foram determinados experimentalmente. Considerou-se como o LD do sistema cromatográfico a menor concentração em que há identificação da substância do pico, no entanto com área não-reprodutível em injeções sucessivas. Para o LQ do sistema cromatográfico, considerou-se a menor concentração a apresentar área reprodutível em injeções sucessivas e que integrasse o intervalo de linearidade.

#### **4.3 Resolução cromatográfica do sistema HPLC/FLU**

Para a separação e a detecção dos analitos no sistema HPLC/FLU (Cromatógrafo Líquido acoplado a um detector de Fluorescência), foram utilizadas

as seguintes condições otimizadas neste trabalho: volume de injeção (automático) de 20  $\mu\text{L}$ , vazão de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$  e eluição isocrática  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  1:1.

Para esta etapa, utilizou-se de solução-padrão mista contendo os dois hormônios nas concentrações entre 1,0 e 10  $\text{mg L}^{-1}$  para a estrona e 12,5 e 100  $\text{ng mL}^{-1}$  para o 17  $\beta$  estradiol. Essas concentrações foram escolhidas por apresentarem picos com boa detecção no detector de fluorescência. Nesta etapa, foram utilizados os comprimentos de onda de excitação de 230 nm e de emissão de 306 nm, para a detecção.

Para o sistema HPLC/FLU, a curva analítica foi construída com cinco pontos e três repetições para cada ponto, conforme recomendado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003).

A avaliação do desempenho do sistema cromatográfico foi feita da mesma forma que para o HPLC/UV, com dois recursos: coeficientes de correlação da curva analítica ( $R^2$ ) e coeficiente de variação dos fatores de resposta (A/C).

## 5 Validação do método

Foram estudados sistemas envolvendo  $\text{C}_{18}$  como fase estacionária e acetona como eluente, devido à presença dessas características em vários métodos presentes na literatura, conforme pode ser observado na Tabela 3.

As principais variações efetuadas ocorreram no condicionamento do cartucho, tendo sido estudados os seguintes sistemas: MeOH, MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$ , Hex/Ace/MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  pH 3. Destaca-se que esse último sistema estudado está descrito por Ternes et al. (1999). Para os três testes, outras condições foram utilizadas:

- vazão da amostra: 6  $\text{mL min}^{-1}$ ;

- secagem do cartucho antes da eluição, durante 1 hora, sob vácuo;
- eluição sem aplicação de vácuo;
- evaporação do extrato em acetona até a secura e ressuspensão em 600  $\mu\text{L}$  de acetonitrila;
- filtração do extrato em acetonitrila em filtro com 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro.

Primeiramente, foram utilizadas amostras de água de torneira (do Instituto de Química da UNESP; água subterrânea sem tratamento) com fortificação de 8  $\mu\text{g L}^{-1}$  para estrona e 74  $\text{ng L}^{-1}$  para 17  $\beta$  estradiol. Os procedimentos avaliados encontram-se descritos na Tabela 8.

Tabela 8 - Procedimentos de extração em fase sólida testados com água subterrânea.

Método	Volume de amostra	Massa de adsorvente	Condicionamento do cartucho	Volume do eluente
A	500 mL	500 mg	5 mL MeOH	5 mL Acet
B	500 mL	500 mg	5 mL MeOH 5 mL H <sub>2</sub> O	5 mL Acet
C	500 mL	500 mg	6 mL Hex 2 mL Acet 6 mL MeOH 10 mL H <sub>2</sub> O pH 3	4 mL Acet

Posteriormente, foi selecionado o método de extração que apresentou melhor desempenho, usando como critério a obtenção de recuperação entre 40 e 120% e o coeficiente de variação menor que 45% para repetições (BRITO et al., 2003), e procedeu-se à validação do mesmo.

Para a validação do método, utilizou-se do estudo de recuperação para a determinação da precisão e exatidão conforme descrito por Brito et al. (2002). Foram

feitas três repetições do procedimento de extração com água fortificada, nas concentrações descritas na Tabela 9.

Tabela 9 - Níveis de fortificação utilizados para teste de extração em fase sólida com água subterrânea.

Nível	Estrona ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	17 $\beta$ estradiol ( $\text{ng L}^{-1}$ )
Baixo	2	25
Médio	8	100
Alto	20	200

Em seguida, foram feitos ensaios de recuperação com amostras de águas naturais (manancial superficial) para avaliar o desempenho do método aplicado a essa matriz, uma vez que o presente estudo de caso se refere a amostras de água tratada e natural.

Para viabilizar a análise de água superficial, alterações no método mostraram-se necessárias. Realizou-se filtração em filtros de fibra de vidro GF/C (47 mm de diâmetro, 1,2  $\mu\text{m}$  diâmetro de poro) para remoção de material em suspensão antes da extração em fase sólida. Além dessa, procedeu-se, neste caso, ao *clean up* do cartucho de  $\text{C}_{18}$  antes da eluição, pela passagem de 10 mL de solução  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  (9:1, v/v). Com o decorrer do estudo, mostrou-se necessária também a utilização de 1.000 mL de amostra, ao invés de 500 mL, conforme utilizado anteriormente no ensaio realizado para a validação do método com água subterrânea.

Para a validação do método em água superficial, as amostras fortificadas foram submetidas ao *aging* (envelhecimento) durante 4 horas, a 4 °C, sob proteção de luz, a fim de promover a interação do padrão adicionado com os componentes das amostras. A realização de refrigeração durante o *aging* mostrou-se necessária, uma vez que os analitos consistem em substâncias em equilíbrio e que o mesmo era deslocado com *aging* à temperatura ambiente.



A seguir, é apresentado, de forma esquemática, o método validado e utilizado para o estudo do caso de Jaboticabal - SP.

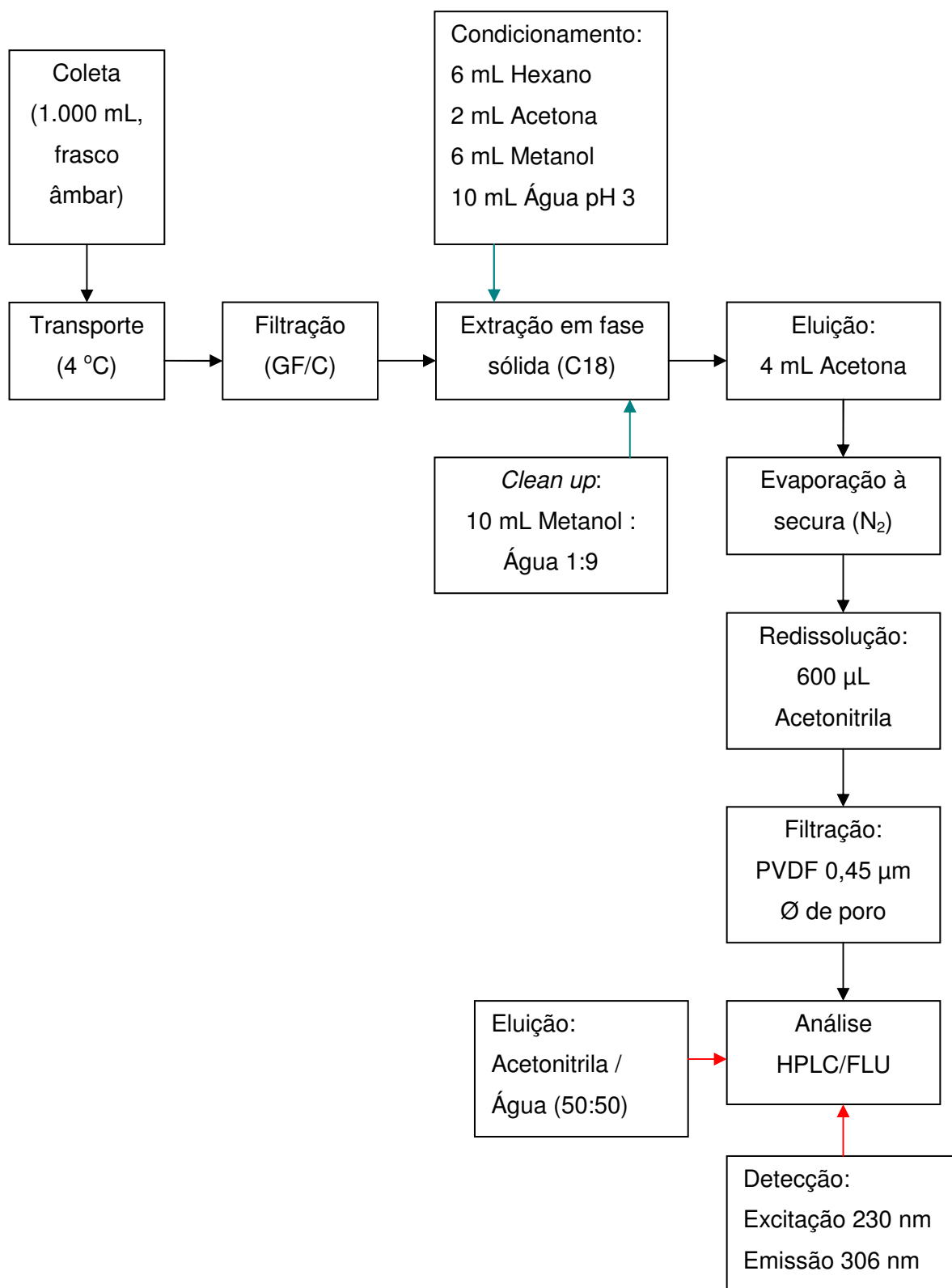


Figura 13 - Esquema do método validado e utilizado para análise de 17  $\beta$  estradiol e estrona em águas naturais e tratadas.

É mostrado, na Figura 14, o arranjo experimental utilizado para a realização da extração em fase sólida.

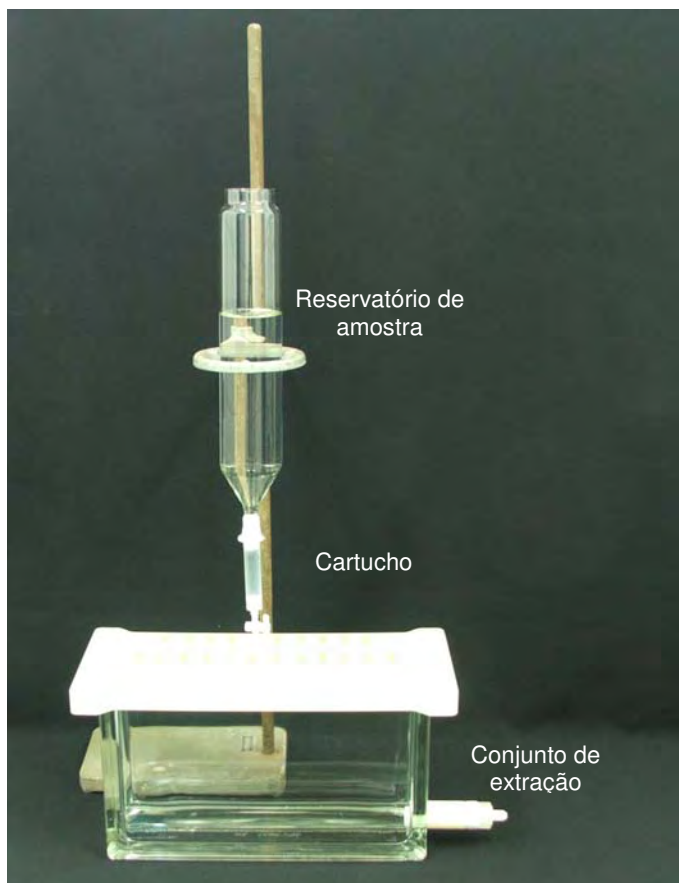


Figura 14 - Arranjo experimental utilizado para extração em fase sólida.

Os critérios utilizados para a validação do método foram a obtenção de recuperação entre 40 e 120% e coeficiente de variação menor que 45% para as repetições (BRITO et al., 2003).

Além das validações já citadas, foram realizadas tentativas de validação da análise de estrogênios pelo método proposto em água potável. A ausência de resultados que atendessem aos critérios adotados neste estudo, quando o método fora aplicado a esta matriz, foi avaliada detalhadamente de acordo com os possíveis interferentes presentes na água potável.

A avaliação foi conduzida conforme mostra a Figura 15.

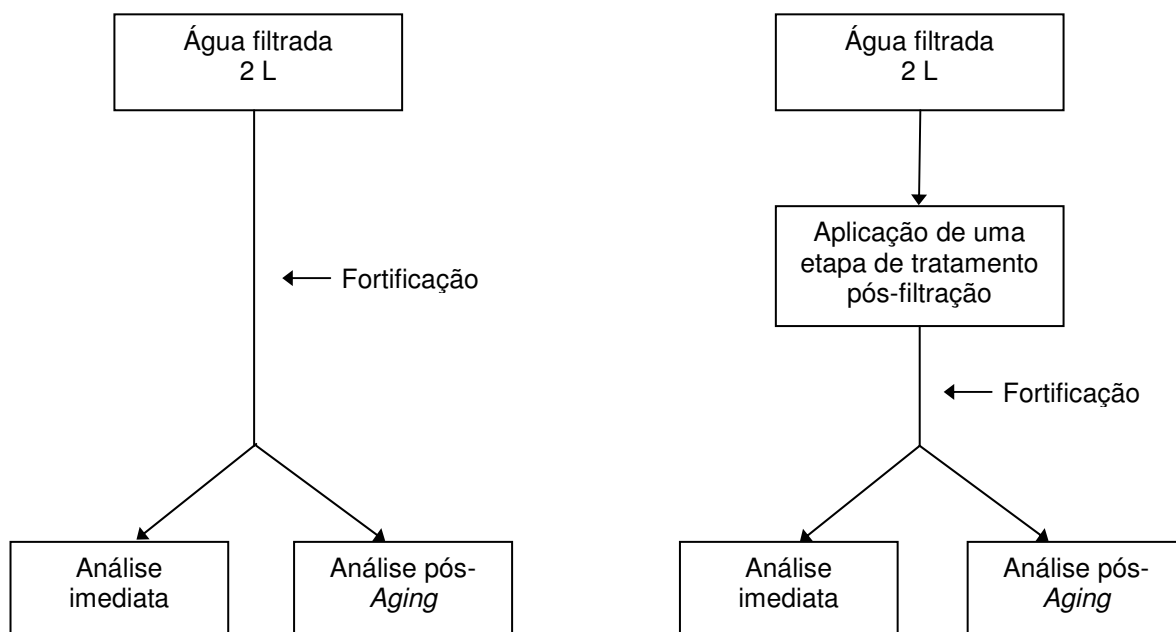


Figura 15 - Esquema da investigação realizada sobre a validação de análise de hormônios em água potável.

Conforme mostra a Figura 15, primeiramente, foram coletadas duas amostras de 2 L de água filtrada. Uma das amostras de 2 L passou por uma das etapas do tratamento de água pós-filtração, como, por exemplo, a cloração. Na avaliação da influência da cloração na recuperação dos hormônios, foi adicionado hipoclorito de sódio (12%) para obtenção de concentração de cloro residual livre de  $1,4 \text{ mg L}^{-1}$ . A escolha da concentração baseou-se nos limites estabelecidos na legislação para a presença de cloro residual livre em água potável, que está entre  $0,2$  e  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  (BRASIL, 2004).

Posteriormente, as duas amostras de 2 L foram fortificadas separadamente. A fortificação foi feita de acordo com a menor concentração na qual se obteve recuperação satisfatória para água superficial:  $7,5 \text{ ng L}^{-1}$  para  $17 \beta$  estradiol e  $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$  para estrona. Depois da fortificação, 1 L da amostra tratada e não-tratada foi analisada imediatamente pelo método proposto. As amostras restantes foram analisadas após *aging* de 4 horas, em gelo não-reciclável.

A análise do efeito da fluoretação foi conduzida da mesma forma, no entanto com adição de ácido fluorsilícico em quantidade suficiente para a obtenção de  $0,81 \text{ mg L}^{-1}$  de fluoreto nas amostras de água filtrada, cujos limites expressos em legislação estão entre  $0,6$  e  $0,8 \text{ mg L}^{-1}$  (SÃO PAULO, 1995).

Em outro experimento, foi avaliada a influência do produto à base de orto polifosfato de sódio (concentração final nas amostras de  $1 \text{ mg PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$ ). Esse produto é adicionado à água filtrada em ETAs para inibição de corrosão de redes de abastecimento à base de ferro. A seleção da concentração a ser aplicada baseou-se na concentração utilizada na ETA de Jaboticabal, uma vez que não existe restrição à presença dessas substâncias em água potável na legislação vigente.

A etapa de correção de pH também foi avaliada da mesma forma. Na amostra a ser tratada, adicionou-se suspensão de cal hidratada 10% para obtenção de pH 9,06. A amostra não-tratada apresentou pH 6,89. Neste caso, as duas condições de trabalho encontravam-se dentro do limite estabelecido pela legislação, entre 6,0 e 9,5 (BRASIL, 2004).

Após a realização desses testes, observou-se a impossibilidade de validação utilizando-se de água potável. Sendo assim, a validação foi finalmente repetida para água filtrada da ETA de Jaboticabal, sem adição de cloro, ácido fluorsilícico, orto-polifosfato e cal.

## 6 Estudo de caso aplicado ao sistema de abastecimento de Jaboticabal - SP

### 6.1 Características da área em estudo

A área de desenvolvimento deste projeto está inserida na Bacia Hidrográfica do Rio Mogi Guaçu (Figura 16), constituindo-se em parte da sub-bacia hidrográfica do Córrego Rico. Essa sub-bacia hidrográfica está localizada na porção centro-norte do Estado de São Paulo, região administrativa de Ribeirão Preto (Figura 17), e abrange os municípios de Monte Alto, Jaboticabal, Santa Ernestina, Taquaritinga e Guariba.

