

PATRÍCIA CAVANI MARTINS DE MELLO

**Ocorrência de alteradores endócrinos e fármacos em águas de
abastecimento público e ETE, em duas cidades da área de
abrangência da UGRHI 21 e 22**

Tese apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista Júlio de Mesquita Filho –
UNESP, como parte dos requisitos
para obtenção do título de doutor
em Química

Orientadora: Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi

Araraquara/SP
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

M527o Mello, Patrícia Cavani Martins de
Ocorrência de alteradores endócrinos e fármacos nas
águas de abastecimento público e ETE, em duas cidades da
área de abrangência da UGRHI-21 e 22 / Patrícia Cavani
Martins de Mello. – Araraquara : [s.n], 2015
104 f. : il.

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

1. Fármacos. 2. Água - qualidade. 3. Estrogênio.
4. Cromatografia líquida de alta eficiência. 5. Esgotos. I. Título.

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara

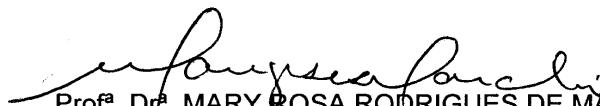
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

PATRÍCIA CAVANI MARTINS DE MELLO

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

Araraquara, 16 de março de 2015.

BANCA EXAMINADORA



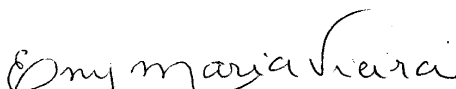
Prof^ª. Dr^ª. MARY ROSA RODRIGUES DE MARCHI (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara – SP



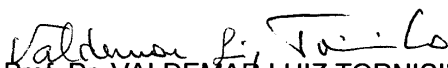
Dr^ª. LUCIANA POLESE
Centro de Estudos Ambientais / UNESP / Rio Claro - SP



Prof^ª. Dr^ª. MARIA LÚCIA RIBEIRO
Centro Universitário de Araraquara / UNIARA / Araraquara – SP



Prof^ª. Dr^ª. ENY MARIA VIEIRA
Instituto de Química / USP / São Carlos - SP



Prof. Dr. VALDEMAR LUIZ TORNISIELO
Centro de Energia Nuclear na Agricultura / USP / Piracicaba – SP

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DADOS PESSOAIS

Nome: Patrícia Cavani Martins de Mello

Nome em citações bibliográficas: MELLO, P. C. M.

Email: patricia_cavani@hotmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2009 - 2010 Especialização em Gestão Ambiental.

Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente, Brasil

Título: O uso de defensivos agrícolas no Médio Vale Paranapanema

Orientador: Wagner Camarini Alves

2005-2008 Mestrado em Química dos Recursos Naturais

Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina/PR, Brasil

Título: Degradação de Diuron em Solo Bioaumentado com Microrganismos da Rizosfera da Cana de Açúcar

Orientador: Ilza Lobo

2000-2004 Graduação em Química Licenciatura e Química Industrial Bacharelado

Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, IMESA, Assis/SP, Brasil

Título: Biodegradação de diuron por microrganismo isolado de cultivo de cana-de-açúcar.

Orientador: Idécio Nogueira da Silva.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2011 – 2011 Programa de Palestras AIQ 2011. (Carga horária: 4h).

Conselho Regional de Química IV Região.

2010 – 2010 Extensão universitária em Higiene Ocupacional. (Carga horária: 90h).

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

2009 – 2009 Planejamento Estratégico Administrativo. (Carga horária: 14h).

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

2009 – 2009 Gestão Documental. (Carga horária: 16h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2008 – 2008 Curso de Extensão em Toxicologia. (Carga horária: 40h). Fundação para o Desenvolvimento do Ensino, Pesquisa e Extensão.

2008 – 2008 Armazenamento de Produtos Fitossanitários. (Carga horária: 2h).

Du Pont do Brasil.

2008 – 2008 Gestão Ambiental Empresarial. (Carga horária: 8h). Universidade Norte do Paraná.

2007 – 2007 D-Olho na Qualidade: 5Ss para os pequenos negócios. (Carga horária: 16h). Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas de São Paulo.