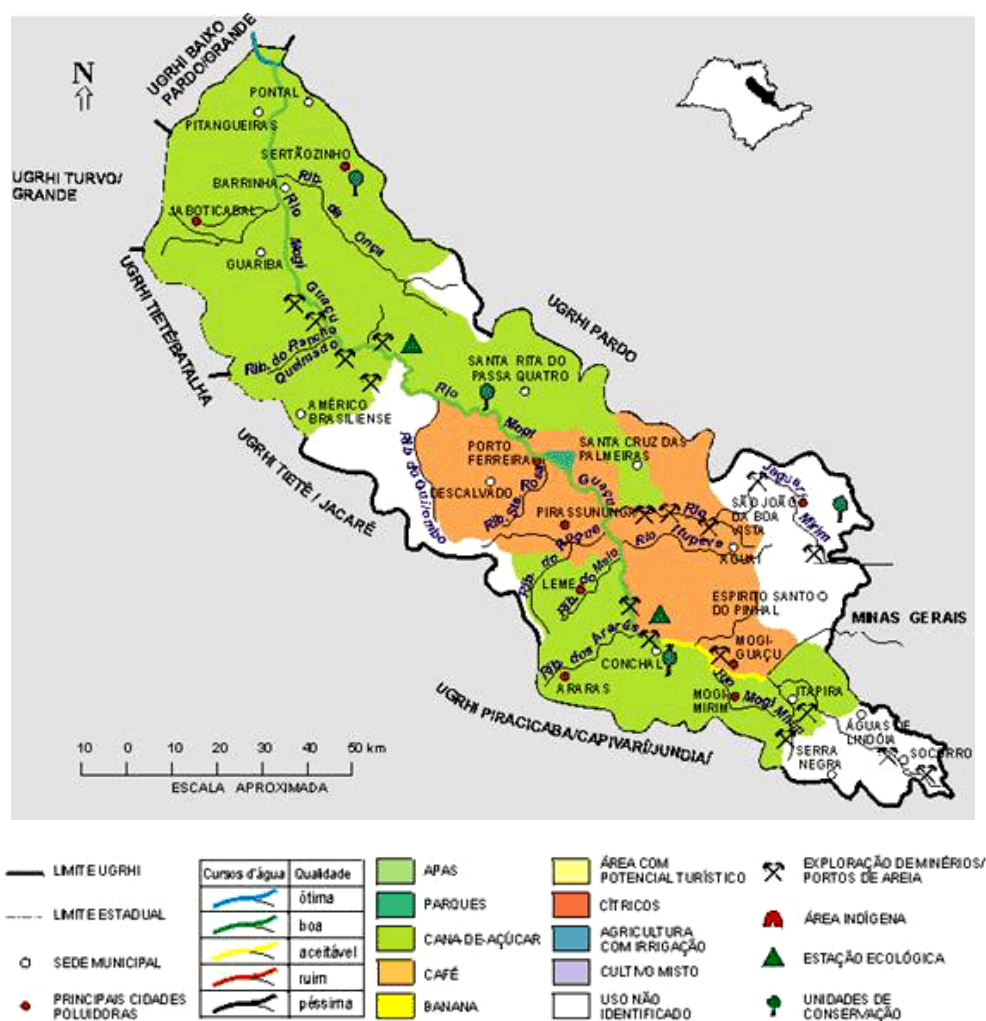


Figura 16 - Bacia Hidrográfica do Rio Mogi Guaçu. Fonte: Jaboticabal (2006).

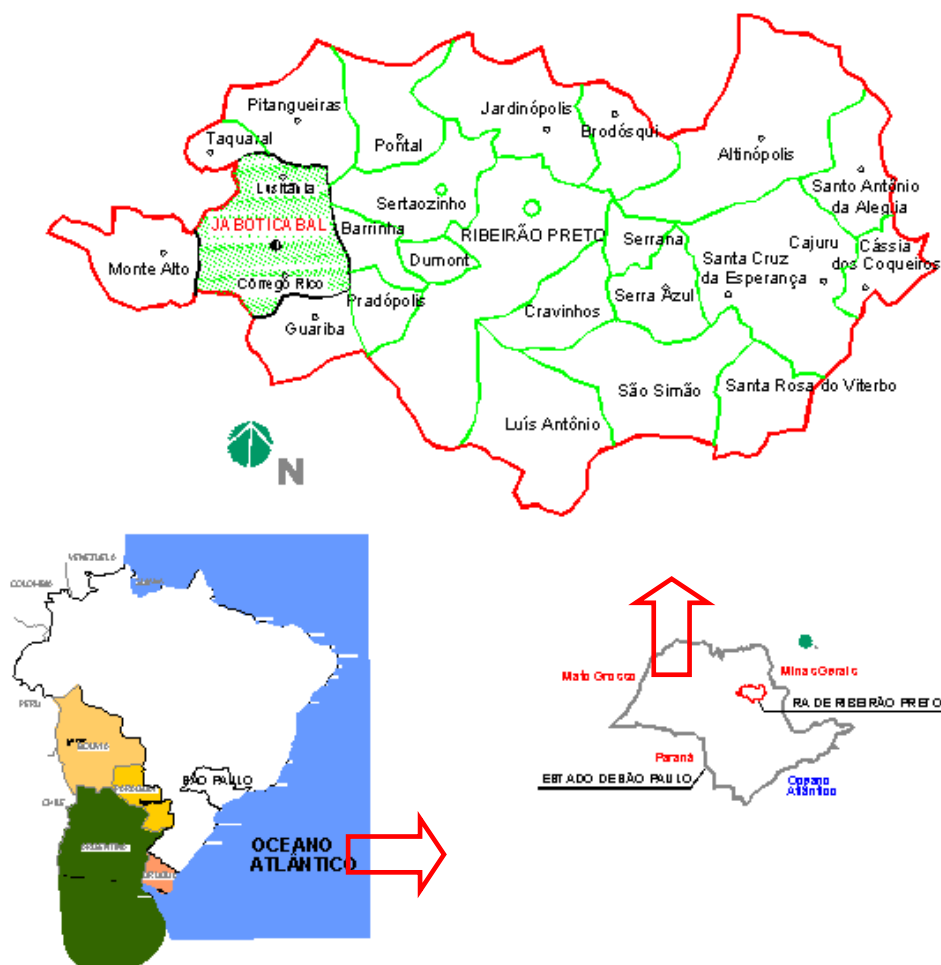


FIGURA 17 - Região Administrativa de Ribeirão Preto. Fonte: Jaboticabal (2006).

A seguir, é mostrado, na Figura 18, o regime hídrico do Córrego Rico, para o período entre maio/2002 e fevereiro/2003. Observa-se que os meses de maio/2002, janeiro/2003 e fevereiro/2003 apresentaram maior vazão, e os meses de junho/2002 a dezembro/2002 apresentaram vazões reduzidas devido à estiagem.

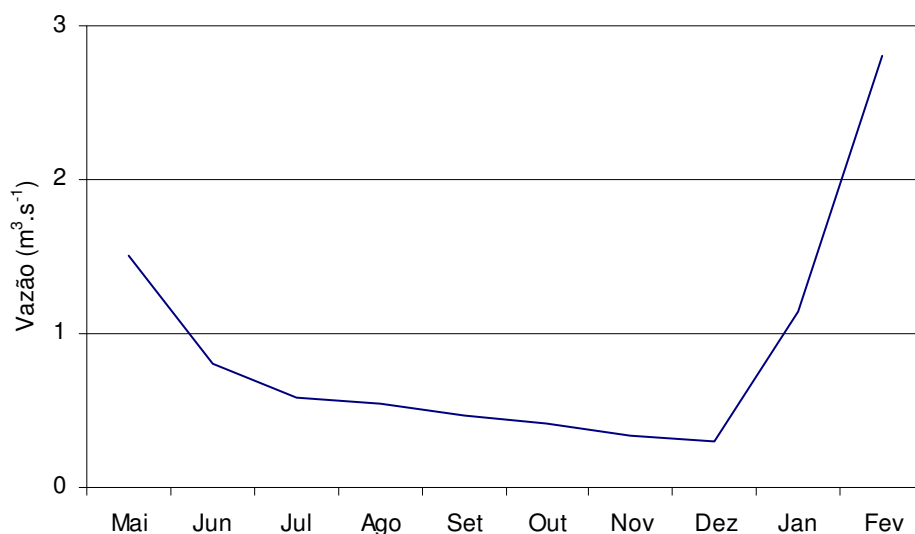


Figura 18 - Vazão do Córrego Rico no período de maio/2002 a fevereiro/2003, no ponto de captação de água de abastecimento. Fonte: Lopes et al. (2003).

A parcela da sub-bacia composta pelo município de Monte Alto possui solo arenoso (Argissolo Vermelho-Amarelo, PVA3 e 4) e a parcela composta pelo município de Jaboticabal, solo argiloso (Latosolo Vermelho, LV5 e 6) (ESCRITÓRIO DE DESENVOLVIMENTO RURAL, 2003).

O relevo do município de Monte Alto é ondulado a forte ondulado (PISSARRA, 2006). A ocupação e o uso do solo na parcela do município de Monte Alto consistem em pequenas propriedades com exploração diversificada, podendo-se encontrar, conforme observações em campo, horticultura, suinocultura e fruticultura, entre outras.

A maior propriedade que desenvolve a atividade de suinocultura está localizada entre os pontos de coleta CR1 (nascente) e CR2 (após área urbana de Monte Alto), conforme Figura 19. Essa propriedade possui cerca de 5.000 animais e efetua o tratamento do resíduo gerado por meio de três lagoas anaeróbias em série. O lançamento do resíduo gerado ocorre em afluente do Córrego Rico a montante do ponto CR2 (Figura 20).



Por meio da Figura 19, pode-se também observar a obra de construção da ETE que será responsável pelo tratamento de 60% dos esgotos domésticos de Monte Alto. O início da operação da ETE deu-se em setembro/2006.



Figura 19 - Localização das principais fontes de lançamento de esgoto entre os pontos de coleta CR1 e CR2, no município de Monte Alto - SP. Fonte: Google Earth (2006)a.



Figura 20 - Localização da suinocultura e do tratamento dos resíduos gerados lançados em afluente do Córrego Rico a montante do ponto de coleta CR2. Fonte: Google Earth (2006)b.

Em Jaboticabal, cujo relevo é suave ondulado, a cultura da cana-de-açúcar prevalece (73% da área) devido à facilidade da utilização de mecanização em tais condições; somente 8% da área é coberta por pastagens (GIACOMETTI & COSTA



JR., 2002). Nas pastagens, cerca de 79% da criação de animais dispõe o resíduo a céu aberto na propriedade.

Na área compreendida entre a divisa de Jaboticabal/Monte Alto e a captação de água em Jaboticabal, existem 92 propriedades rurais (GIACOMETTI & COSTA JR., 2002). De acordo com os autores, dessas, 33% não produzem esgoto, e as demais têm seus esgotos lançados em fossa séptica (56%), a céu aberto (7%) e nos córregos (4%).

## 6.2 Coleta, transporte e análise das amostras

Os pontos de coleta estavam localizados entre a nascente do Córrego Rico e a captação de água para abastecimento de Jaboticabal (CR1 - nascente; CR2 - após passagem pela área urbana do município de Monte Alto; CR3 - no ponto de captação de água para abastecimento, e PT4 - após passagem pela Estação de Tratamento de Água). Na Tabela 10, apresentam-se as coordenadas geográficas dos mesmos.

Tabela 10 - Localização, com coordenadas do Sistema de Projeção UTM<sup>(\*)</sup>, dos pontos de coleta no Córrego Rico, Jaboticabal - SP.

Ponto de coleta	Latitude (m)	Longitude (m)
CR1	7.645.027	757.006
CR2	7.641.048	764.645
CR3	7.641.118	777.648
PT4	7.646.719	777.227

(\*) Sistema de Projeção Cartográfica Universo Transverso de Mercator.

Para cada ponto de coleta, foram tomados 4 L de amostra em frasco de vidro âmbar. As amostras foram transportadas em caixa isotérmica contendo gelo não-reciclável e armazenadas sob proteção de luz até o momento da análise. Todas as

amostras foram processadas em intervalo menor que 24 horas do momento da coleta. Os pontos de coleta estão ilustrados na Figura 21.

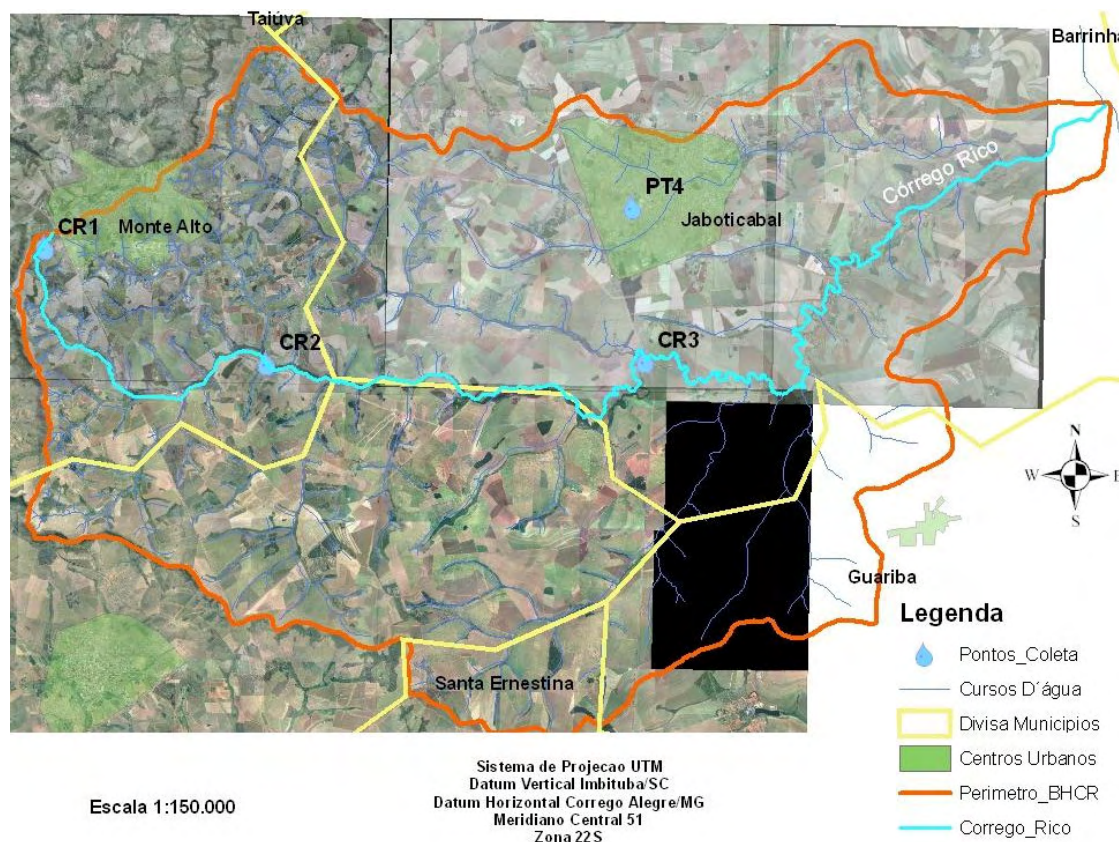


Figura 21 - Pontos de coleta na sub-bacia hidrográfica do Córrego Rico. Fonte: Amaral (2005). Elaborado com fotos cedidas pela CATI, Secretaria Estadual da Agricultura.

A seleção de tais pontos de coleta ocorreu pela possibilidade de avaliar:

- ✓ A presença de contaminantes na nascente;
- ✓ A contribuição do município de Monte Alto para o aporte desses contaminantes ao Córrego Rico, por comparação entre os pontos CR2 e CR1;
- ✓ A contribuição da área rural de Jaboticabal para o aporte desses contaminantes ao Córrego Rico, por comparação entre os pontos CR3 e CR2;
- ✓ A eficiência do processo de tratamento de água na remoção desses contaminantes, por comparação do PT4 e do CR3.

A seguir (Figura 22), é mostrado o ponto de coleta CR1, uma das principais nascentes do Córrego Rico, no município de Monte Alto - SP.



Figura 22 - Nascente do Córrego Rico utilizada para coleta (CR1).

Devido à variabilidade sazonal e horária dos analitos, para efetuar o planejamento amostral, primeiramente, foi realizada a contagem de coliformes fecais hora a hora, durante 24 horas. Na Figura 23, é apresentado o sistema utilizado para análise de coliformes fecais pela técnica de membrana filtrante (APHA, 1992) e a placa com as colônias referentes a um dos resultados de coliformes fecais (em azul). Para a análise, as amostras foram previamente diluídas 100 vezes com água peptonada a 0,1%.

A coleta foi realizada no ponto CR3 e mostrou diferentes aportes de coliformes fecais em 24 horas: das 0 as 6 horas, média de 833 UFC 100 mL<sup>-1</sup>; das 6 as 12 horas, 983 UFC 100 mL<sup>-1</sup>; das 12 as 18 horas, 1.467 UFC 100 mL<sup>-1</sup>, e das 18 as 24 horas, 1.567 UFC 100 mL<sup>-1</sup>. A maior contagem ocorreu no período das 17 às 21 horas e variou entre 1.500 e 2.200 UFC 100 mL<sup>-1</sup>. Dessa forma, optou-se por

efetuar a coleta na nascente (CR1) e no município de Monte Alto (CR2) entre 14 e 15 horas, no ponto de captação às 18 horas e na saída da Estação de Tratamento de Água, entre 23 e 24 horas. Esse escalonamento horário foi escolhido considerando-se a vazão estimada do Córrego Rico.

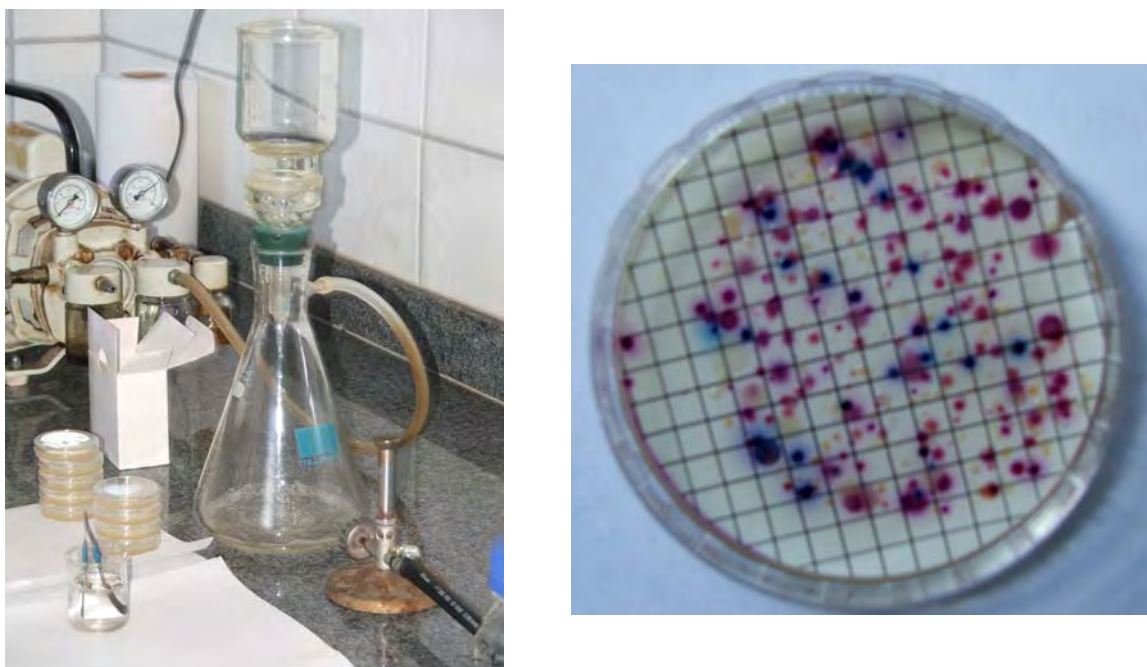


Figura 23 – Conjunto de filtração e resultado da análise da contagem de coliformes fecais no ponto de coleta CR3.

Quanto à Estação de Tratamento de Água que efetua o tratamento da água do Córrego Rico, esta utiliza tratamento convencional com as etapas: coagulação, floculação, decantação, filtração, cloração, fluoretação e correção de pH. O coagulante utilizado para floculação consiste em cloreto férrico líquido (solução comercial, 38% v/v) e o desinfetante usado para a desinfecção consiste em cloro gasoso ( $\text{Cl}_2$ ). Após o tratamento, a água recebe solução de orto e polifosfato de sódio para inibição de corrosão em redes de distribuição de ferro fundido, sendo encaminhada aos reservatórios. Na Figura 24, mostram-se algumas etapas do tratamento de água.



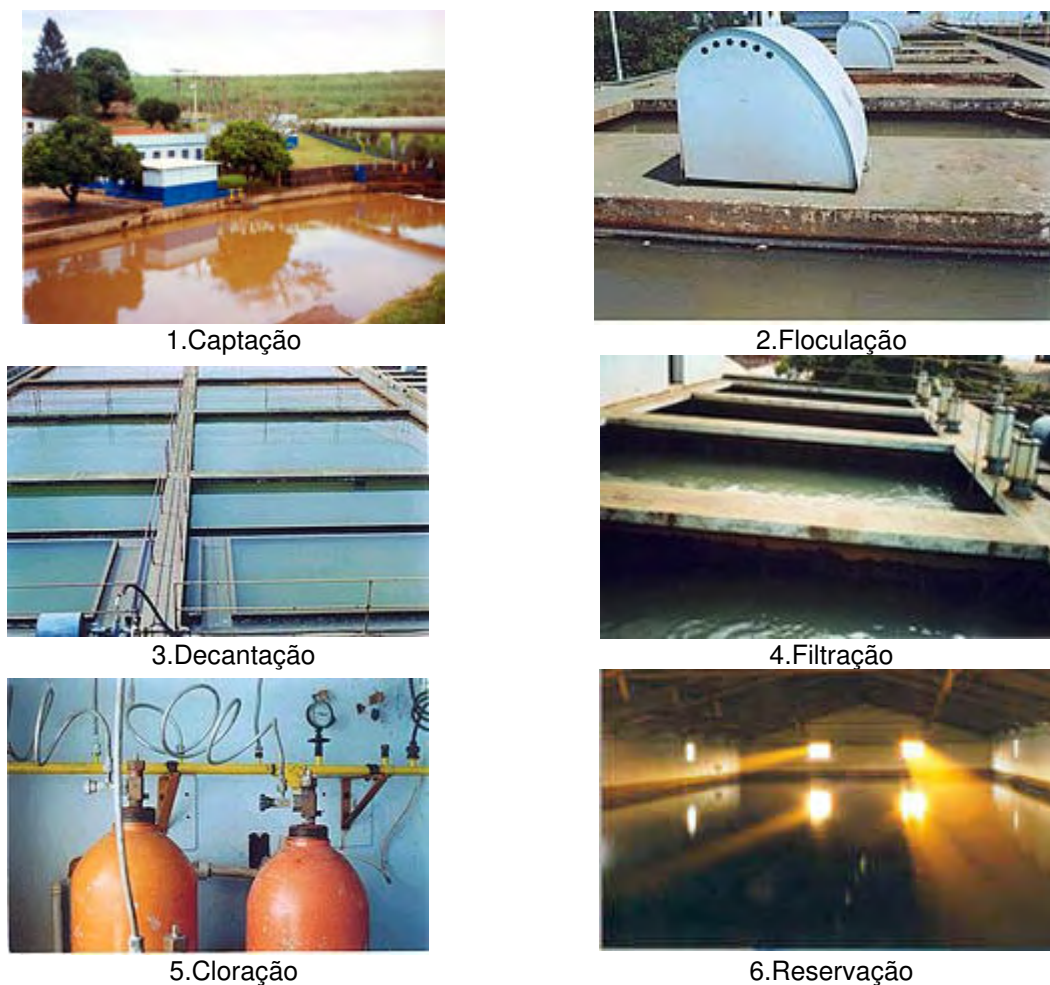


Figura 24 - Etapas do tratamento de água da ETA de Jaboticabal - SP.

Nos horários selecionados, houve coletas em período de cheia (março, outubro e novembro/2006) e em período de seca (agosto e setembro/2006). Para complementar as avaliações, foram realizadas análises de turbidez, pH, cor aparente e coliformes fecais (APHA, 1992). Realizou-se, também, análise de Carbono Orgânico Dissolvido, conforme descrito por Martini (2005), para carbono orgânico total, com filtração prévia em filtro com diâmetro de poro de  $0,45 \mu\text{m}$ .

Exceto para a coleta de agosto/2006, o ponto PT4 refere-se à amostra de água da saída da ETA e nessa também foi analisado o Cloro Residual Livre, pelo método colorimétrico (APHA, 1992). Na coleta de agosto/2006, o ponto PT4 refere-se à água apenas filtrada, sem adição de cal, cloro, ortopolifosfato de sódio e ácido fluorsilícico.

## IV RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 1 Seleção e otimização do sistema cromatográfico

Para a utilização de cromatografia líquida com detecção por UV (HPLC/UV), foram elaborados espectros de absorção para a obtenção do comprimento de onda cuja absorção é máxima. Os espectros são mostrados a seguir.

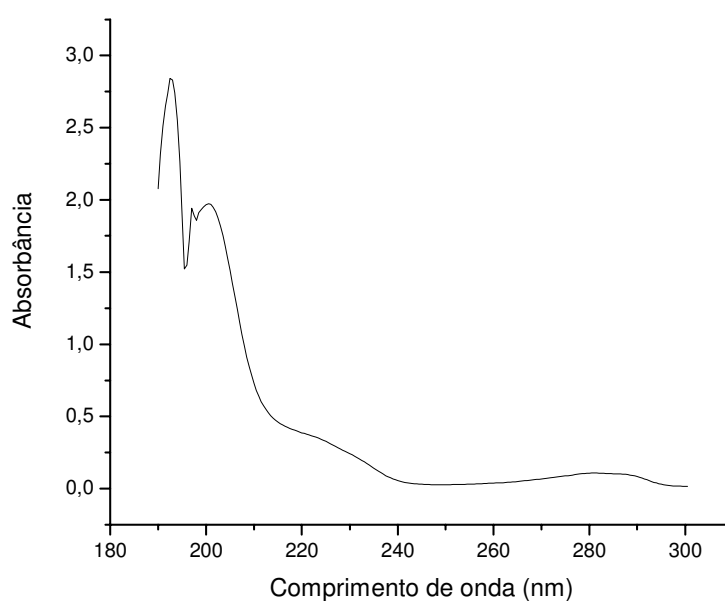


Figura 25 - Espectro de UV da Estrona (solvente: acetonitrila).

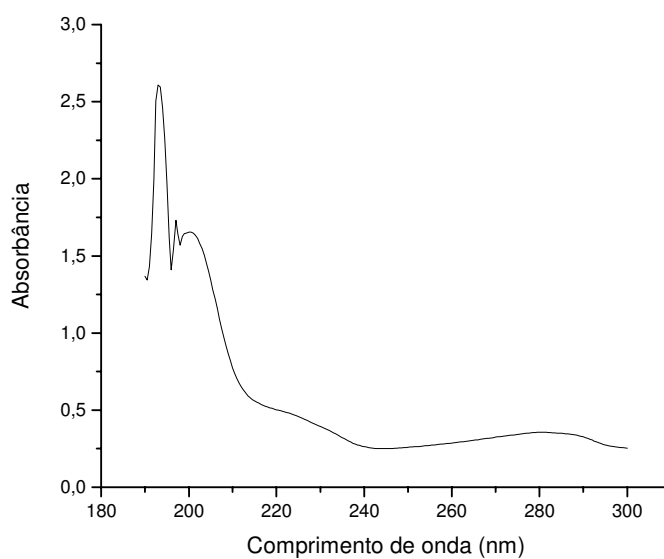


Figura 26 - Espectro de UV do 17  $\beta$  estradiol (solvente: acetonitrila).

Como podem ser observados nos espectros, a estrona e o 17  $\beta$  estradiol apresentam a absorção máxima em 281 nm, o qual, posteriormente, passou a ser utilizado para detecção no HPLC/UV.

Posteriormente, com a utilização do Sistema HPLC/UV, foram obtidas as curvas analíticas cujas características estão expressas na Tabela 11.

Tabela 11 - Equações da curva analítica, intervalo de trabalho, coeficientes de correlação e de variação do fator de resposta do sistema cromatográfico HPLC/UV.

Hormônios	Intervalo de trabalho ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Equação	Coefficiente de correlação ( $R^2$ )	Coefficiente de variação do fator de resposta (%)
Estrona	2,5 a 12,5	$Y = 32476 x - 4394$	0,999	4
17 $\beta$ estradiol	2,5 a 12,5	$Y = 30802 x - 4562$	0,999	4

Em que: Fator de resposta = Área / Concentração.

Observou-se relação linear satisfatória entre as concentrações dos hormônios e a resposta do detector, uma vez que os coeficientes de correlação se apresentaram próximos de 1.

No entanto, apesar de ter apresentado vantagens fundamentais para a confiabilidade analítica, tais como reprodutibilidade e linearidade, o sistema HPLC/UV não foi selecionado para a validação do método porque o intervalo de trabalho esteve acima do sistema HPLC/FLU.

Para o sistema HPLC/FLU, a avaliação baseou-se em adaptações do método publicado por SNYDER et al. (1999). Para a seleção dos comprimentos de onda a serem utilizados na detecção, foram elaborados espectros de emissão e excitação (Figuras 27 e 28), assim como espectros 3 D de fluorescência para o 17  $\beta$  estradiol e para a estrona (Figuras 29 e 30). Destaca-se que as Figuras 27 e 28 apresentam também os espectros do branco, ou seja, do solvente utilizado (acetonitrila).

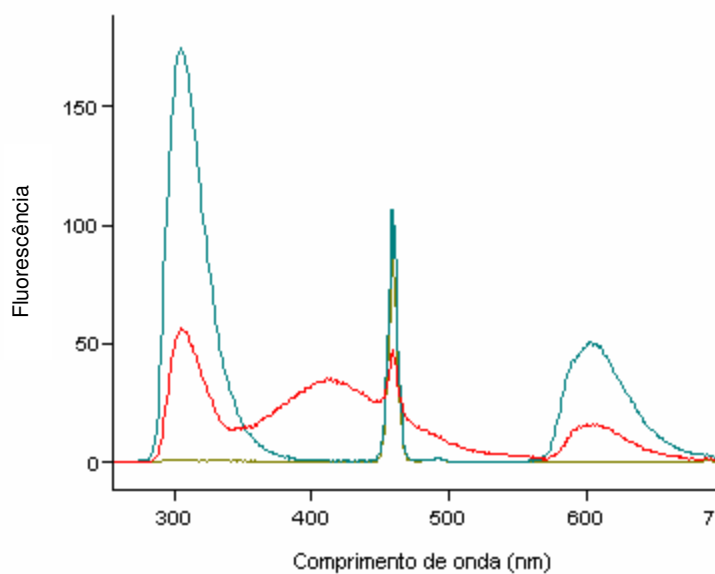


Figura 27 - Espectro de emissão de fluorescência após excitação em 229 nm (em que: estrona, linha vermelha; 17  $\beta$  estradiol, linha azul; solvente - acetonitrila, linha mostarda).

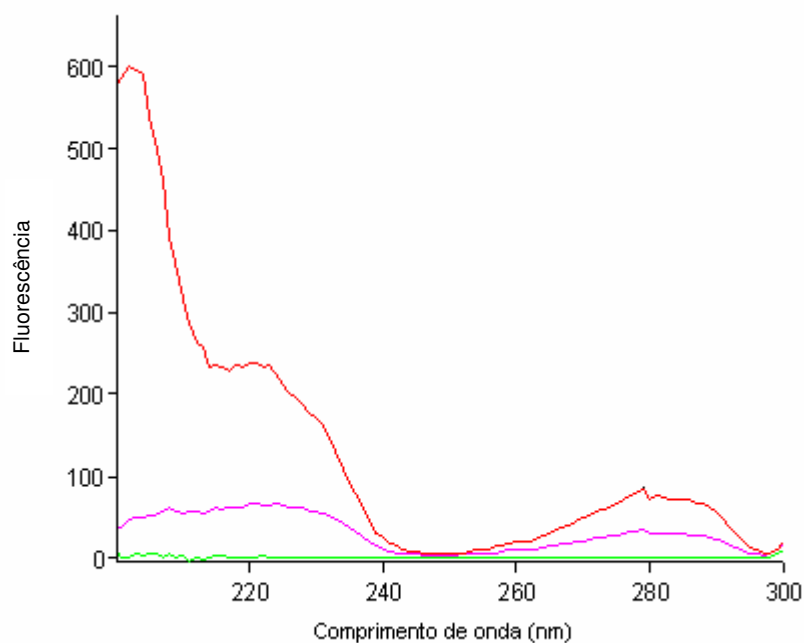


Figura 28 - Espectro de excitação com emissão de fluorescência em 305 nm (em que: 17  $\beta$  estradiol, linha vermelha; estrona, linha rosa; solvente - acetonitrila, linha verde).



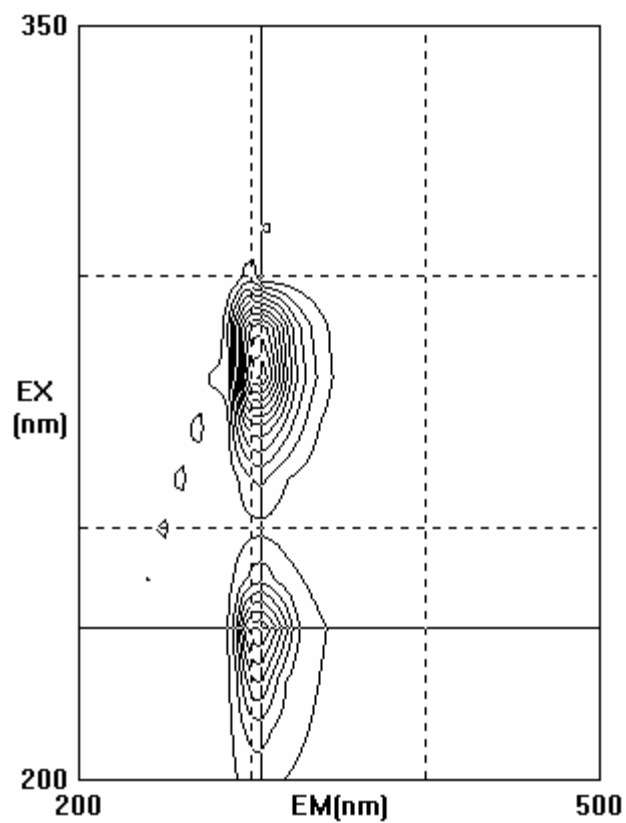


Figura 29 - Espectro de fluorescência 3 D de emissão e excitação do 17  $\beta$  estradiol (solvente: acetonitrila).

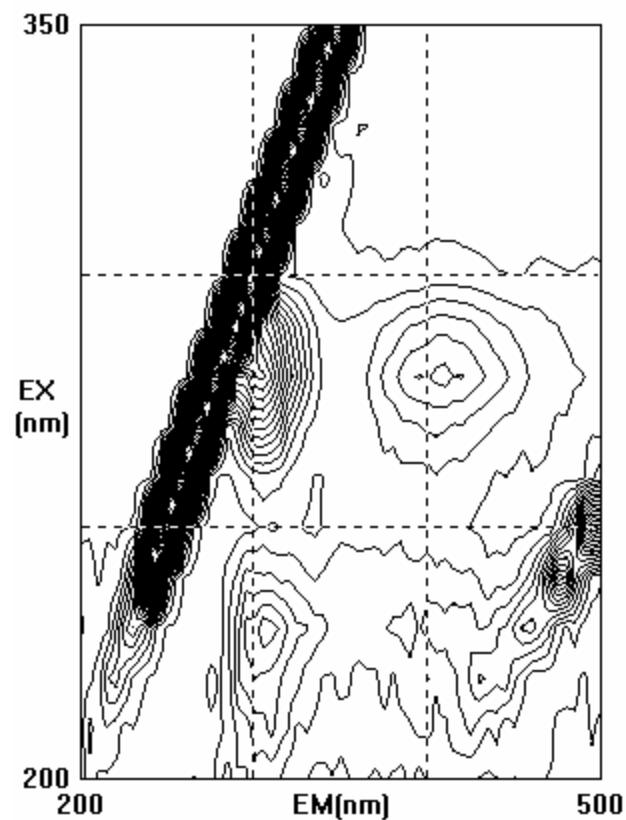


Figura 30 - Espectro de fluorescência 3 D de emissão e excitação da estrona (solvente: acetonitrila).

Pode-se observar na Figura 27 que os hormônios apresentam duas regiões de emissão, em 306 e em 600 nm. No entanto, para este estudo, foi selecionado o comprimento de emissão de 306 nm, pois o mesmo se destaca para os dois hormônios quando comparado à região de 600 nm.

Para a seleção do comprimento de onda de excitação, observou-se (Figuras 28, 29 e 30) a presença de duas regiões de excitação (230 e 280 nm). Na Figura 31, mostram-se duas corridas cromatográficas em condições de excitação distintas: 230 nm (excitação) x 306 nm (emissão) e 280 nm (excitação) x 306 nm (emissão). Com base nos resultados obtidos nas corridas cromatográficas, selecionou-se o comprimento de onda de 230 nm para excitação, pois o mesmo implica maior sensibilidade para os hormônios.

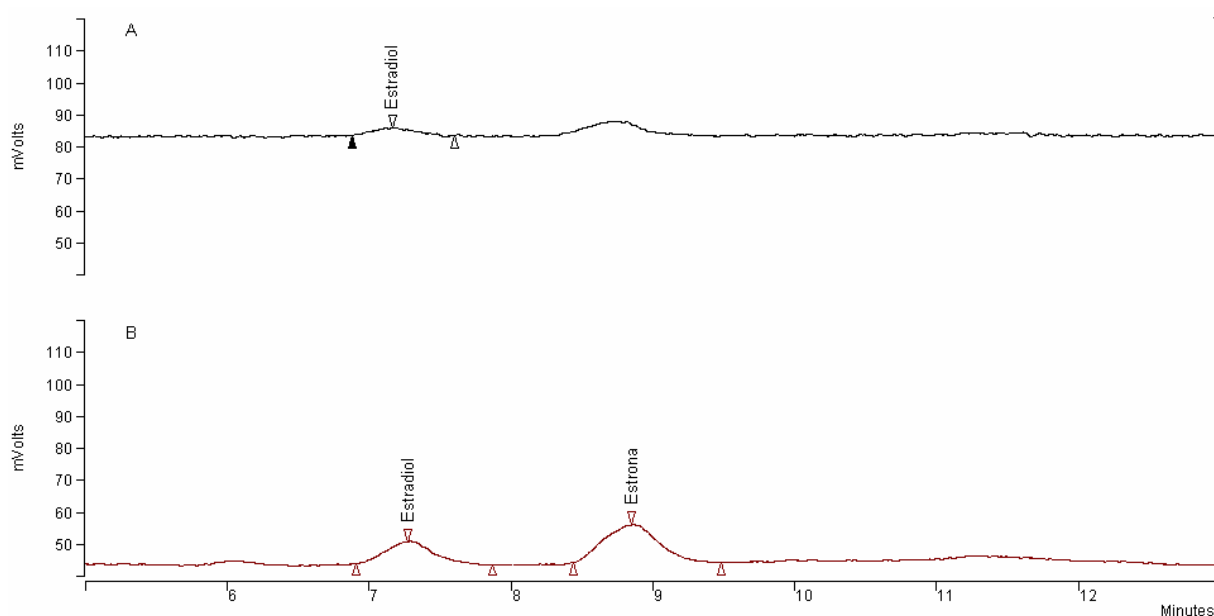


Figura 31 - Cromatograma dos hormônios estrogênicos com comprimento de excitação de 280 nm (A) e 230 nm (B). Condições: coluna C<sub>18</sub> PAH (250 mm de comprimento, 4,6 mm d.i., partículas 5 µm), volume de injeção de 20 µL, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, eluição isocrática H<sub>2</sub>O/ACN 1:1. Concentração: estrona, 1,0 mg L<sup>-1</sup>, 17 β estradiol, 12,5 µg L<sup>-1</sup>.