2005 – 2005 Elaboração de Plano de Negócios. (Carga horária: 24h). Sistema Assessoria Contábil e Gerencial.

2004 – 2004 Ensino do Conceito de Valência no Ensino Superior. (Carga horária: 6h). Universidade Federal de Goiás.

2003 – 2003 Desenvolvimento de Formulações Cosméticas. (Carga horária: 4h). Instituto Técnico de Controle de Qualidade.

2003 – 2003 Análise e Tratamento de Águas Efluentes Industriais. (Carga horária: 4h). Instituto Técnico de Controle de Qualidade.

2003 – 2003 Floculação do Fermento Em Fermentação Alcoólica. (Carga horária: 4h). Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis.

2003 – 2003 Fatores Que Afetam o Metabolismo de *Sacharomyces C.* (Carga horária: 8h). Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis.

2003 – 2003 Cromatografia Líquida de Alta Performance Hplc. (Carga horária: 4h). Fundação Educacional do Município de Assis.

2001 – 2001 Análise Sensorial. (Carga horária: 8h). Fundação Educacional do Município de Assis.

2001 – 2001 Análises Microbiológicas de Águas. (Carga horária: 40h). Fundação Educacional do Município de Assis.

2000 – 2000 Curso de Mutagênese. (Carga horária: 18h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

1999 – 1999 Fundamentos de Eletroquímica e Eletrodeposição. (Carga horária: 10h). Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, CEETEPS, Brasil.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

1. Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, IMESA, Brasil.

08/2010 – Atual Vínculo: Celetista formal, Enquadramento Funcional: Professor, Carga horária: 8;

08/2012 – Atual Responsável Técnico de Laboratório de Prestação de Serviços;

05/2013 – 12/2014 Coordenador de curso de pós graduação em Química Ambiental;

2. Universidade Paulista – UNIP

08/2010 – Atual Vínculo: Celetista formal , Enquadramento funcional: Professor Adjunto , Carga horária: 8, Regime: Parcial

4. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho UNESP

2010 - 2010: Professor visitante – campus de Assis, Enquadramento funcional: Professor , Carga horária: 12, Regime: Parcial

2007- 2010: Membro de comissão– campus de Marília, Regime: Parcial

2006 – 2010: Servidor público – campus de Marília, Enquadramento funcional: Assistente de Suporte Acadêmico II , Carga horária: 40, Regime: Integral

5. Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza CEETEPS

2005 – Atual: Professor B , Carga horária: 10, Regime: Parcial

6. Fundação de Apoio à Tecnologia FAT

2007 – 2008: Celetista formal , Enquadramento funcional: Professor , Carga horária: 4

7. Tecnologia Em Saúde Indústria de Alimentos Comércio e Serviços LTDA ME

2004 - 2005: Celetista , Enquadramento funcional: Químico , Carga horária: 40,

Artigos completos publicados em periódicos

1. MELLO, Patrícia Cavani Martins de, LOBO, I., YABE, Maria Josefa dos Santos. Otimização de um método de extração ultrasônica e análise por HPLC para determinação de Diuron e seus metabólitos em solo de cultivo de canadeaçúcar. Semina. Ciências Exatas e Tecnológicas (Online)., v.30, p.107 116,2009.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. FRANCO, P. C. I., MELLO, Patrícia Cavani Martins de, BARACHO, J. R., RIBEIRO, T. M. A. Avaliação Higiênico-Sanitária das Mãos de Alunos de uma EMEI na cidade de Assis/SP In: VII Fórum Científico da FEMA, 2014, Assis. **VII Fórum Científico da FEMA.**

2. PEREIRA, G. A. A., MELLO, Patrícia Cavani Martins de. Pesquisa de corantes orgânicos artificiais em bebidas não alcóolicas dos tipos suco, néctar e refresco In: VII Fórum Científico da FEMA, 2014, Assis. **VII Fórum Científico da FEMA.**

3. COSTA, R. F. S., MELLO, Patrícia Cavani Martins de. Produção de Biogás a Partir de Vinhaça In: VII Fórum Científico da FEMA, 2014, Assis. **VII Fórum Científico da FEMA.**