Tendo selecionado as condições ideais para a detecção, as misturas de hormônios foram injetadas no sistema HPLC/FLU, no qual se aplicou eluição

isocrática com H<sub>2</sub>O/ACN (1:1, v/v). A resolução obtida mostrou-se adequada, e a separação/detecção dos analitos ocorreu em tempo inferior a 10 minutos, conforme se pode observar na Figura 31.

Posteriormente, a faixa de trabalho e a linearidade do sistema foram obtidas por meio da curva analítica, as quais são apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Equações da curva analítica, intervalo de trabalho e coeficientes de correlação e de variação do fator de resposta do sistema cromatográfico HPLC/FLU.

Hormônios	Intervalo de trabalho (mg L <sup>-1</sup> )	Equação	Coefficiente de correlação (R <sup>2</sup> )	Coefficiente de variação do fator de resposta (%)
Estrona	1 a 10	$Y = 320024 x + 1279$	0,997	3
17 β estradiol	0,0125 a 0,1000	$Y = 1 \times 10^7 x + 8424$	0,999	4

Em que: Fator de resposta = Área / Concentração.

Por meio da obtenção de coeficiente de correlação próximo de 1, nota-se que a linearidade é satisfatória e acima do valor recomendado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 0,99 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

A principal vantagem apresentada pelo sistema HPLC/FLU consistiu na faixa de trabalho em regiões não atingidas pelos demais sistemas estudados (CG/MS e HPLC/UV), fato que se tornou o motivo pelo qual o desenvolvimento e a validação do método tivessem continuidade com esse sistema analítico.

São apresentados, na Tabela 13, os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o sistema cromatográfico HPLC/FLU.

Tabela 13 - Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) determinados experimentalmente para os hormônios para o sistema cromatográfico HPLC/FLU.

Hormônios	LD (mg L <sup>-1</sup> )	LQ (mg L <sup>-1</sup> )
Estrona	0,5	1,0
17 β estradiol	0,006	0,013

Destaca-se que as divergências existentes entre os limites de detecção e de quantificação da estrona e do 17  $\beta$  estradiol são referentes às diferentes intensidades de fluorescência desses hormônios.

## 2 Validação do método

Uma vez que o sistema cromatográfico foi selecionado, a continuidade do desenvolvimento do método deu-se através do estudo do preparo da amostra por meio de extração em fase sólida  $C_{18}$ .

Para otimizar as condições da extração, foram testadas condições disponíveis na literatura após fortificação de água subterrânea. Os resultados obtidos para a recuperação dos métodos avaliados são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Recuperações percentuais para os métodos de extração avaliados com água subterrânea.

Hormônio	Concentração de fortificação	Recuperação (%)		
		Método A	Método B	Método C
Estrona	8 $\mu\text{g L}^{-1}$	61	34	74
17 $\beta$ estradiol	74 $\text{ng L}^{-1}$	84	45	100

Considerando como critério de aceitação a recuperação compreendida entre 40 e 120% da concentração fortificada (BRITO et al., 2003), nota-se que o método C apresentou-se mais adequado.

Nas condições experimentais do método C, a extração não apresenta interferentes na região de eluição dos hormônios. A seguir, é mostrado um cromatograma do branco da extração (extração sem passagem de amostra) e dos padrões de 17  $\beta$  estradiol e de estrona.

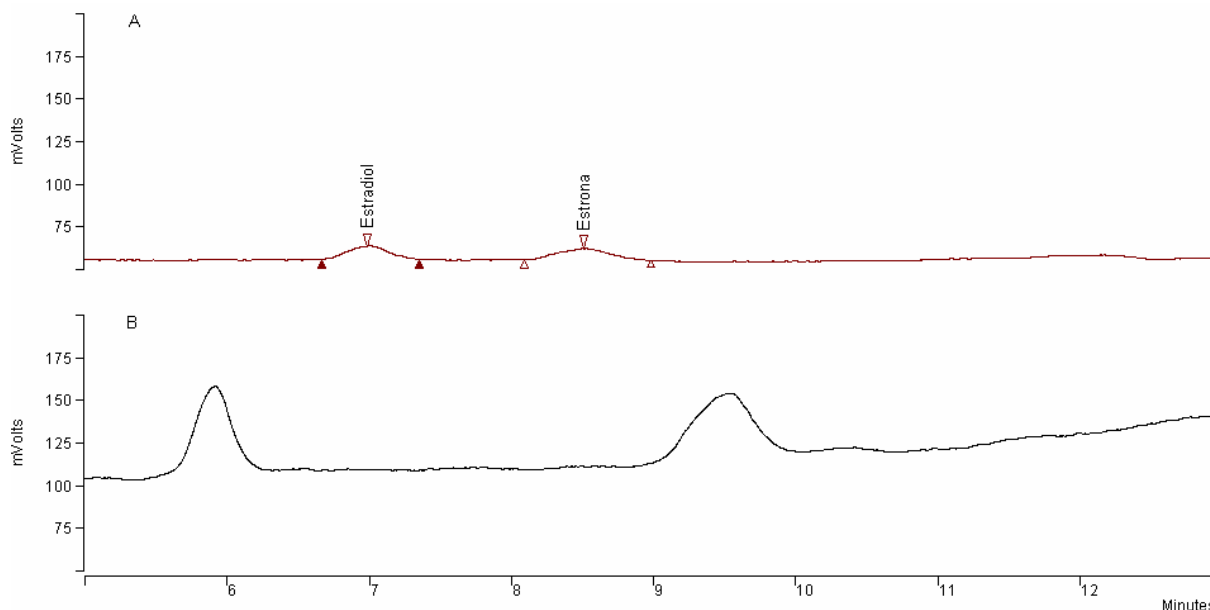


Figura 32 - Cromatograma referente aos padrões de 17  $\beta$  estradiol e estrona (A) e o branco da extração em fase sólida (B). Condições: coluna  $C_{18}$  PAH (250 mm de comprimento, 4,6 mm d.i., partículas 5  $\mu$ m), volume de injeção de 20  $\mu$ L, vazão de 1,0 mL  $\text{min}^{-1}$ , eluição isocrática  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  1:1. Concentração: estrona, 1,0  $\text{mg L}^{-1}$ , 17  $\beta$  estradiol, 12,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Em seguida, o método C foi submetido à avaliação da precisão e exatidão também com experimento de recuperação, em três concentrações distintas. Para cada nível, foram efetuadas três repetições, sendo os resultados apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Recuperações percentuais (intervalo e média), desvio-padrão e coeficiente de variação dos compostos analisados pelo método proposto.

Hormônio	Nível de Fortificação	Recuperação (%)			CV (%)
		Intervalo	Média	S	
Estrona ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	2	46 – 52	50	3	6
	8	80 – 90	84	4	5
	20	78 – 79	78	1	1
17 $\beta$ estradiol ( $\text{ng L}^{-1}$ )	50	89 – 105	96	7	7
	100	80 – 92	86	5	6
	200	80 – 84	82	2	2

s: Desvio-padrão.

CV: Coeficiente de Variação.

Diante da seleção das condições ideais para extração em fase sólida, a validação foi repetida para água superficial, com amostras do ponto CR3 (captação de água). Destaca-se que houve a necessidade de alterações para adequar o método a essa matriz. Entre essas, encontram-se o aumento do volume de amostra

para 1 L, a pré-filtração em filtros GF/C antes da extração em fase sólida e o *clean up* da amostra antes da eluição com 10 mL de solução H<sub>2</sub>O/MeOH (9:1, v/v), conforme mostrado na Figura 13.

Os resultados obtidos referentes ao ensaio de recuperação para água superficial com as alterações são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 - Recuperações percentuais (intervalo e média), desvio-padrão e coeficiente de variação dos compostos analisados pelo método proposto para água superficial.

Hormônio	Nível de Fortificação	Recuperação (%)			CV (%)
		Intervalo	Média	S	
Estrona ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0,6	69 – 100	85	16	18
	1,5	97 – 103	99	3	3
	5,0	80 – 98	89	9	10
17 $\beta$ estradiol ( $\text{ng L}^{-1}$ )	7,5	119 – 139	128	11	8
	30,0	91 – 97	93	3	3
	50,0	83 – 108	96	13	13

s: Desvio-padrão.

CV: Coeficiente de Variação.

A seguir, é apresentado cromatograma referente a um dos ensaios de recuperação efetuados para água superficial juntamente com a amostra-testemunha (não-fortificada com os padrões).

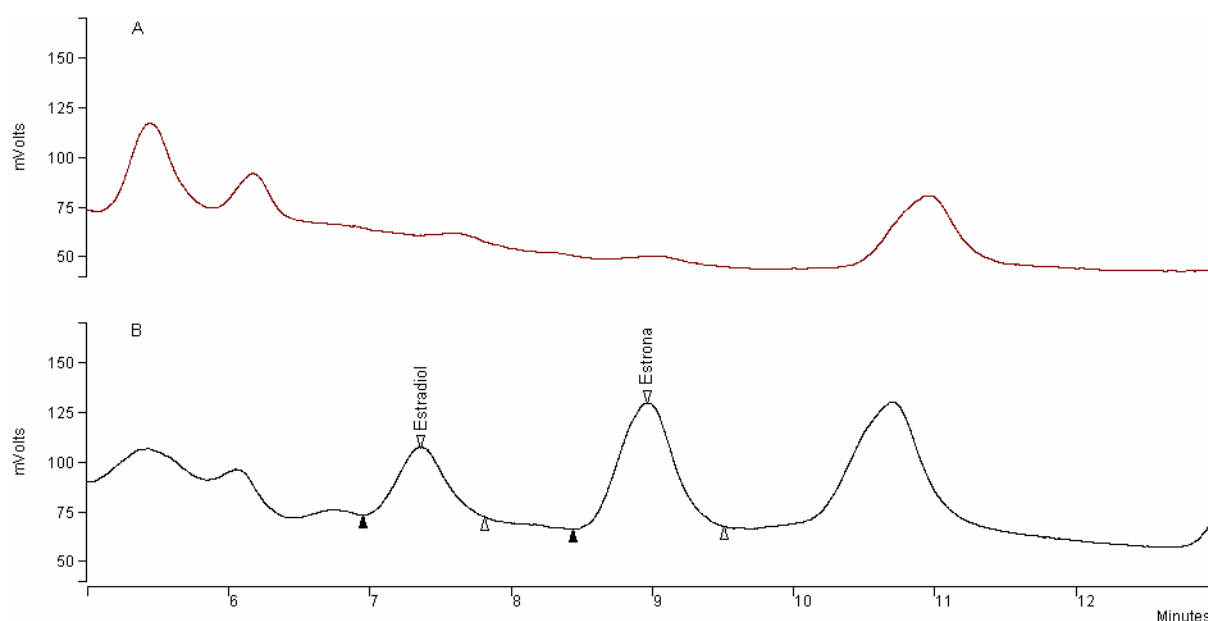


Figura 33 - Cromatogramas referentes ao ensaio de recuperação de água superficial; amostra testemunha não-fortificada (A) e amostra fortificada (B). Condições: coluna C<sub>18</sub> PAH (250 mm de comprimento, 4,6 mm d.i., partículas 5  $\mu\text{m}$ ), volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ , fluxo de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ , eluição isocrática H<sub>2</sub>O/ACN 1:1. Concentração: estrona, 1,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , 17  $\beta$  estradiol, 30  $\text{ng L}^{-1}$ .

Os resultados obtidos para a validação foram considerados satisfatórios, de acordo com os critérios adotados de 40 a 120% para a recuperação e de 45% de coeficiente de variação para a precisão (BRITO et al., 2003).

Após a validação empregando água superficial, foram feitas tentativas para a validação em água potável. O cromatograma (Figura 34) apresenta os resultados obtidos na recuperação do nível médio para água potável (A) e para água superficial (B).

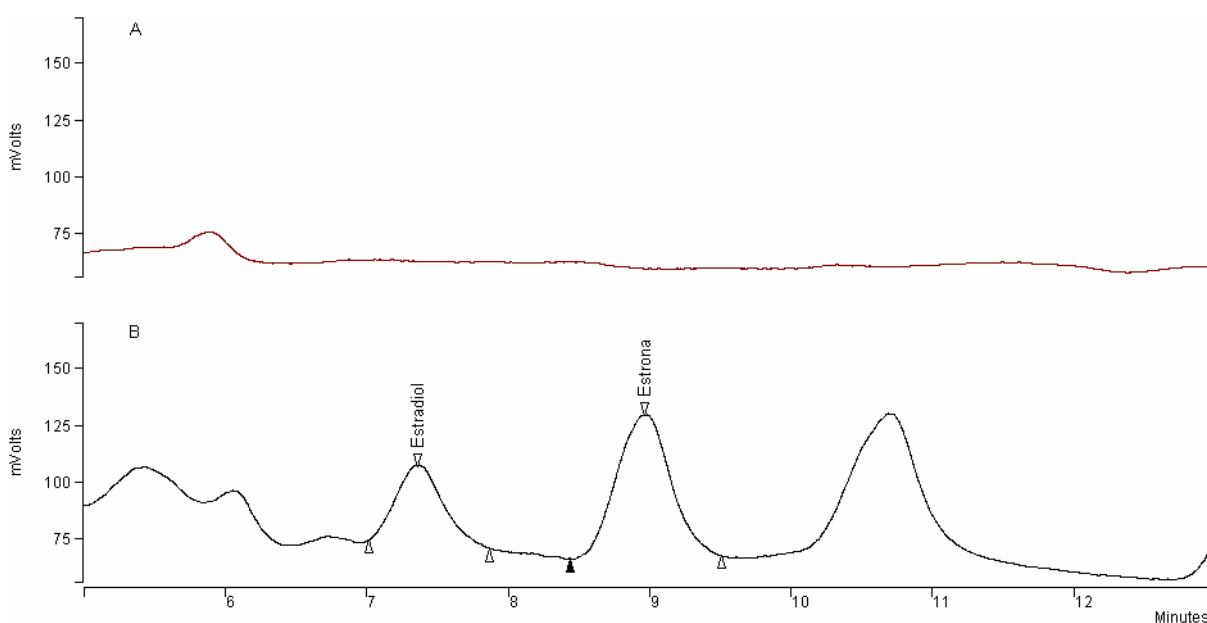


Figura 34 - Cromatogramas referentes ao estudo de recuperação no nível médio para água potável (A) e água superficial (B). Condições: coluna C<sub>18</sub> PAH (250 mm de comprimento, 4,6 mm d.i., partículas 5  $\mu$ m), volume de injeção de 20  $\mu$ L, vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, eluição isocrática H<sub>2</sub>O/ACN 1:1. Concentração: estrona, 1,5  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, 17  $\beta$  estradiol, 30,0 ng L<sup>-1</sup>.

O método proposto para água superficial não apresenta desempenho satisfatório quando aplicado à água potável, ou seja, a recuperação encontra-se menor que 40%. Diante do fato de que a água recebe várias substâncias químicas após a filtração (cal hidratada, ortopolifosfato de sódio, ácido fluorsilícico e cloro), uma ou mais dessas substâncias quando presentes na água poderiam interagir com

o padrão utilizado na fortificação. Os efeitos dessas substâncias na recuperação foram estudados separadamente, e os resultados são mostrados na Tabela 17, para o 17  $\beta$  estradiol, e na Tabela 18, para a estrona.

Tabela 17 - Resultados referentes ao ensaio de recuperação de 17  $\beta$  estradiol nas etapas pós-filtração do tratamento de água convencional.

Etapa	Recuperação (%)			
	Sem <i>aging</i>		Com <i>aging</i>	
	Sem tratamento	Com tratamento	Sem tratamento	Com tratamento
Desinfecção	98	< 40	74	< 40
Fluoretação	-	58	111	81
Inibição de corrosão	95	99	181	105
Correção de pH	84	69	93	74

Tabela 18 - Resultados referentes ao ensaio de recuperação de estrona nas etapas pós-filtração do tratamento de água convencional.

Etapa	Recuperação (%)			
	Sem <i>aging</i>		Com <i>aging</i>	
	Sem tratamento	Com tratamento	Sem tratamento	Com tratamento
Desinfecção	114	< 40	126	< 40
Fluoretação	-	73	85	86
Inibição de corrosão	85	126	107	86
Correção de pH	111	88	106	92

Por meio das Tabelas 17 e 18, observa-se que, dentre os produtos adicionados à água potável, o cloro da etapa de desinfecção contribui de forma significativa para não-concordância com o critério de recuperação mínimo de 40%.

A seguir, na Figura 35, apresentam-se os resultados da análise pelo método proposto, imediatamente após a fortificação de água filtrada contendo cloro. Na Figura 36, visualiza-se a análise de amostra similar a da Figura 35, a qual foi mantida em repouso durante 4 horas (*aging*), ao abrigo da luz, com refrigeração.



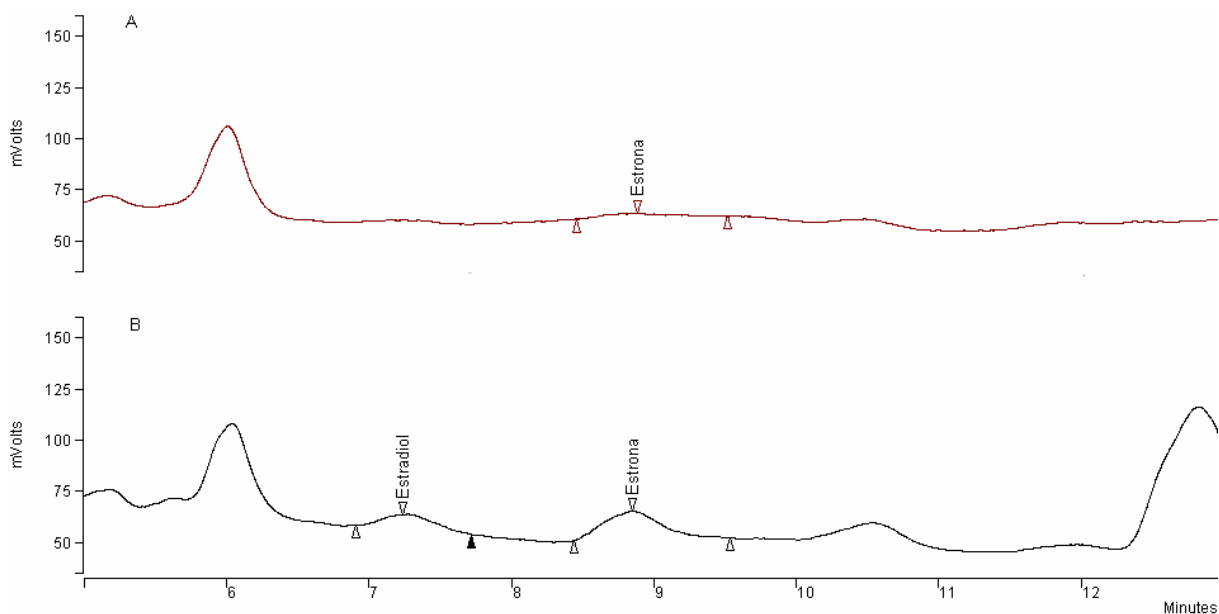


Figura 35 - Extração sem *aging* de amostra de água filtrada fortificada da ETA de Jaboticabal - SP, sem cloro (B) e com  $1,4 \text{ mg L}^{-1}$  de cloro residual livre (A). Condições: coluna  $\text{C}_{18}$  PAH (250 mm de comprimento, 4,6 mm d.i., partículas  $5 \mu\text{m}$ ), volume de injeção de  $20 \mu\text{L}$ , vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , eluição isocrática  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  1:1. Concentração: estrona,  $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $17 \beta$  estradiol,  $7,5 \text{ ng L}^{-1}$ .

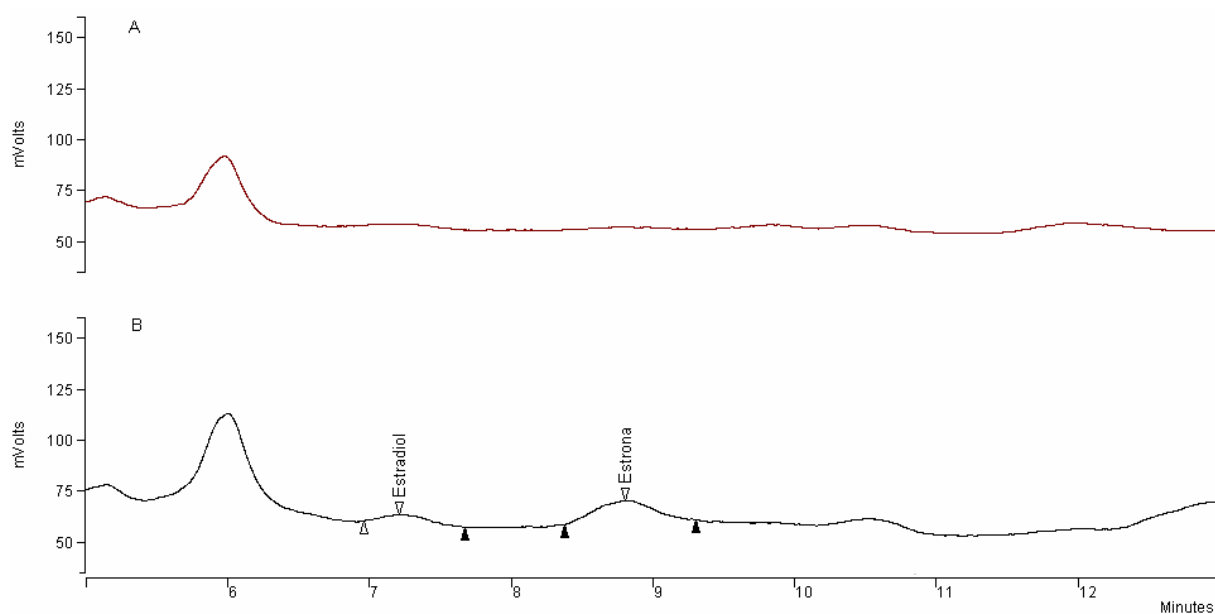


Figura 36 - Extração com *aging* de amostra de água filtrada fortificada da ETA de Jaboticabal - SP, sem cloro (B) e com  $1,4 \text{ mg L}^{-1}$  de cloro residual livre (A). Condições: coluna  $\text{C}_{18}$  PAH (250 mm de comprimento, 4,6 mm d.i., partículas  $5 \mu\text{m}$ ), volume de injeção de  $20 \mu\text{L}$ , vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , eluição isocrática  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  1:1. Concentração: estrona,  $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $17 \beta$  estradiol,  $7,5 \text{ ng L}^{-1}$ .

Os resultados apresentados nas Tabelas 17 e 18, assim como das Figuras 35 e 36 mostram que a reação entre o 17  $\beta$  estradiol e a estrona ocorre rapidamente após o contato, pois mesmo na análise imediata não foi possível observar a recuperação esperada. Esse fato mostra também a importância da etapa de desinfecção no processo convencional de tratamento de água para a remoção das substâncias quando presentes.

De acordo com Huber (2005), os agentes desinfetantes, dióxido de cloro e cloro gasoso, reagem primariamente com grupos funcionais ricos em elétrons, como fenóis e aminas, portanto são efetivos na oxidação de estrogênios quando aplicados no tratamento de água. Diante da observação dos autores, espera-se que tais reações de oxidação resultem em produtos onde o anel A (Figura 3), responsável pela atividade estrogênica, esteja ausente.

Diante do exposto sobre a ação do cloro nos hormônios adicionados à água potável para a validação do método aplicável a essa matriz, prosseguiu-se com a validação utilizando somente água filtrada da ETA de Jaboticabal, cujos resultados são expressos na Tabela 19.

Tabela 19 - Recuperações percentuais (intervalo e média), desvio-padrão e coeficiente de variação dos compostos analisados pelo método proposto para água filtrada.

Hormônio	Nível de Fortificação	Recuperação (%)			CV (%)
		Intervalo	Média	s	
Estrona ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0,6	82 – 90	85	5	6
	1,5	80 – 89	83	4	5
	5,0	89 – 97	92	4	5
17 $\beta$ estradiol ( $\text{ng L}^{-1}$ )	7,5	66 – 107	86	21	24
	30,0	86 – 105	93	8	9
	50,0	82 – 91	86	5	5

s: Desvio-padrão.

CV: Coeficiente de Variação.

Os resultados obtidos para a validação de água filtrada foram considerados satisfatórios, de acordo com os critérios adotados de 40 a 120% para a recuperação e de 45% de coeficiente de variação para a precisão (BRITO et al., 2003).

Em seguida, são apresentados, na Tabela 20, os limites de quantificação do método observados experimentalmente.

Tabela 20 - Limite de quantificação (LQ) determinado experimentalmente para os hormônios para o método proposto para água superficial e filtrada.

Hormônios	LQ
Estrona ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0,6
17 $\beta$ estradiol ( $\text{ng L}^{-1}$ )	7,5

O limite de quantificação se encontra próximo da menor concentração a apresentar efeito biológico para estrona e 17  $\beta$  estradiol, a qual consiste em  $10 \text{ ng L}^{-1}$  (BAREL-COHEN et al., 2006). O LQ de  $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$  da estrona apresentou-se acima do valor obtido para o 17  $\beta$  estradiol devido à limitação da sensibilidade do detector à estrona, que apresenta menor fluorescência.

Na determinação do limite de detecção, utilizando-se do método visual (RIBANI et al. 2004), pode-se observar que é possível a análise qualitativa desde que a concentração no extrato final esteja acima de  $0,006 \mu\text{g L}^{-1}$  para o 17  $\beta$  estradiol (correspondendo a  $3,8 \text{ ng L}^{-1}$  na amostra) e de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de estrona (correspondendo a  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$  na amostra). Sendo assim, consideraram-se  $3,8 \text{ ng L}^{-1}$  e  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$  como sendo os limites de detecção para o 17  $\beta$  estradiol e para a estrona, respectivamente.

Destaca-se que os limites de detecção obtidos estão em concentrações menores que as apresentadas pelos métodos baseados em HPLC/FLU descritos na literatura e expressos nas Tabelas 3 e 7.

### 3 Estudo de caso aplicado ao sistema de abastecimento de Jaboticabal - SP

Os resultados obtidos para as coletas do período de cheia (março, outubro e novembro) e do período de seca (agosto e setembro) do ano de 2006 estão expressos na Tabela 21. Os cromatogramas referentes às coletas são mostrados no Anexo A (1 a 9), e a precipitação pluviométrica referente ao período em questão, no Anexo B. Os resultados para 17  $\beta$  estradiol não foram expressos para amostras de março/2006, pois, na ocasião, o método proposto não apresentava seletividade satisfatória na região de eluição desse hormônio.

Observa-se, por meio da Tabela 21, que o 17  $\beta$  estradiol esteve presente em concentração quantificável no ponto CR1, que compreende uma das nascentes do Córrego Rico. Tal presença ocorreu em amostras coletadas nos meses de agosto e setembro/2006, considerado período de seca no presente estudo.

A avaliação do local e do histórico de uso e ocupação da área leva a algumas considerações a respeito. Primeiramente, o relevo fortemente ondulado da região é impróprio para a agricultura mecanizada, o que fez com que, historicamente, a área fosse explorada com criação de gado. Até 1998, a nascente (CR1) era utilizada como bebedouro dos animais. Essa prática promoveu o depósito de resíduos animais ao redor da nascente durante muitos anos, e a extensão da influência desse fato na qualidade da água do subsolo não pode ser avaliada pela ausência de histórico de análise de água para tal fonte.

Tabela 21 - Resultados de parâmetros indicadores de qualidade de água e concentração de estrona e 17  $\beta$  estradiol nas coletas efetuadas em 2006 na sub-bacia hidrográfica do Córrego Rico, em Jaboticabal e Monte Alto - SP. Localização dos pontos - Figura 21.

Data	PH	Cor aparente (uH)	Turbidez (uT)	CRL (mg L <sup>-1</sup> )	COD (mg L <sup>-1</sup> )	<i>E. coli</i> (UFC 100 mL <sup>-1</sup> )	17 $\beta$ estradiol (ng L <sup>-1</sup> )	Estrona ( $\mu$ g L <sup>-1</sup> )
<b>CR1</b>								
24-03	6,11	< 1	0,2	-	3,61	86	-	ND
27-03	5,99	< 1	0,2	-	4,87	< 1	-	ND
29-08	6,29	3	0,1	-	-	< 1	16,0	ND
13-09	6,46	< 1	0,1	-	< 1,22	< 1	ND	ND
28-09	6,75	< 1	0,2	-	< 1,22	18	30,6	< LQ
16-10	6,66	< 1	0,2	-	2,50	< 1	ND	ND
30-10	6,73	< 1	0,2	-	4,58	< 1	ND	ND
16-11	7,20	< 1	0,1	-	1,23	< 1	ND	ND
22-11	6,69	< 1	0,5	-	2,26	< 1	ND	ND
<b>CR2</b>								
24-03	6,80	381	52,1	-	7,30	2500	-	0,6
27-03	6,79	185	24,8	-	5,67	900	-	ND
29-08	7,34	81	7,6	-	-	468	ND	ND
13-09	7,38	75	7,1	-	3,39	70	ND	ND
28-09	7,82	208	14,5	-	6,56	1700	ND	ND
16-10	7,65	165	21,7	-	5,65	310	ND	ND
30-10	7,67	214	25,9	-	11,70	183	ND	ND
16-11	7,78	154	16,8	-	5,18	92	10,2	ND
22-11	7,67	143	15,8	-	6,51	184	8,6	ND
<b>CR3</b>								
24-03	6,80	485	71,0	-	7,61	3500	-	ND
27-03	6,94	225	29,1	-	5,74	2000	-	ND
29-08	6,96	71	8,4	-	-	900	ND	ND
13-09	7,24	57	6,2	-	1,93	120	ND	ND
28-09	7,63	72	9,6	-	1,98	180	25,8	ND
16-10	7,61	103	15,6	-	6,55	200	ND	ND
30-10	7,80	155	20,6	-	7,58	265	ND	ND
16-11	7,71	164	24,8	-	-	120	ND	ND
22-11	7,66	188	30,5	-	4,83	173	ND	ND
<b>PT4</b>								
24-03	6,12	< 1	0,2	0,85	< 1,22	4	-	ND
27-03	8,09	< 1	0,5	0,61	2,02	1	-	ND
29-08	6,67	1	0,1	-	-	2	ND	ND
13-09	7,50	< 1	0,1	1,20	< 1,22	< 1	ND	ND
28-09	6,99	< 1	0,3	1,82	< 1,22	< 1	6,8	ND
16-10	7,06	< 1	0,3	1,45	3,82	< 1	ND	ND
30-10	7,23	< 1	0,1	1,48	6,48	< 1	ND	ND
16-11	7,38	< 1	0,2	1,58	1,31	< 1	ND	ND
22-11	7,18	1	0,3	1,21	2,86	< 1	ND	ND

LQ, limite de quantificação (0,6  $\mu$ g L<sup>-1</sup> para Estrona e 7,5 ng L<sup>-1</sup> para 17  $\beta$  estradiol).

UFC, Unidade Formadora de Colônia.

- Não analisado.

ND, não-detectado.

uH, unidade Hazen.

uT, unidade de turbidez.

Em estudo conduzido entre os anos de 2004 e 2005, nitrato, indicador da presença de fertilizantes orgânicos ou inorgânicos em água, esteve presente em maior quantidade nas amostras do ponto de coleta CR1 do que em outros pontos ao

longo do Córrego Rico (CR2 e CR3), conforme mostrado na Figura 37. Tais observações confirmam a vulnerabilidade dessa fonte.

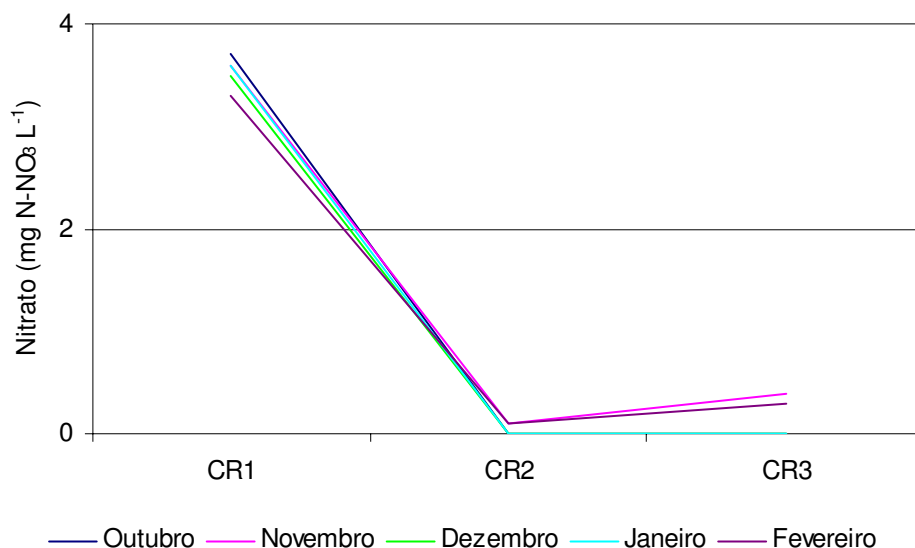


Figura 37 - Concentrações de nitrato nas amostras de água da nascente (CR1) à captação de água (CR3), no período de outubro/2004 a fevereiro/2005. Fonte: Amaral (2005).

Após a suspensão da utilização da nascente como bebedouro animal no ano de 1998, a área foi isolada e vem sendo recomposta. No entanto, no período em questão (2006), houve a implantação de horticultura em área próxima à nascente que foi acompanhada novamente da utilização de resíduos animais como fertilizante. O histórico de uso e ocupação do solo, associado ao relevo fortemente ondulado e ao tipo de solo (arenoso), contribuiu para a presença de hormônios  $17\beta$  estradiol e estrona no ponto CR1.

Os níveis de  $17\beta$  estradiol em amostras da nascente referente ao ponto CR1 (Tabela 22) estão de acordo com as concentrações apresentadas em nascentes (6 a  $66\text{ ng L}^{-1}$ ) de região de criação de gado no Arkansas, conforme Peterson (2000).

Tabela 22 - Concentrações de estrogênios obtidas neste estudo para o sistema de abastecimento de Jaboticabal - SP, e em estudos descritos na literatura.

Ponto de coleta	17 $\beta$ Estradiol			Estrona		
	Este estudo	Outros estudos		Este estudo	Outros estudos	
Nascente	16,0 - 30,6	6 – 66	EUA <sup>a</sup>	< 600		
	8,6 - 25,8	6.700	Brasil <sup>b</sup>	600	0,3	Holanda <sup>c</sup>
Água superficial		< 0,3	EUA <sup>d</sup>		4.800	Brasil <sup>b</sup>
		< 2,5	Espanha <sup>e</sup>		< 0,1	EUA <sup>d</sup>
		3,6	Alemanha <sup>f</sup>		22	Espanha <sup>e</sup>
					4,1	Alemanha <sup>f</sup>
Água potável	6,8	5.600	Brasil <sup>b</sup>	ND	< 1.059	Brasil <sup>b</sup>
		< 0,3	EUA <sup>d</sup>		< 0,1	EUA <sup>d</sup>
		< 2,5	Espanha <sup>e</sup>		< 2,5	Espanha <sup>e</sup>
		2,1	Alemanha <sup>f</sup>		0,60	Alemanha <sup>f</sup>

<sup>a</sup> Peterson et al. (2000); <sup>b</sup> Ghiselli (2006), Campinas - SP; <sup>c</sup> Belfroid et al. (1999); <sup>d</sup> Boyd et al. (2003); <sup>e</sup> Rodriguez-Mozaz et al. (2004); <sup>f</sup> Kuch & Ballschmiter (2001); ND - não-detectado.

A estrona esteve presente na amostra coletada no período chuvoso no ponto CR2. Esta amostra apresentou coincidente aumento de turbidez, cor aparente e *Escherichia coli*. Tal fato é atribuído ao escoamento superficial de áreas de criação animal. A presença de estrona em amostra de água superficial na concentração de 0,6  $\mu\text{g L}^{-1}$  esteve acima do valor observado em amostras para a Holanda, onde a estrona foi encontrada na concentração de 0,3  $\text{ng L}^{-1}$  por Belfroid et al. (1999). No entanto, esse valor está abaixo da concentração encontrada em amostra do Rio Atibaia, responsável por 95% do abastecimento do município de Campinas, que foi de 4.800  $\text{ng L}^{-1}$  (GHISELLI, 2006). Outros resultados descritos na literatura para a presença de estrona em águas superficiais são mostrados na Tabela 22.

Nas amostras coletadas em novembro de 2006, observou-se a presença de 17  $\beta$  estradiol no ponto CR2. Nesse caso, a presença de 17  $\beta$  estradiol é atribuída ao aumento do lançamento de esgoto tratado da ETE de Monte Alto. As concentrações encontradas (10,2 e 8,6  $\text{ng L}^{-1}$ ) estão abaixo daquelas do Rio Atibaia (6.700  $\text{ng L}^{-1}$ ), conforme GHISELLI (2006), mostradas na Tabela 22, e próximas à concentração mínima a apresentar efeito endócrino de 10  $\text{ng L}^{-1}$  (BAREL-COHEN et al., 2006).

As concentrações encontradas para 17  $\beta$  estradiol no ponto CR2 do Córrego Rico são coerentes com a concentração no esgoto doméstico bruto do município de Araraquara, encontrado em 31 ng L<sup>-1</sup> (ARAÚJO, 2006).

Para o ponto CR3, observou-se a presença de 17  $\beta$  estradiol em apenas uma das amostras do período de seca referente à data de 28-09. Para esse caso, a redução de vazão do córrego pode ter contribuído para a concentração de lançamentos de propriedades localizadas entre os pontos CR2 e CR3 e que não possuem fossa séptica. Nota-se que a presença de 17  $\beta$  estradiol na amostra do ponto CR3 inferiu na presença desse na água tratada de abastecimento público de Jaboticabal, sugerindo uma eficiência parcial (73,3%) do processo de tratamento de água para a remoção dessas substâncias.

A concentração de 17  $\beta$  estradiol encontrada no ponto CR3 (25,8 ng L<sup>-1</sup>) esteve abaixo da concentração encontrada para o Rio Atibaia, em Campinas - SP, de 6.700 ng L<sup>-1</sup> (GHISELLI, 2006). Tal fato demonstra que, embora tenha sido avaliada a presença desse hormônio no Córrego Rico, existem mananciais em condições mais graves de comprometimento.