4. ALVES, M. C., MELLO, Patrícia Cavani Martins de. Determinação do Teor de Nitrogênio, Fósforo e Potássio em Amostras de Água de Rio Submetidas à Lixiviação de

Fertilizantes de Áreas Agrícolas In: VI Fórum Científico da FEMA, 2013, Assis. **VI Fórum Científico da FEMA.**

5. MASCHIO, C., MELLO, Patrícia Cavani Martins de. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar para tratamento de efluentes industriais In: VI Fórum Científico da FEMA, 2013, Assis. **VI Fórum Científico da FEMA.**

6. MELLO, Patrícia Cavani Martins de, SANTOS, E. R., ZARDETTO, L. Caracterização Química e Microbiológica de Lodo de Esgoto com Fins de Fertilização In: VI Encontro Nacional de Química Ambiental, 2012, Londrina. **VI Encontro Nacional de Química Ambiental.**

7. MELLO, Patrícia Cavani Martins de, COSTA, E. G. C. Estudo Comparativo de Clarificação de Água Bruta Submetida a Tratamento com Cloreto de Polialumínio e Sulfato de Alumínio In: VI Encontro Nacional de Química Ambiental, 2012, Londrina. **VI Encontro Nacional de Química Ambiental.**

8. MELLO, Patrícia Cavani Martins de, MARCHI, M. R. R. Fármacos no ambiente aquático: previsões do seu destino ambiental In: V Fórum Científico da FEMA, 2012, Assis. **VI Fórum Científico da FEMA.**

9. ANDRADE, D. G., MELLO, Patrícia Cavani Martins de. Monitoramento da Qualidade da Água no Balneário Municipal de Quatá In: V Fórum Científico da FEMA, 2012, Assis. **V Fórum Científico da FEMA.**

10. MELLO, Patrícia Cavani Martins de, YABE, Maria Josefa dos Santos, MENEGON, Elaine Amorim Soares. Biochemical Characterization of Microorganisms of Rhizospheric Soil Treated With Diuron In: IV Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2009, Rio Claro. **IV Simpósio de Microbiologia Aplicada.**

Apresentação de trabalho e palestra

1. FRANCO, P. C. I., MELLO, Patrícia Cavani Martins de, SACHETE, Aleicho Agnaldo, CORTES, S. A. M. **Avaliação da Eficiência da Estação de Tratamento de Esgoto da Cidade de Cândido Mota-SP**, 2014. XXXII Encontro Nacional dos Estudantes de Química; Universidade Estadual de Maringá

2. ALVES, M. C., MELLO, Patrícia Cavani Martins de, CORTES, S. A. M., FELIX, M., SACHETE, Aleicho Agnaldo. **Determinação do Teor de Nitrogênio, Fósforo e Potássio em Amostras de Água de Rio Submetidas à Lixiviação de Fertilizantes de Áreas Agrícolas**, 2014. XXXII Encontro Nacional dos Estudantes de Química. Universidade Estadual de Maringá