A presença de 17  $\beta$  estradiol no ponto CR3 em período de seca consiste em comportamento semelhante ao observado para o Rio Jordão, no qual as maiores concentrações também estiveram presentes no período de seca (BAREL-COHEN, 2006). Nesse caso, o mecanismo prevalecente foi a evaporação que reduziu a vazão do mesmo e concentrou os lançamentos de fontes pontuais. No entanto, a presença descontínua de estrogênios no manancial e a ausência de correlação entre os hormônios e parâmetros indicadores de qualidade de água sugere que fontes difusas (além das citadas) contribuíram para o aporte de hormônios para o manancial. Tal fato demonstra também que a variação do comportamento entre



estações (chuva e seca) pode variar nos anos seguintes, não só mediante as oscilações do regime hídrico, mas também de acordo com as alterações dos lançamentos destas fontes.

Quanto à adequação das águas estudadas à legislação vigente, os Valores Máximos Permitidos (VMPs) dos parâmetros analisados para a caracterização das amostras são apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 - Valores máximos permitidos para os parâmetros de qualidade de água analisados em amostras do estudo de caso de Jaboticabal - SP, de acordo com legislação vigente.

Parâmetro	Resolução Conama 357/05		Portaria 518/04
	Classe 1	Classe 2	
pH	6,0 a 9,0	-	6,0 a 9,5
Cor aparente (uH)	40	75	15
Turbidez (uT)	-	100	1
Cloro residual livre (mg L <sup>-1</sup> )	-	-	0,2 a 2,0
<i>Escherichia coli</i> (NMP 100 mL <sup>-1</sup> )	200*	1000*	Ausente
Carbono Orgânico Dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	-	-	-
Aplicáveis às amostras	CR1	CR2, CR3	Ponto 4

\*Em 80% de pelo menos seis amostras coletadas no período de 1 ano com frequência bimestral.

- Parâmetro não-controlado.

Na Tabela 23, apresentam-se os critérios para águas naturais expressos na Resolução Conama 357/05 (BRASIL, 2005), tal como é o caso da nascente (CR1), classificada nessa resolução como classe 1, e da água superficial (CR2 e CR3), classificada como classe 2. Para água tratada (PT4), os critérios são expressos na Portaria 518/04 (BRASIL, 2004).

Comparando-se os resultados apresentados na Tabela 21 com os da Tabela 23, pode-se notar que estes evidenciaram que 22% de amostras estavam fora dos padrões para *E. coli* em água superficial e 33% em água potável. A cor aparente das amostras de água superficial (CR2 e CR3) esteve acima do limite (75 uH) estabelecido na legislação em valores muito maiores (103 a 485 uH) ao valor excedido para período de seca (71 a 208 uH). Esses dados concordam com os valores de turbidez, COD (que também foram maiores em período de cheia) e com a contagem de *Escherichia coli*.

## V CONCLUSÕES

O sistema HPLC/FLU apresenta o intervalo de trabalho em concentrações menores que o sistema HPLC/UV. A utilização de eluição isocrática com vazão de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  de acetonitrila/água 1:1, injeção de  $20 \mu\text{L}$  e detecção com  $230 \times 306 \text{ nm}$  mostraram-se as melhores condições. A coluna de  $\text{C}_{18}$  PAH (25 cm; 4,6 mm;  $5 \mu\text{m}$  de diâmetro de partícula) apresentou melhor seletividade que a coluna  $\text{C}_{18}$  convencional (25 cm; 4,6 mm;  $5 \mu\text{m}$  de diâmetro de partícula).

Quanto ao preparo da amostra por extração em fase sólida, 1 L desta deve passar pelos cartuchos contendo 500 mg de  $\text{C}_{18}$  (condicionados com 6 mL de hexano, 2 mL de acetona, 6 mL de metanol e 10 mL de água pH 3), após filtração em GF/C. Depois da limpeza da amostra com a passagem de 10 mL de água/metanol 9:1 (v/v) pelo cartucho, é feita a eluição em 4 mL de acetona. O extrato é seco com nitrogênio e redissolvido com  $600 \mu\text{L}$  de acetonitrila e deve ser filtrado com filtro de PVDF antes da injeção no sistema cromatográfico.

Os hormônios estrogênicos estiveram presentes na água do Córrego Rico de forma descontínua e em nível passível de provocar alterações fisiológicas nos organismos aquáticos. Apesar disso, a presença de  $17 \beta$  estradiol em água potável esteve abaixo do nível passível de exercer efeito biológico.

Nos pontos CR1 e CR2, os resíduos animais e os lançamentos da ETE de Monte Alto podem ter sido as maiores fontes de aporte de hormônios para a água, e no ponto CR3, a maior colaboração foi atribuída aos lançamentos de esgotos domésticos não-tratados das propriedades. No entanto, a ausência de correlação entre a concentração de estrogênios e outros parâmetros indicadores de qualidade

de água mostrou que outras fontes difusas ao longo do trecho estudado podem ter colaborado com o aporte de hormônios para o manancial.

Para os pontos CR1, CR3 e PT4, os hormônios foram quantificados em período de seca (agosto e setembro/2006) e, para o ponto CR2, em período de chuva (março e novembro/2006).

## VI DIFICULDADES ENCONTRADAS

A principal dificuldade encontrada durante o desenvolvimento deste trabalho consistiu na resolução para a leitura do 17  $\beta$  estradiol no detector de Fluorescência, para as menores concentrações estudadas, para amostras de água natural. Para solucionar tal problema, foram testados:

- ✓ Diferentes composições da fase móvel (isocráticas e gradientes);
- ✓ Diferentes volumes de preparo de amostra (500 mL, 750 mL e 1.000 mL);
- ✓ Realização de etapa adicional de *clean up* utilizando cartuchos de sílica;
- ✓ Identificação dos picos coeluentes para os hormônios estriol e metiltestosterona, os quais não foram confirmados como sendo essas substâncias;
- ✓ Injeção de volumes de extrato de 30; 40; 50 e 100  $\mu$ L.

Para esse problema, a troca da coluna C<sub>18</sub> convencional pela coluna C<sub>18</sub> PAH (25 cm; 4,6 mm; 5  $\mu$ m de diâmetro de partícula, Supercosil, Supelco) apresentou os melhores resultados. Esse fato pode ser explicado por meio da maior seletividade que a mesma apresenta para moléculas aromáticas, como é o caso dos hormônios.

Outra dificuldade encontrada é atribuída ao fato de que o 17  $\beta$  estradiol e a estrona fazem parte de um equilíbrio químico, que necessitou de controle ao longo da validação do método para que os resultados não fossem influenciados por deslocamentos. O principal fator de controle foi a realização do *aging* com refrigeração, pois a atividade microbiana à temperatura normal altera o potencial de oxirredução do meio e interfere no equilíbrio entre essas espécies, refletindo em recuperações não-fidedignas.

## VII ESTUDOS FUTUROS

Recomenda-se que a continuação deste estudo seja feita de forma a avaliar:

- ✓ Catecolestrogênios, metabólitos dos estrogênios, comprovadamente cancerígenos, em matrizes ambientais (água natural, água tratada e esgoto);
- ✓ Dinâmica da contaminação ambiental por resíduos animais oriundos de diversas origens (suinocultura, bovinocultura, caprinocultura, aqüicultura, entre outros);
- ✓ A eficiência dos sistemas de tratamento de resíduos animais quanto à remoção de hormônios estrogênicos.

## VIII REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução-RE n.899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm)>. Acesso em: 23 jan. 2005.

AHERNE, G. W.; BRIGGS, R. The relevance of the presence of certain synthetic steroids in the aquatic environment. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 41, n. 10, p. 735-736, 1989.

AMARAL, L. A. **Estudo piloto da poluição antrópica da microbacia hidrográfica do Córrego Rico**. Jaboticabal, 2005. 68 p. (Relatório FAPESP)

ANDERSEN, H.; STEGRIST, H.; HALLING-SORENSEN, B.; TERNES, T. A. Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 18, p. 4021-4026, 2003.

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington, 1992. p. 9-53-9-62.

ARAÚJO, J. C. **Estudo da eficiência do tratamento de efluentes domésticos da cidade de Araraquara-SP na remoção de hormônios sexuais**. 2006. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

BAREL-COHEN, K.; SHORE, L. S.; SHEMESH, M.; WENZEL, A.; MUELLER, J.; KRONFELD-SCHOR, N. Monitoring of natural and synthetic hormones in a polluted river. **Journal of Environmental Management**, v. 78, n. 1, p. 16-23, 2006.

BARONTI, C.; CURINI, R.; D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; GENTILI, A.; SAMPERI, R. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. **Environmental Science and Technology**, v. 34, n. 24, p. 5049-5066, 2000.

BELFROID, A. C.; VAN DER HORST, A.; VETHAAK, A. D.; SCHÄFER, A. J.; RIJIS, G. B. J.; WEGENER, J.; CONFINO, W. P. Analysis and occurrence of

estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. **Science of Total Environment**, v. 225, n. 1/2, p. 101-108, 1999.

BJERSELIUS, R.; LUNDSTEDT-ENKEL, K.; ÓLSEN, H.; MAYER, I.; DIMBERG, K. Male gold fish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17  $\beta$  Estradiol. **Aquatic Toxicology**, v. 53, n. 2, p. 139-152, 2001.

BOYD, G. R.; REEMTSMA, H.; GRIMM, D. A.; MITRA, S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA, and Ontario, Canada. **Science of the Total Environment**, v. 311, n. 1/3, p. 135-149, 2003.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá providências. Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 27 out. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Portaria n. 518, de 25 março de 2004. Disponível em: <<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>>. Acesso em: 06 nov. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Aprova as normas e padrões sobre a fluoretação da água dos sistemas públicos de abastecimento, destinada ao consumo humano. Portaria n. 635/BSB, de 26 de dezembro de 1975. **DOFC**, Brasília, p. 1455, 30 jan. 1976.

BRITO, N. M.; AMARANTE JR., O. P.; POLESE, L.; SANTOS, T. C. R.; RIBEIRO, M. L. Avaliação da exatidão e da precisão de métodos de análise de resíduos de pesticidas mediante ensaios de recuperação. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, p. 155-168, 2002.

BRITO, N. M.; AMARANTE JR., O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BULÁRIO. Disponível em: <[www.sobrage.org.br/art\\_cientificos/bulario.htm](http://www.sobrage.org.br/art_cientificos/bulario.htm)>. Acesso em: 15 ago. 2004.

D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; GENTILI, A.; MANCINI, R.; MASTROPASQUA, R.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. **The Science of the Total Environment**, v. 302, n. 1/3, p. 199-209, 2003.

DASTON, G. P.; GOOCH, J. W.; BRESLIN, W. J.; SHEREY, D. L.; NIKIFOROV, A. I.; FICO, T. A.; GORSUCH, J. W. Environmental estrogens and reproductive health: a discussion of the human and environmental data. **Reproductive Toxicology**, v. 11, n. 4, p. 465-481, 1997.

DESBROW, C.; ROUTLEDGE, E. J.; BRIGHTY, G. C.; SUMPTER, J. P.; WALDOCK, M. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. **Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 11, p. 1549-1565, 1998.

DI BERNARDO, L. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. Rio de Janeiro: ABES, 1993. v. 1, 496 p.

ESCRITÓRIO DE DESENVOLVIMENTO RURAL. **Plano da Microbacia Hidrográfica do Córrego Rico**. Jaboticabal, 2003.

FENG, X.; DING, S.; TU, J.; WU, F.; DENG, N. Degradation of estrone in aqueous solution by photo-Fenton system. **Science of the Total Environment**, v. 345, n. 1/3, p. 229-237, 2005.

FENT, K. Endocrinically active substances in the environment: findings and problems. In: GIES, A. (Org.). **Endocrinically active chemicals in the environment**. Berlin: Federal Environmental Agency, 1996. p. 69-81.

FIESER, L. F.; FIESER, M. **Steroids**. New York: VNR, 1959. 628 p.

FOLMAR, L. C.; HEMMER, M. J.; DENSLOW, N. D.; KROLL, K.; CHEN, J.; CHEEK, A.; RICHMAN, H.; MEREDITH, H.; GRAU, E. G. A comprison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol



and methoxychlor in vivo and in vitro. **Aquatic Toxicology**, v. 60, n. 1/2, p. 101-110, 2002.

GENERICO INFO. **Conheça os mais vendidos**. Disponível em: <[www.genericoinfo.hpg.ig.com.br/maisvendidos.htm](http://www.genericoinfo.hpg.ig.com.br/maisvendidos.htm)>. Acesso em: 15 ago. 2004.

GHISELLI, G. **Avaliação da qualidade 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). 2006. 190 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

GIACOMETTI, L.; COSTA JR., L. L. **Gestão hídrica no Município de Jaboticabal**: Bacia Hidrográfica do Córrego Rico. Jaboticabal: SAAEJ, 2002. 68 p.

GIMENO, S.; GERRITSEN, A.; BOWMER, T.; KOMEM, H. Feminization of male carp. **Nature**, v. 384, n. 6606, p. 221-222, 1996.

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. A.; ASUERO, A. G. Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. **Talanta**, v. 48, n. 3, p. 729-736, 1999.

GOOGLE EARTH. **Pointer 21°18'21.80" S 48°26'30.26' W elev 1991 ft**. Disponível em: <<http://earth.google.com>>. Acesso em: 30 set. 2006a.

GOOGLE EARTH. **Pointer 21°17'59.14" S 48°26'40.79' W elev 2052 ft**. Disponível em: <<http://earth.google.com>>. Acesso em: 30 set. 2006b.

HALLING-SORENSEN, B.; NIELSEN, S. N.; LANZKY, P. F.; INGERSLEV, F.; LUTZHOFT, H. C. H.; JORGENSEN, S. E. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. **Chemosphere**, v. 36, n. 2, p. 357-393, 1998.

HERMAN, R. L.; KINCAID, H. L. Pathological effects of orally administered estradiol to rainbow trout. **Aquaculture**, v. 72, n. 1/2, p. 165-172, 1988.

HOLTHAUS, K. I. E.; JOHNSON, S. C.; JURGENS, M. D.; WILLIAMS, R. J.; SMITH, J. J. L.; CARTER, J. E. The potencial for estradiol and ethinylestradiol to

sorb to suspended and bed sediments in some English rivers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 2526-2535, 2002.

HUBER, M. M.; KORHONEM, S.; TERNES, T. A.; VON GUTEN, U. Oxidation of pharmaceutical during water treatment with chlorine dioxide. **Water Research**, v. 39, n. 15, p. 3607-3617, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CQCRE-008**. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/kits/doqcgcre008r01.pdf>>. Acesso em: 28 jun. 2006.

JABOTICABAL. **Cidade**: geografia. Disponível em: <<http://www.jaboticabal.com.br>>. Acesso em: 04 set. 2006.

JEANNOT, R.; SABIK, H.; SAUVARD, E.; DAGNAE, T.; DOHRENDORF, K. Determination of endocrine disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry. **Journal of Chromatography, A**, v. 974, n. 1, p. 143-159, 2002.

JOBLING, S.; NOLAN, M.; TYLER, C. R.; BRIGHTY, G.; SUMPTER, J. P. Widespread sexual disruption in wild fish. **Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 17, p. 2498-2506, 1998.

JOOSTEN, H. F. P.; VAN ACKER, F. A. A.; VAN DER DOBBELSTEEN, D. J.; HORBACH, G. J. M. J.; KRAJNC, E. I. Genotoxicity of hormonal steroids. **Toxicity Letters**, v. 151, n. 1, p. 113-134, 2004.

JÜRGENS, M. D.; HOLTHAUS, K. I. E.; JOHNSON, A. C.; SMITH, J. J. L.; HETHERIDGE, M.; WILLIAMS, R. J. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 480-488, 2002.

KÖRNER, W.; HANF, V.; SCHULLER, W.; KEMPTER, C.; METZGER, J.; HAGENMAIER, H. Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of strogenic activity in municipal sewage plant effluents. **The Science of Total Environment**, v. 225, n. 1/2, p. 33-48, 1999.

KUCH, H. M.; BALLSCHMITER, K. Determination of endocrine disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCl)-MS in the picogram per liter range. **Environmental Science and Technology**, v. 35, n. 15, p. 3201-3206, 2001.

LAI, K. M.; JOHNSON, K. L.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. **Environmental Science and Technology**, v. 34, n. 18, p. 3890-3894, 2000.

LE CURIEUX-BELFOND, O.; FIEVET, B.; SÉRALINI, G. E.; MATHIEU, M. Short-term bioaccumulation, circulation and metabolism of estradiol-17  $\beta$  in the oyster *Crassostrea gigas*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 325, n. 2, p. 125-133, 2005.

LEE, H.-B.; PEART, T. E. Determination of 17  $\beta$  Estradiol and its metabolites in Sewage effluent by solid phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 81, n. 6, p. 1209-1216, 1998.

LEE, H. B.; LIU, D. Degradation of 17  $\beta$  Estradiol and its metabolites by sewage bacteria. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 134, n. 1/4, p. 351-366, 2002.

LEE, L. S.; STROCK, T. J.; SARMAH, A. K.; SURESH, P.; RAO, C. Sorption and dissipations of testosterone, estrogens and their primary transformation products in soil and sediment. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 18, p. 4098-4105, 2003.

LOPES, L. G.; ITALIANO, W. L.; COSTA JR., L. L.; HOJAIJ, A.; GALBIATTI, J. A.; MARQUES JR., S. A. Qualidade hídrica da bacia hidrográfica do Córrego Rico, Jaboticabal, SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 32., 2003, Goiânia. **Anais...** Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Engenharia Agrícola, 2003. 1 CD-ROM.

MARTINI, R. A. **Estudo da fotodegradação dos compostos orgânicos presentes em amostras de chorume por processo Foto Fenton**. 2005. 57 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

MATSUMOTO, K.; TSUKAHARA, Y.; UEMURA, T.; TSUNODA, K.; KUME, H.; KAWASAKI, S.; TADANO, J.; MATSUYA, T. Highly sensitive time-resolved fluorometric determination of estrogens by high-performance liquid chromatography using a  $\beta$ -diketonate europium quelate. **Journal of Chromatography, B**, v. 773, n. 2, p. 135-142, 2002.

MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. K. **Vogel: análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 462 p.

NGHIEM, L. D.; SCHÄFER, A. I.; WAITE, T. D. Adsorptive interactions between membranes and trace contaminants. **Desalination**, v. 147, n. 1/3, p. 269-274, 2002.

OKHO, Y.; JUCHI, K.-I.; NIWA, C.; TATSUMA, T.; NAKASHIMA, T.; IGUCHI, T.; KUBOTA, Y.; FUJISHIMA, A. 17  $\beta$  Estradiol Degradation by TiO<sub>2</sub> photocatalysis as a means of reducing estrogenic activity. **Environmental Science and Technology**, v. 36, n. 19, p. 4175-4181, 2002.

OSHIMA, Y.; KANG, I. J.; KOBAYASHI, M.; NAKAYAMA, K.; IMADA, N.; HONJO, T. Suppression of sexual behaviour in male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17  $\beta$  Estradiol. **Chemosphere**, v. 50, n. 3, p. 429-436, 2003.

PARSEKIAN, M. P. S. **Análise e proposta de formas de gerenciamento de estações de tratamento de águas de abastecimento completo em cidades de porte médio do Estado de São Paulo**. 1998. 183 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1998.

PESEK, J. J.; MATYSKA, M. T. SPE adsorbents and formats. In: SIMPSON, N. J. K. (Ed.). **Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications**. New York: Marcel Dekker, 2000. p. 19-37.

PETERSON, E. W.; DAVIS, R. K.; ORNDORFF, H. A. 17  $\beta$ -Estradiol as an indicator of animal waste contamination in mantled karst aquifers. **Journal of Environmental Quality**, v. 29, n. 3, p. 826-834, 2000.

PISSARRA, T. C. T. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista - Câmpus de Jaboticabal. Comunicação pessoal, 2006.

RAMOS, R. O. **Alterações ambientais do Rio Mogi Guaçu e reflexo nas variáveis reprodutivas e indução hormonal no curimatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836)**. 2002. 75 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2002.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2001. 703 p.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C.; JARDIM, I. C. F. S.; MELO, L. F. C. Validação de métodos cromatográficos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; ALDA, M. J. T.; BARCELÓ, D. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography, A**, v. 1045, n. 1/2, p. 85-92, 2004.

ROUTLEDGE, E. W.; 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. **Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 11, p. 1559-1565, 1998.

SÃO PAULO. Secretaria da Saúde. Centro de Vigilância Sanitária. Define teores de concentração de íon fluoreto nas águas para consumo humano, fornecidas por sistemas públicos de abastecimento. Resolução n. 250, de 15 de agosto de 1995. Disponível em: <<http://www.quimlab.com.br/PDF-LA/SS-250%20-%20Fluoreto%20em%20%20C1gua%20de%20Abastecimento%20P%20FAblico%20.pdf>>. Acesso em: 07 nov. 2006.

SCHÄFER, A. I.; NGHIEM, L. D.; WAITE, T. D. Removal of natural hormone estrone from aqueous solutions using nanofiltration and reverse osmosis. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 182-188, 2003.

SEWELL, P. A.; CLARKE, B. **Chromatographic separations**. London: Thames Polytechnic, 1987. 562 p.

SHELLY, D. C.; WARNER, I. M. Fluorescence detectors in high-performance liquid chromatography. In: VICKREY, T. (Ed.). **Liquid chromatography detectors**. New York: Marcel Dekker, 1983. p. 87-123.

SHARPE, R. M.; SKAKKEBAEK, N. E. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? **Lancet**, v. 341, p. 1392-1395, 1993.

SHORE, L. S.; KAPULNIK, Y.; BEN-DOR, B.; FRIDMAN, Y.; WININGER, S.; SHEMESH, M. Effects of estrone and 17  $\beta$  Estradiol on vegetative growth of *Medicago Sativa*. **Physiologia Plantarum**, v. 84, n. 2, p. 217-222, 1992.

SIMPSON, N. J. K.; WELLS, M. J. M. Introduction to solid phase extraction. In: SIMPSON, N. J. K. (Ed.). **Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications**. New York: Marcel Dekker, 2000. p. 1-16.

SNYDER, S. A.; KEITH, T. L.; VERBRUGGE, D. A.; SNYDER, E. M.; GROSS, T. S.; KANNAN, K.; GIESY, J. P. Analytical methods for detection of select estrogenic compounds in aqueous mixtures. **Environmental Science and Technology**, v. 33, n. 16, p. 2814-2820, 1999.

SOLÉ, M.; PORTE, C.; BARCELÓ, D. Analysis of the estrogenic activity of sewage treatment Works and receiving waters using vitelogenin induction in fish as a biomarker. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 9, p. 518-525, 2001.

SOLIMAN, M. A.; PETERSEN, J. A.; SUFFET, I. H. M. Rapid gas chromatography-mass spectrometry screening method for human pharmaceuticals, hormones, antioxidants and plasticizers in water. **Journal of Chromatography, A**, v. 1029, n. 1-2, p. 223-237, 2004.

TERNES, T. A. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 419-434, 2001.

TERNES, T. A.; STUMPF, M.; MUELLER, 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. **The Science of Total Environment**, v. 225, n. 1/2, p. 81-90, 1999.

VADJA, A. M. **Reproductive disruption of fishes by endocrine active wastewater effluent**. 2006. 176 f. Tese (Doutorado em Filosofia) – University of Colorado, Boulder, 2006.

XIAO, X.-Y.; MACCALLEY, D. V.; MCEVOY, J. Analysis of estrogens in river water and effluents using solid phase extraction and gas chromatography – negative chemical ionization mass spectrometry of pentafluorobenzoyl derivatives. **Journal of Chromatography, A**, v. 963, n. 1, p. 195-204, 2001.

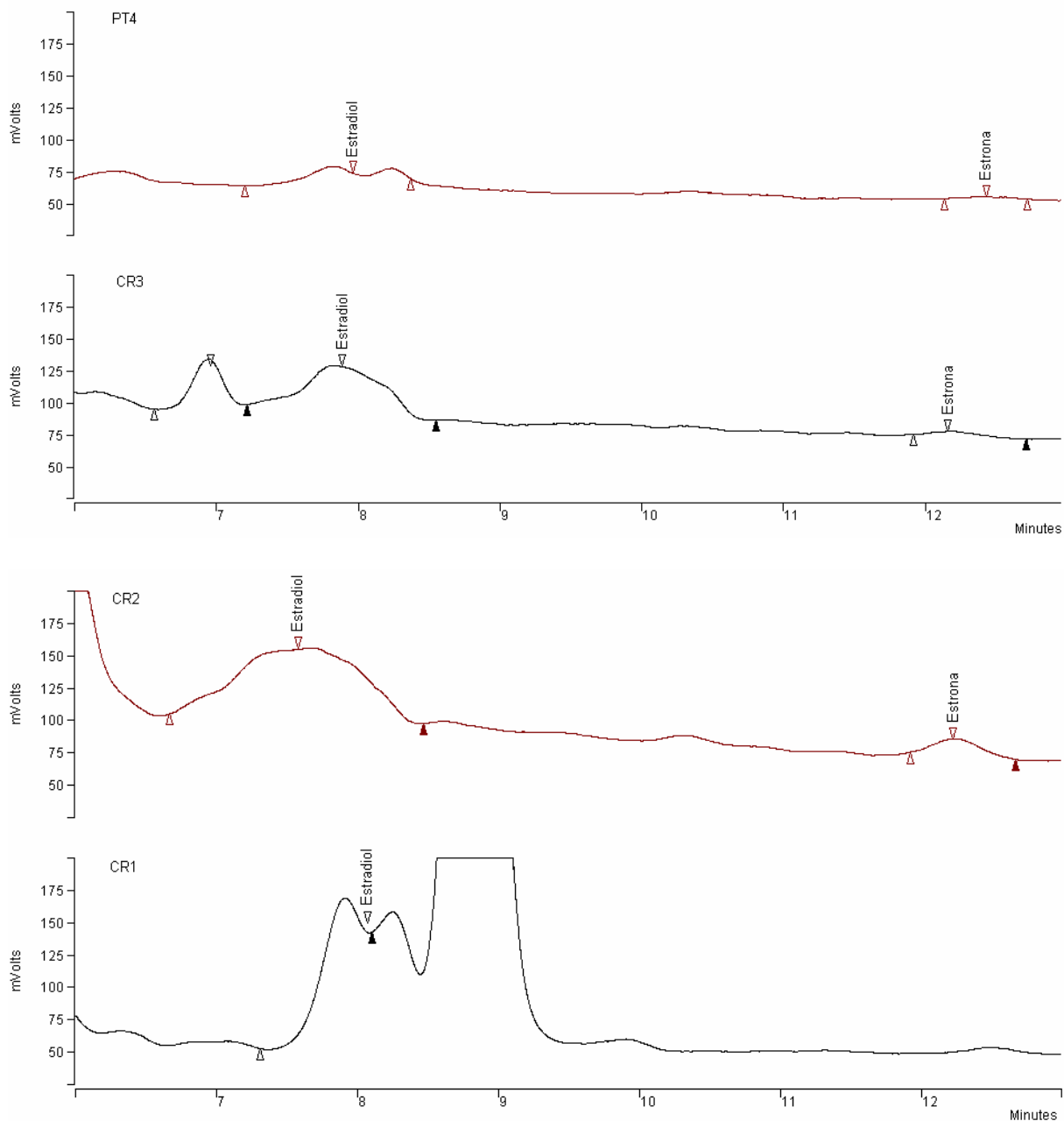
YING, G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y.-J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. **Environment International**, v. 28, n. 6, p. 545-551, 2002.

ZHANG, Y.; ZHOU, J. L. Removal of estrone and 17  $\beta$  Estradiol from water by adsorption. **Water Research**, v. 39, n. 16, p. 3991-4003, 2005.

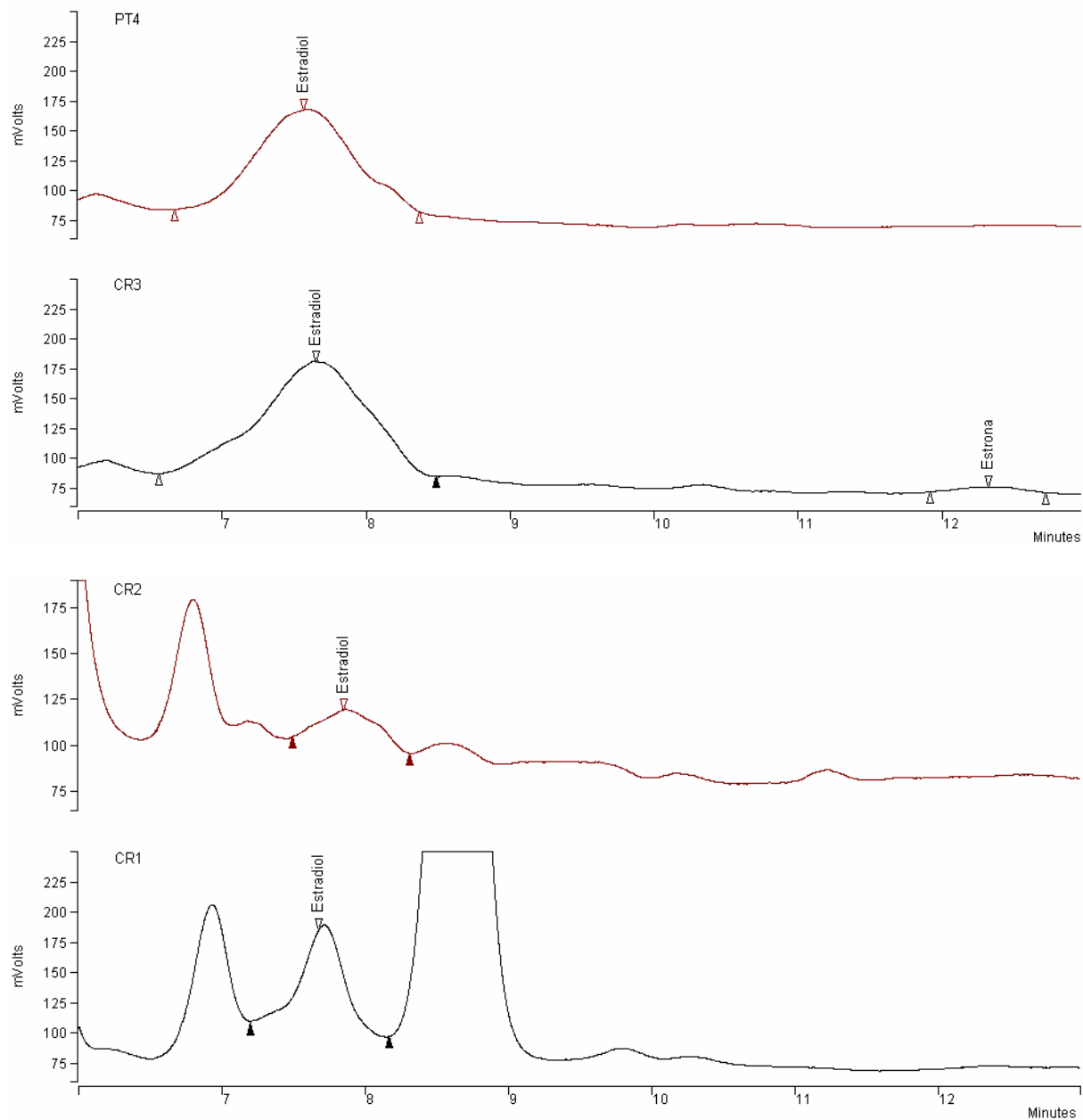
# ANEXO



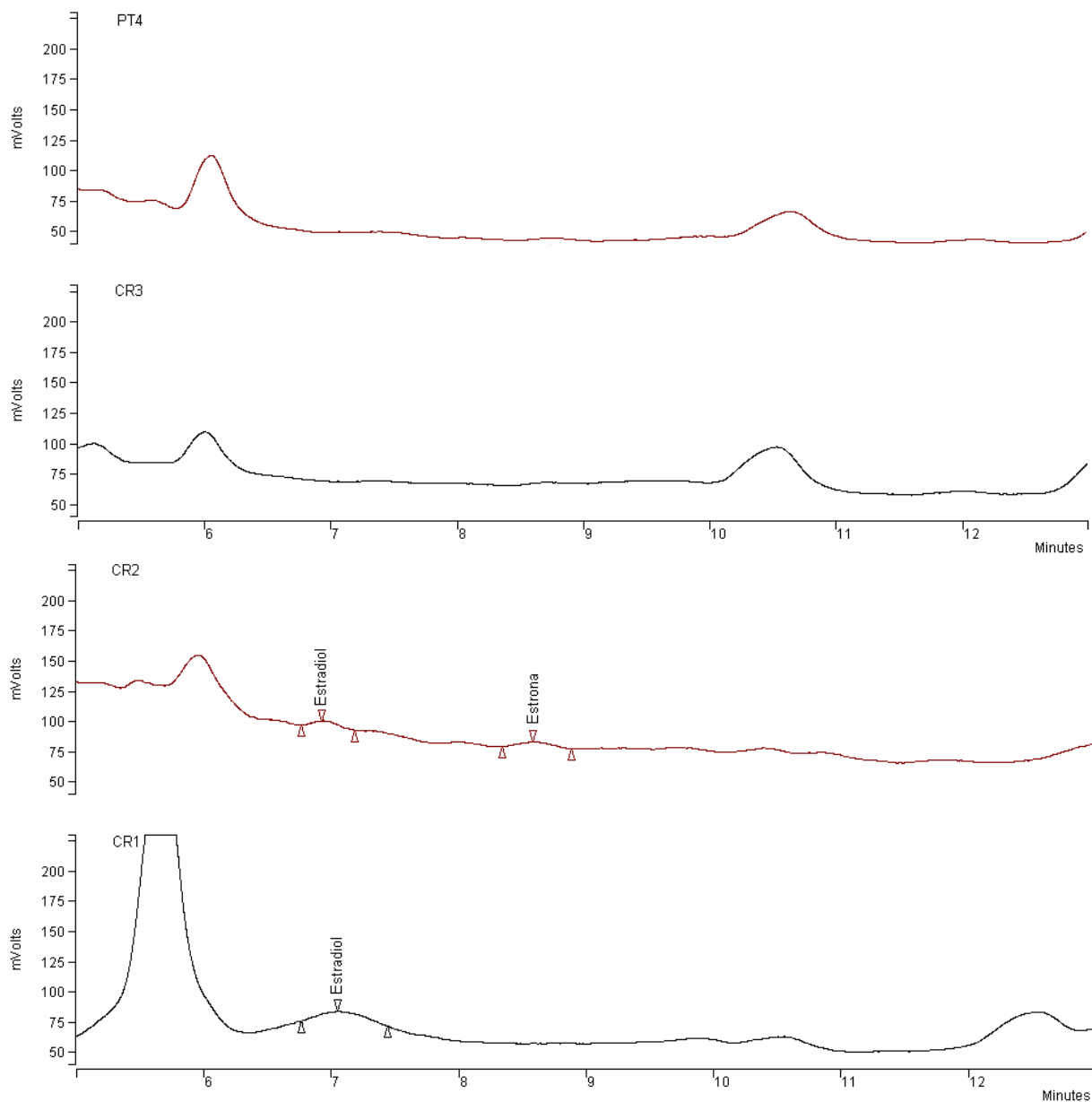
ANEXO A1 – Cromatogramas referentes à coleta de 24/03/2006, na bacia hidrográfica do Córrego Rico, em Jaboticabal e Monte Alto - SP. Condições: coluna C<sub>18</sub> (250 mm de comprimento, 4,6 mm d.i., partículas 5 µm), volume de injeção de 20 µL, fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, eluição isocrática H<sub>2</sub>O/ACN 1:1.



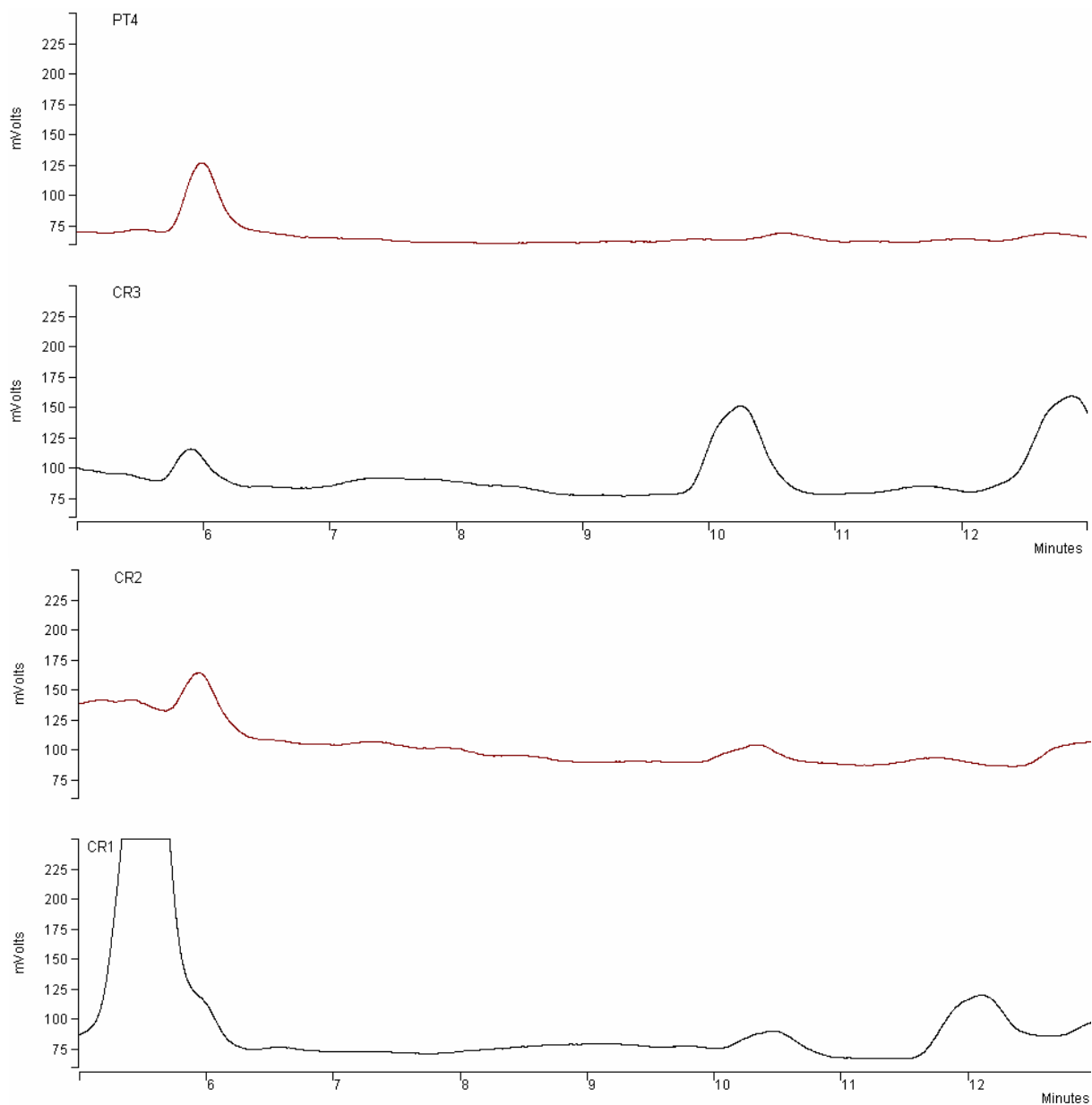
ANEXO A2 - Cromatogramas referentes à coleta de 27/03/2006, na bacia hidrográfica do Córrego Rico, em Jaboticabal e Monte Alto - SP. Condições: coluna C<sub>18</sub> (250 mm de comprimento, 4,6 mm d.i., partículas 5 μm), volume de injeção de 20 μL, fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, eluição isocrática H<sub>2</sub>O/ACN 1:1.