3. GUARNIERI, A. C., MELLO, Patrícia Cavani Martins de, FERREIRA, A. L., SCUDELARI, V. **V. Eficiência da Estação de Tratamento de Efluentes de uma Empresa de Produtos Domissanitários da Cidade de Assis/SP.** XXXII Encontro Nacional dos Estudantes de Química. Universidade Estadual de Maringá
4. RONCON, B., MELLO, Patrícia Cavani Martins de. **Controle de qualidade da água distribuída em escolas municipais da cidade de Candido Mota/SP,** 2013. VI Fórum Científico FEMA. Fundação Educacional do Município de Assis.
5. MELLO, Patrícia Cavani Martins de, ALVES, M. C. **Determinação do teor de nitrogênio, fósforo e potássio em amostras de água de rio submetidas à lixiviação de fertilizantes de áreas agrícolas,** 2013. VI Fórum Científico FEMA. Fundação Educacional do Município de Assis
6. MASCHIO, C., MELLO, Patrícia Cavani Martins de. **Utilização do bagaço de cana-de-açúcar para tratamento de efluentes industriais,** 2013. VI Fórum Científico FEMA: Fundação Educacional do Município de Assis
7. MELLO, Patrícia Cavani Martins de, SANTOS, E. R., ZARDETTO, L. **Caracterização Química e Microbiológica de Lodo de Esgoto com Fins de Fertilização,** 2012. IV Encontro Nacional de Química Ambiental: Universidade Estadual de Londrina.
8. MELLO, Patrícia Cavani Martins de, MARCHI, M. R. R. **Determinação de fármacos e hormônios por HPLC com detecção por FLU,** 2012. Evento: XIV Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas. Instituto Internacional de Cromatografia
9. MELLO, Patrícia Cavani Martins de, COSTA, E. G. C. **Utilização do policloreto de alumínio na clarificação de água de abastecimento,** 2012. IV Encontro Nacional de Química Ambiental. Universidade Estadual de Londrina.
10. MELLO, Patrícia Cavani Martins de. **Ocorrência de alteradores endócrinos e fármacos nas águas de abastecimento público e ETE, em duas cidades da área de abrangência das UGRHI-21 e 22, 2011.** IV Fórum Científico. Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis.
11. GUIDA, H. L., José Antonio Cassiano, MELLO, Patrícia Cavani Martins de **Perfil Audiológico dos Funcionários do Setor de Atividades Auxiliares da UNESP Campus de Marília - SP,** 2010. Curso de Extensão em Higiene Ocupacional. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

12. MELLO, Patrícia Cavani Martins de, YABE, Maria Josefa dos Santos, MENEGON, E. A. **S. Caracterização Bioquímica de Microrganismos Rizosféricos de Solo Tratado com Diuron**, 2009. IV Simpósio de Microbiologia Aplicada; Instituto de Biociências

13. MELLO, Patrícia Cavani Martins de, LOBO, I., YABE, Maria Josefa dos Santos. **Validação de um método por CLAE para determinação de Diuron e seus metabólitos em solo de cultivo de cana de açúcar**, 2008. XII Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas. International Institute of Chromatography (I.I.C.)

14. MELLO, Patrícia Cavani Martins de, YABE, Maria Josefa dos Santos. **Biodegradação de Diuron por Microrganismo Isolado de Solo de Cultivo de Cana de Açúcar**, 2005. VIII Encontro de Biociências e Biotecnologia. Departamento de Ciências Biológicas

15. MELLO, Patrícia Cavani Martins de. **Avaliação da Eficiência de Tratamento de Esgoto da cidade de Cândido Mota - SP**, 2003. I Congresso Internacional de Atualização Técnica-Científica Farmácia, Química e Biologia. Instituto Técnico de Controle de Qualidade

16. MELLO, Patrícia Cavani Martins de, SOARES, Elaine Amorim, BUZO, Giseli Cristina, SIMÕES, Fabiano dos Santos, SANTOS JÚNIOR, Vitório dos, SPINOSA, Wilma Aparecida. **Determinação de Lipídios em Alimentos: Comparação entre os Métodos de Soxhlet e Hidrólise Ácida**, 2003. 5º Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

17. SOARES, Elaine Amorim, CASTRO-GOMEZ, R. J. H., MELLO, Patrícia Cavani Martins de, SANTOS JÚNIOR, Vitório dos, SPINOSA, Wilma Aparecida, ZILIOLI, Estevão, CUNHA, Mario Antonio Alves da. **Eficiência de Anti-Fúngico Biológico no Controle de *B. cinerea* em Uvas: Aplicação *in vitro* e *in vivo*.**, 2003. 5º Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos

18. LIOTTI, Ravena Graziela, ZILIOLI, Estevão, OLIVA NETO, Pedro, SPINOSA, Wilma Aparecida, SANTOS JÚNIOR, Vitório dos, SOARES, Elaine Amorim, MELLO, Patrícia Cavani Martins de. **Estudo Cinético com Linhagens de *Acetobacter sp.* em Meios com Diferentes Concentrações de Etanol e Ácido Acético**, 2003. 5º Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos

19. SANTOS JÚNIOR, Vitório dos, ZILIOLI, Estevão, SPINOSA, Wilma Aparecida, SOARES, Elaine Amorim, MELLO, Patrícia Cavani Martins de, LIOTTI, Ravena Graziela, OLIVA NETO, Pedro, YOKOYA, Fumio. **Estudo dos Micronutrientes no Crescimento de**

Bactérias Isoladas de Indústrias de Vinagre, 2003. 5º Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos

20. MELLO, Patrícia Cavani Martins de. **Gerenciamento dos resíduos gerados pelo CEPECI e avaliação do sistema de fossa asséptica**, 2003. XIX Semana de Química. Centro de Ciências Exatas / Departamento de Química

21. SANTOS JÚNIOR, Vitório dos, SPINOSA, Wilma Aparecida, BRUZON, Gilcelene, ZILIOI, Estevão, SIMÕES, Fabiano dos Santos, NIZOLI, Érico Casare, MELLO, Patrícia Cavani Martins de, CORREA, Laura Rita Ferreira

Monitoramento da Qualidade Físico-Química e Microbiológica de Leite Humano Ordenhado em Banco de Leite Humano, no Hospital Regional de Assis - SP, 2001. I Congresso Paulista de Bancos de Leite Humano. Banco de Leite Humano / Centro de Referência do Interior de São Paulo

22. NIZOLI, Érico Casare, MELLO, Patrícia Cavani Martins de, SIMÕES, Fabiano dos Santos, SACHETE, Aleicho Agnaldo, SANTOS JÚNIOR, Vitório dos, SPINOSA, Wilma Aparecida. **Parâmetros de identidade e qualidade de leite produzido na região do Médio Paranapanema, estado de São Paulo**, 2001. II Encontro Maringaense de Biologia / XVI Semana da Biologia;: Centro de Ciências Biológicas

23. SPINOSA, Wilma Aparecida, SIMÕES, Fabiano dos Santos, SANTOS JÚNIOR, Vitório dos, MELLO, Patrícia Cavani Martins de, NIZOLI, Érico Casare
Valor Calórico Total de Refrigerantes Regionais Produzidos no Brasil, 2001. 4º Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos; Faculdade de Engenharia de Alimentos

Demais produções técnicas

1. MELLO, Patrícia Cavani Martins de. **Agrotóxicos em Alimentos**, 2011.

2. MELLO, Patrícia Cavani Martins de. **Ano Internacional da Química**, 2011.

3. MELLO, Patrícia Cavani Martins de. **Higiene e Sanitização para Manipuladores de Alimentos**, 2010.

4. MELLO, Patrícia Cavani Martins de. **Biorremediação**, 2009.

5. MELLO, Patrícia Cavani Martins de. **Meio ambiente: o papel da Universidade**, 2009.

6. MELLO, Patrícia Cavani Martins de. **Uso da Biorremediação para Descontaminação de Ambientes**, 2008.

7. MELLO, Patrícia Cavani Martins de. **Biorremediação**, 2007.

Orientações e supervisões concluídas

Monografias de conclusão de curso de aperfeiçoamento/especialização

1. Erick Rafael dos Santos. Uso de nanopartículas para tratamento de água para abastecimento público. 2015. Monografia (Especialização em Química Ambiental) - Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis.

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. João Lucas Giuni. Análise Físico-Química da Carcaça de Tilápia (*Oreochromis niloticus*). 2014. Curso (Química Industrial) - Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis.

2. Lucas Vicente Igino. Análise Microbiológica e Físico-Química da Água dos Poços Artesianos do Bairro Água da Jacutinga, na Cidade de Andirá/PR. 2014. Curso (Química Industrial) - Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis.

3. Gabriela Aparecida de Araújo Pereira. Pesquisa de corantes orgânicos artificiais em bebidas não alcólicas dos tipos suco, néctar e refresco. 2014. Curso (Química Industrial) - Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis

4. Renata Funchal da Silva Costa. Produção de Biogás a Partir de Vinhaça. 2014. Curso (Química Industrial) - Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis

5. Mauro Fernando Teodoro. Alterações de Qualidade do Solo em Função da Aplicação de Lodo de Esgoto. 2012. Curso (Química Industrial) - Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis.