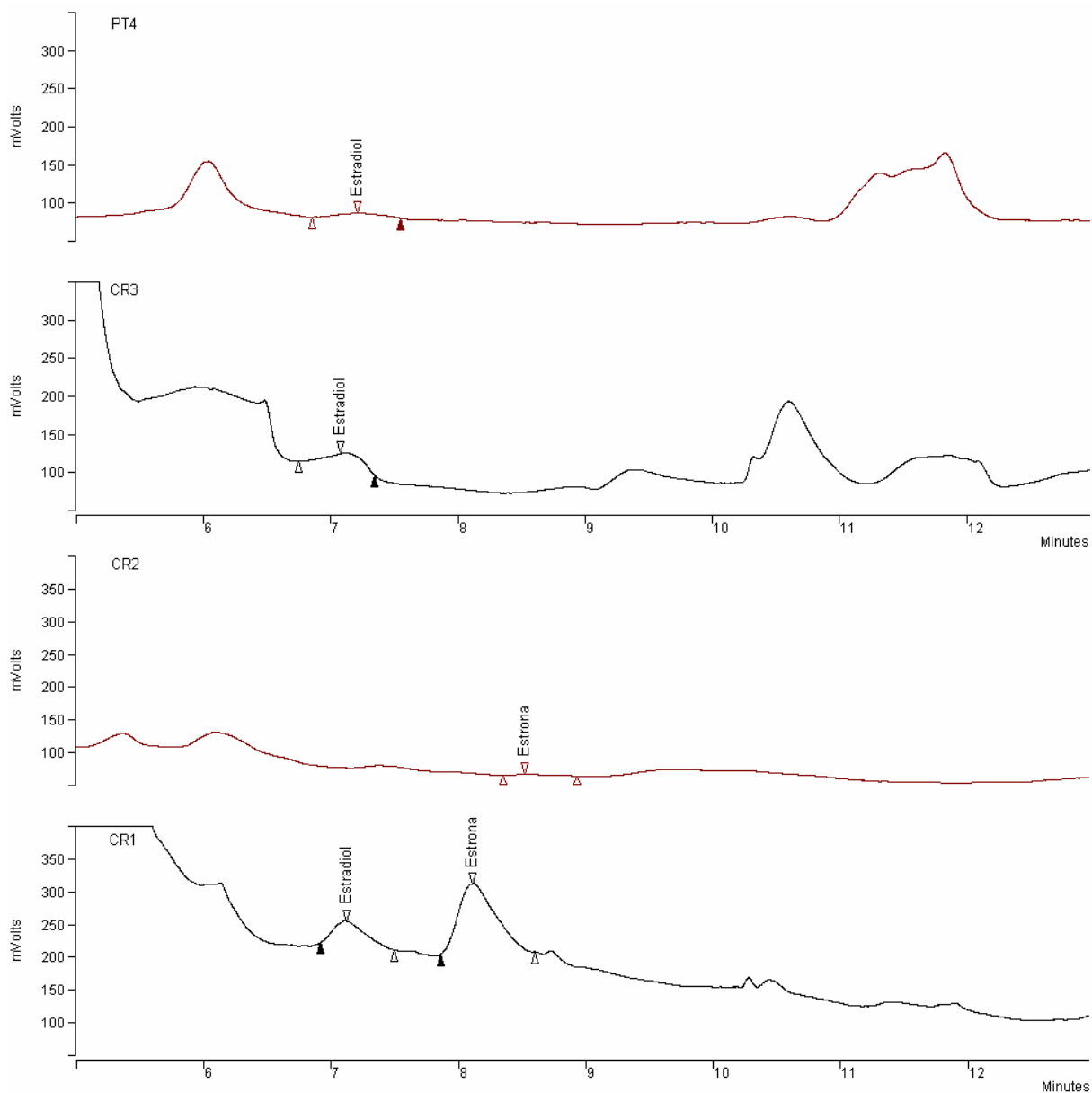
ANEXO A3 - Cromatogramas referentes à coleta de 29/08/06, na bacia hidrográfica do Córrego Rico, em Jaboticabal e Monte Alto - SP. Condições: coluna C<sub>18</sub> PAH (250 mm de comprimento, 4,6 mm d.i., partículas 5 µm), volume de injeção de 20 µL, fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, eluição isocrática H<sub>2</sub>O/ACN 1:1.



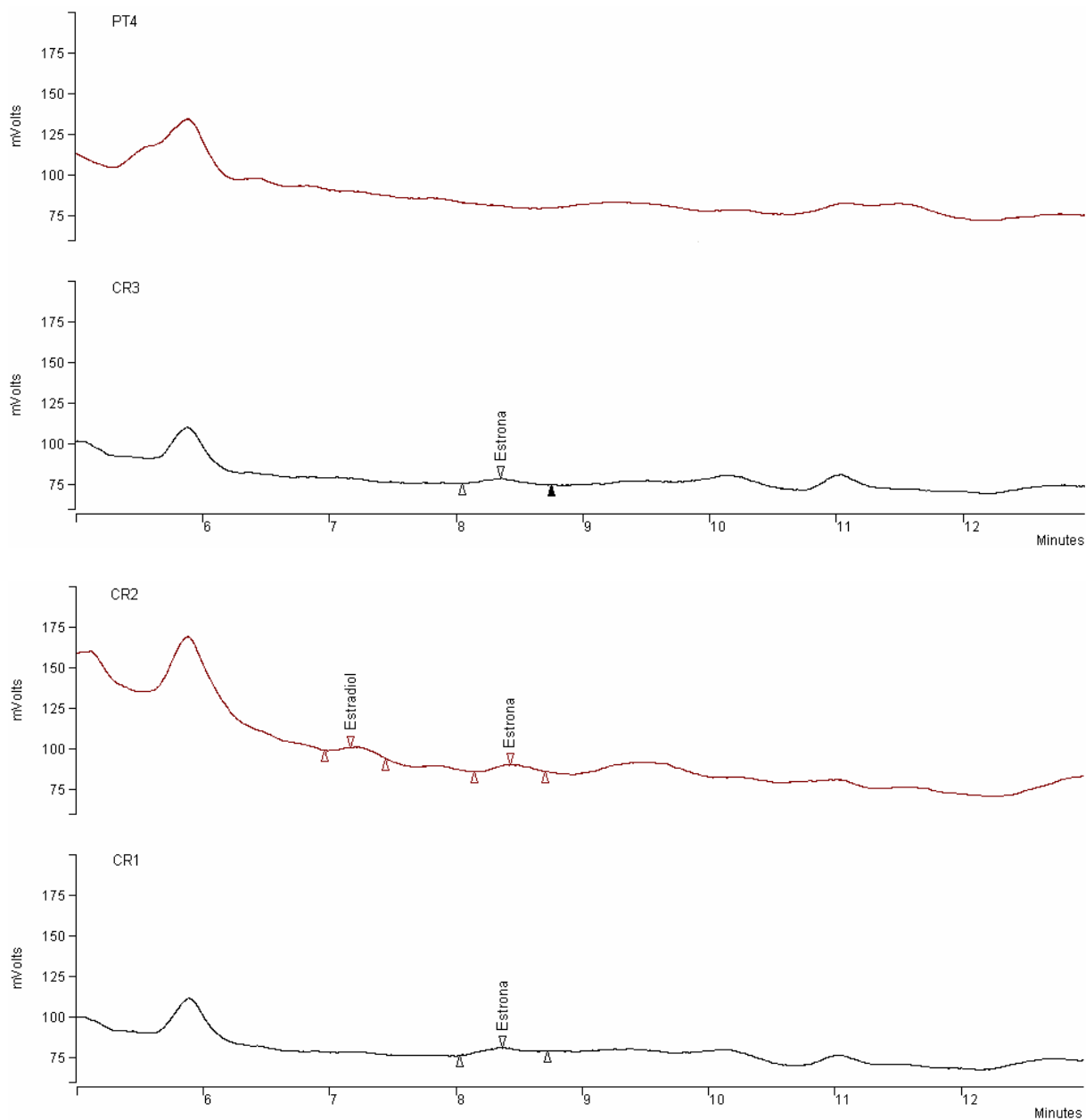
ANEXO A4 - Cromatogramas referentes à coleta de 13/09/06, na bacia hidrográfica do Córrego Rico, em Jaboticabal e Monte Alto - SP. Condições: coluna C<sub>18</sub> PAH (250 mm de comprimento, 4,6 mm d.i., partículas 5 µm), volume de injeção de 20 µL, fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, eluição isocrática H<sub>2</sub>O/ACN 1:1.



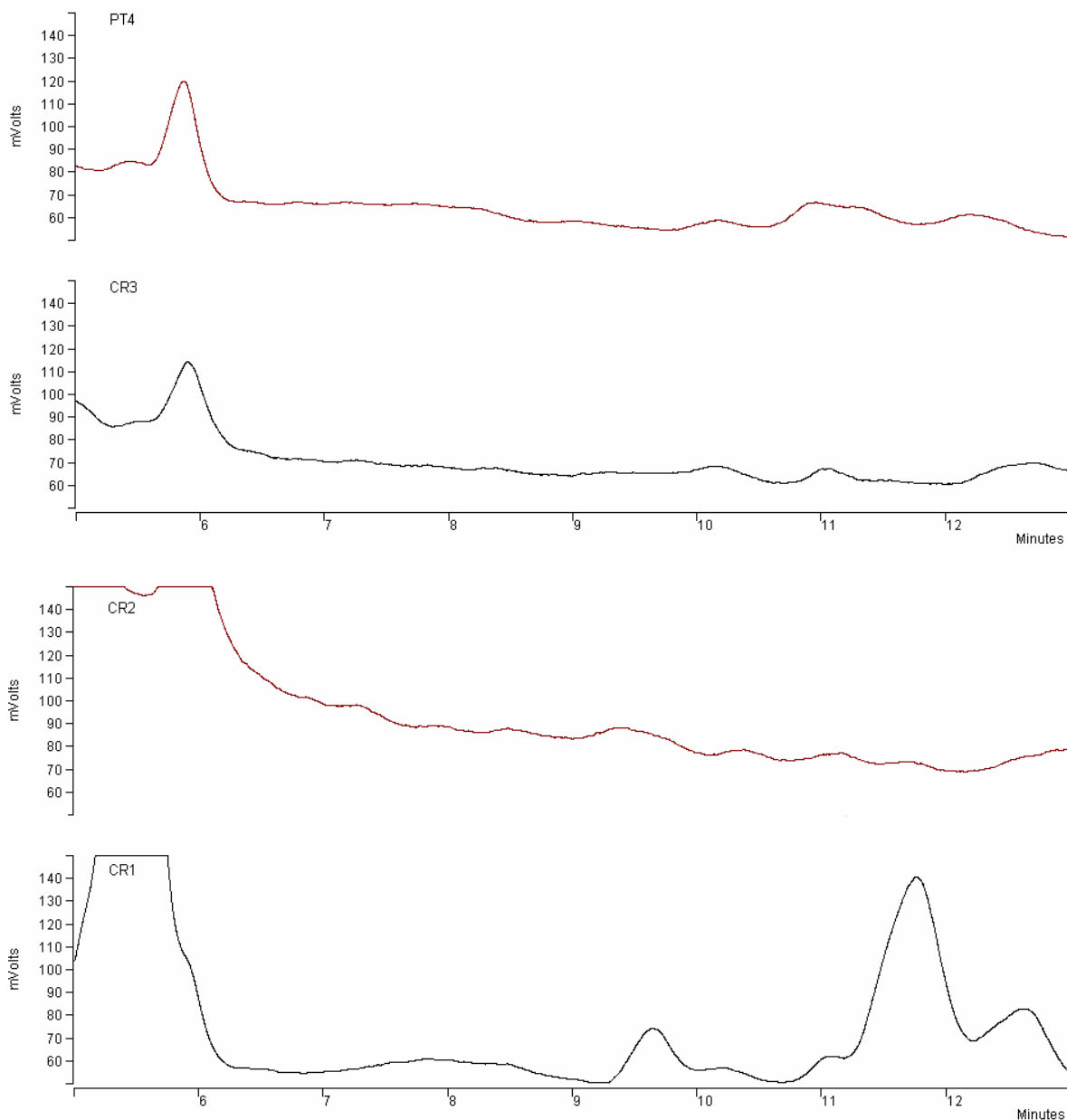
ANEXO A5 - Cromatogramas referentes à coleta de 28/09/06, na bacia hidrográfica do Córrego Rico, em Jaboticabal e Monte Alto - SP. Condições: coluna C<sub>18</sub> PAH (250 mm de comprimento, 4,6 mm d.i., partículas 5 μm), volume de injeção de 20 μL, fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, eluição isocrática H<sub>2</sub>O/ACN 1:1.



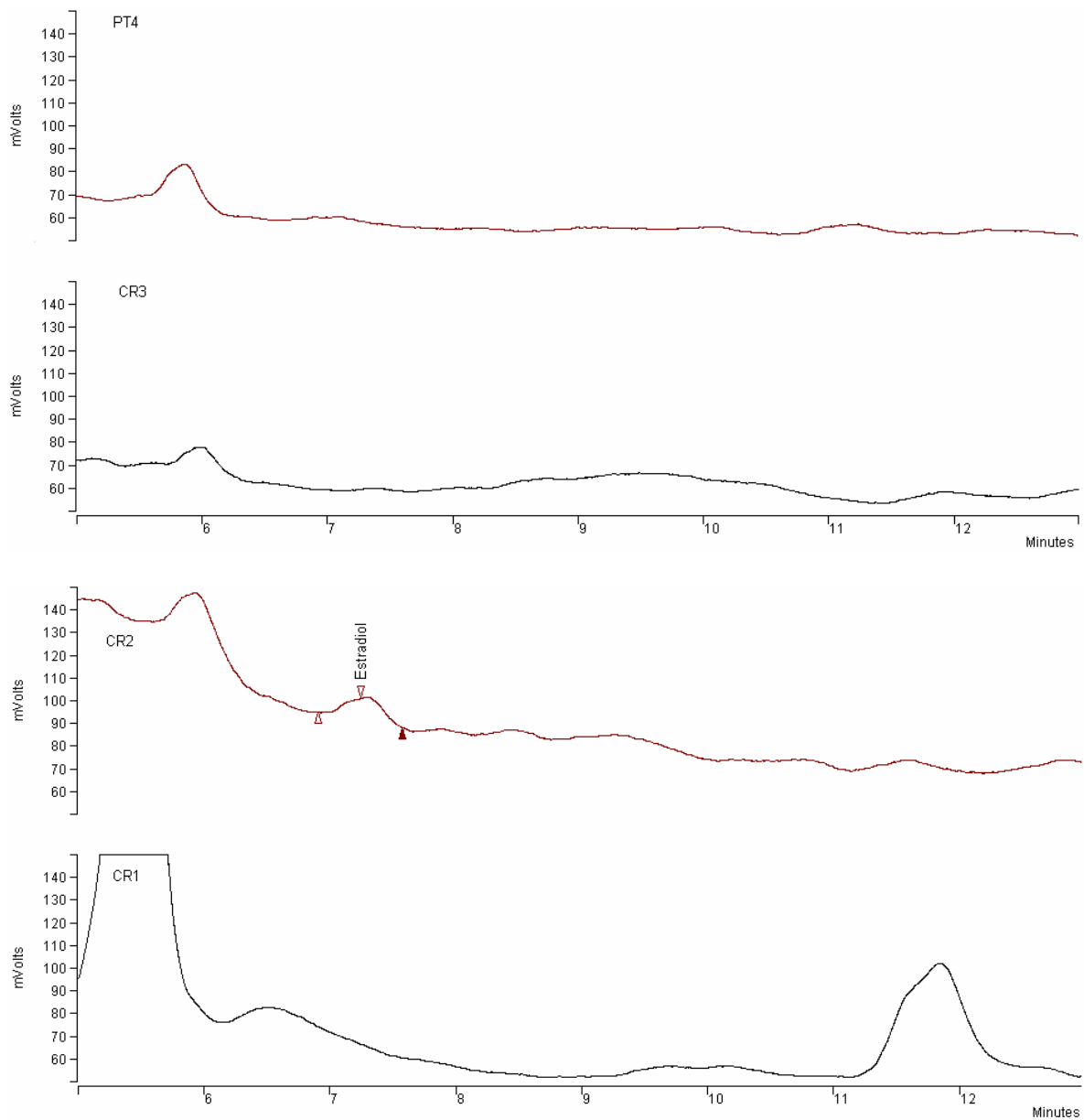
ANEXO A6 - Cromatogramas referentes à coleta de 16/10/06, na bacia hidrográfica do Córrego Rico, em Jaboticabal e Monte Alto - SP. Condições: coluna C<sub>18</sub> PAH (250 mm de comprimento, 4,6 mm d.i., partículas 5 µm), volume de injeção de 20 µL, fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, eluição isocrática H<sub>2</sub>O/ACN 1:1.



ANEXO A7 - Cromatogramas referentes à coleta de 30/10/06, na bacia hidrográfica do Córrego Rico, em Jaboticabal e Monte Alto - SP. Condições: coluna C<sub>18</sub> PAH (250 mm de comprimento, 4,6 mm d.i., partículas 5 µm), volume de injeção de 20 µL, fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, eluição isocrática H<sub>2</sub>O/ACN 1:1.



ANEXO A8 - Cromatogramas referentes à coleta de 16/11/06, na bacia hidrográfica do Córrego Rico, em Jaboticabal e Monte Alto - SP. Condições: coluna C<sub>18</sub> PAH (250 mm de comprimento, 4,6 mm d.i., partículas 5 µm), volume de injeção de 20 µL, fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, eluição isocrática H<sub>2</sub>O/ACN 1:1.





ANEXO A9 - Cromatogramas referentes à coleta de 22/11/06, na bacia hidrográfica do Córrego Rico, em Jaboticabal e Monte Alto - SP. Condições: coluna C<sub>18</sub> PAH (250 mm de comprimento, 4,6 mm d.i., partículas 5 µm), volume de injeção de 20 µL, fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, eluição isocrática H<sub>2</sub>O/ACN 1:1.