6. Daniele Gonçalves de Andrade. Avaliação Físico-Química e Microbiológica da Água do Córrego da Cidade de Quatá - SP. 2012. Curso (Química Industrial) - Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis

7. André Jesus Paes. O projeto pH do Planeta como Recurso Didático para o Ensino de Química. 2012. Curso (Química Industrial) - Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis

8. Rafael Luiz da Silva. Utilização de Lodo de Esgoto como Fertilizante para a Cultura de Milho. 2012. Curso (Química Industrial) - Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis

9. Erick Rafael dos Santos. Caracterização química e microbiológica de lodo de esgoto. 2011. Curso (Química Industrial) - Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis

10. Erick Gustavo Correa da Costa. Utilização do policloreto de alumínio na clarificação de água de abastecimento. 2011. Curso (Química Industrial) - Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis.

Iniciação científica

1. Daniele Gonçalves de Andrade. Monitoramento da Qualidade da Água no Balneário Municipal de Quatá. 2012. Iniciação científica (Química Industrial) - Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis

2. Juliana Fatima da Silva. Estimativa de risco de contaminação das águas por agrotóxicos na região do Médio Vale Paranapanema. 2011. Iniciação científica (Química Industrial) - Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis

Para minha mãe.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e luz nesta difícil caminhada em busca de uma realização profissional.

A minha mãe, por todo amor dedicado a mim e meus irmãos. À senhora devoto tudo que sou. Sempre será meu maior exemplo na vida.

Para meus irmãos, meu pai, meus cunhados e sobrinhos, que orgulhosos desfrutam deste momento comigo. Amo vocês.

Para Vânia, minha companheira. Obrigada por todo carinho e apoio dados neste momento tão importante da minha vida.

A vocês devoto meu mais intenso amor

À minha orientadora Mary Rosa Rodrigues de Marchi, profissional brilhante e dedicada, exemplo de gentileza e comprometimento. Quero agradecer profundamente pela oportunidade de trabalhar contigo, pela compreensão, paciência, confiança e por todos ensinamentos que me deu.

Ao amigo Pedro Toledo, que muitas vezes foi meu “anjo da guarda do HPLC”. Te desejo todo sucesso pessoal e profissional. Conte comigo sempre.

Aos amigos que conquistei no Grupo de Estudos em Saúde Ambiental e Contaminantes Orgânicos (GRESO) e no departamento de química analítica do IQ: Renato, Débora, Guilherme, Natalie, Lucy, Lillian, Mariana, Daiana e Demétrio. Vocês são o que realmente pode se chamar de grupo de trabalho.

Aos funcionários da seção técnica de pós graduação, em especial Wennia Limonti, Célia Coelho e Sandra Regina Pavanelli. Obrigada por toda orientação necessária ao cumprimento das normas do programa de pós-graduação em química da UNESP.

Às funcionárias Valéria Aparecida Moreira Novelli e Maria Isabel Uthman Sitta, da Biblioteca do Instituto de Química pelas correções e orientações na construção das referencias bibliográficas desta tese.

À banca de avaliação pelas valiosas contribuições, especialmente à profa Dra Maria Lúcia Ribeiro e Luciana Polese.

A todos que de alguma forma colaboraram com este trabalho.

MEU ETERNO AGRADECIMENTO.

Nós nunca sabemos a que altura estamos até sermos impelidos a mostrá-la. E se cumprirmos o plano, nossa altura chega ao céu. Se não impedíssemos a nós mesmos por medo de sermos reis.

Emily Dickinson

RESUMO

A presença de compostos farmacêuticos e estrógenos nos ambientes aquáticos está bem relatada na literatura Mundial. No Brasil, os estudos sobre a ocorrência de fármacos em mananciais de abastecimento são quase inexistentes e os referentes aos estrógenos ainda não atingiram áreas mais interiores, como as do estado de São Paulo. Neste trabalho foi investigada a ocorrência de estriol, 17β - estradiol, 17α -etinilestradiol, atenolol, ciprofloxacino e propranolol em água de rio, visando a avaliação da eficiência do tratamento de água e esgoto na eliminação destas substâncias em duas cidades da área de abrangência da UGRHI 21 (Marília) e 22 (Presidente Prudente). O método incluiu extração em fase sólida (SPE) para água, desenvolvidos com critérios de confiabilidade analítica (exatidão, precisão, seletividade, robustez e avaliação de efeito matriz) seguido de análise por HPLC-FLD em modo de eluição gradiente e coluna C18. Os limites de detecção e quantificação do método variaram de 0,016 a 0,28 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,048 a 1,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. O método apresentou recuperação média e coeficiente de variação entre 97 a 73% e 0,01 a 0,15% respectivamente. Em Marília detectou-se a presença dos estrógenos à montante das ETA's, sendo mais presente o E3 e EE2. Em Presidente Prudente, a detecção aconteceu apenas à montante da ETE para os mesmos analitos. Os fármacos em todos os pontos de coleta, assim como os estrógenos à jusante dos pontos de coleta, no ponto de coleta do Rio do Peixe e na lagoa de captação de Presidente Prudente, estiveram abaixo dos limites de quantificação do método. Dado que é prevista a ocorrência de estrógenos na área de estudo, estudos futuros deverão ser ampliados em termos territoriais em ambas UGRHI's, levando em consideração a sazonalidade e outros compartimentos do recurso hídrico onde possam estar associados, como o material particulado e os sedimentos.

Palavras – chave: estrógenos, fármacos, HPLC-FLD, qualidade da água, esgotos domésticos.

ABSTRACT

The presence of pharmaceutical compounds and estrogens in aquatic environments is well reported in the World literature. In Brazil, studies on the occurrence of pharmaceuticals in drinking water sources are almost non-existent and those related to estrogen have not yet reached the innermost areas, such as the state of São Paulo. In this study, we investigated the occurrence of estriol, 17 β -estradiol, 17 α -ethinylestradiol, atenolol, propranolol and ciprofloxacin in river water in order to evaluate the efficiency of water treatment and sewage in the elimination of these substances in two area towns scope of UGRHI 21 (Marília) and 22 (Presidente Prudente). The method includes solid phase extraction (SPE) for water, developed analytical criteria of reliability (accuracy, precision, selectivity, and robustness assessment matrix effect) followed by analysis by HPLC-FLD C18 column and gradient elution mode. The limits of detection and quantification method ranged from 0,016 a 0,28 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and from 0,048 a 1,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The method showed an average recovery and relative standard deviations between 97-73% and 0.01 to 0.15% respectively. In Marília detected the presence of estrogen to the amount of ETA's, being more present E3 and EE2. In Presidente Prudente, detection happened just upstream of the WWTP for the same analytes. The drugs at all collection points, as well as estrogens downstream of the collection points, in collection point of Rio do Peixe and Presidente Prudente catchment pond, were below the limits and quantification method. Since it is expected the occurrence of estrogens in the study area, future studies should be expanded in territorial terms in both UGRHI's, taking into account the seasonality and other compartments of water resources where they can be associated, such as particulate matter and sediments.

Key-words: estrogens, pharmaceuticals, HPLC-FLD, water quality, wastewater.

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1	Estruturas dos estrógenos de interesse no presente projeto. (a) 17 β -estradiol (E2); (b) 17 α -etinilestradiol (EE2) (c) estriol (E3); (d) estrona (E1).	28
Figura I.2	Estruturas dos fármacos de interesse deste trabalho. (a) ciprofloxacino; (b) atenolol; (c) propranolol.	29
Figura I.3	Rotas de entrada e distribuição dos fármacos no ambiente	38
Figura I.4	Toxicidade aguda de fármacos de uso humano em diferentes organismos aquáticos de níveis tróficos diferentes	43
Figura I.5	Toxicidade crônica de fármacos de uso humano em diferentes organismos aquáticos de níveis tróficos diferentes	44
Figura II.1	Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos 21 – Peixe	49
Figura II.2	Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos 22 – Pontal do Paranapanema	52
Figura I.1	Localização do ponto de coleta (22°19'09,2"S 49°53'54,4"O) da amostra testemunha de água superficial no Rio do Peixe, Marília/SP	65
Figura III.2	Localização do ponto de coleta (22°10'36,1"S 51°28'55,3"O) da amostra testemunha de água superficial no Rio do Santo Anastácio, Presidente Prudente/SP	66
Figura III.3	Método para determinação de estrógenos e fármacos em água superficial	67
Figura IV.1	Cromatograma (HPLC/FLD) obtidos para uma mistura de padrões de 1,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em metanol, sob as condições cromatográficas da Tabela III.1	72
Figura IV.2	Espectro UV, obtido no um espectrômetro UV-Vis HP 8453, utilizando solução 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de estrona em KH_2PO_4 25mM.	72
Figura IV.3	Gráficos de linearidade para os estrógenos (HPLC-FLD).	74
Figura IV.4	Curvas analíticas em metanol obtidas nos meses de Julho/2014 (em azul) e Outubro/2014 (em vermelho) com detecção por FLD	76
Figura IV.5	Cromatogramas (HPLC – FLD) das soluções preparadas em solvente (vermelho), no extrato da matriz (rosa) e amostra testemunha (azul) (cromatogramas separados).	81
Figura IV.6	Cromatogramas (HPLC – FLD) das soluções preparadas em solvente (vermelho), no extrato da matriz (rosa) e amostra testemunha (azul) (cromatogramas sobrepostos).	81
Figura IV.7	Curvas analíticas obtidas em solvente acetonitrila e na matriz água de rio detecção por FLU. Azul – curva no solvente; Vermelho – curva na matriz.	82
Figura IV.8	Coeficientes de variação (CV) obtidos para as análises dos padrões em solvente acetonitrila e no extrato da matriz água.	83
Figura IV.9	Índices pluviométricos publicados pela Defesa Civil Estadual para a cidade de Marília e Presidente Prudente, no período de monitoramento.	87
Figura IV.10	Temperaturas máximas e mínimas e dias com chuva, durante o período de Monitoramento para a cidade de Marília (Fonte:	88

	Defesa Civil de São Paulo)	
Figura IV.11	Temperaturas máximas e mínimas e dias com chuva, durante o período de Monitoramento para a cidade de Presidente Prudente (Fonte: Defesa Civil de São Paulo)	88
Figura IV.12	Porcentagens de ocorrência dos estrógenos na UGRHI 21 (Marília)	90
Figura IV.13	Porcentagens de ocorrência dos estrógenos na UGRHI 22 (Presidente Prudente)	90

LISTA DE TABELAS

Tabela I.1	Concentração dos fármacos encontrados em efluentes, água doce e água subterrânea da América do Norte, Europa e Ásia	31
Tabela I.2	Ocorrência dos fármacos atenolol e propranolol (ng.L^{-1}) em águas superficiais em diferentes localidades	32
Tabela I.3	Propriedades químicas dos estrógenos em estudo	35
Tabela I.4	Propriedades químicas dos fármacos em estudo	37
Tabela II.1	Variáveis de qualidade da Rede Básica (água doce)	48
Tabela II.2	Características populacionais e de uso da água na UGRHI 21	50
Tabela II.3	Descrição dos pontos de amostragem das redes de monitoramento – 2013 na UGRHI 21	51
Tabela II.4	Média das principais variáveis de qualidade de água de 2013 para os pontos de amostragem da UGRHI 21	51
Tabela II.5	Características populacionais e de uso da água na UGRHI 22	53
Tabela II.6	Descrição dos pontos de amostragem das redes de monitoramento – 2013 na UGRHI 22	54
Tabela II.7	Média das principais variáveis de qualidade de água de 2013 para os pontos de amostragem da UGRHI 22	55
Tabela II.8	Perfil das cidades de Marília e Presidente Prudente, quanto às características populacionais e de unidade territorial	56
Tabela III.1	Condições cromatográficas (HPLC/ FLD e UV, Varian LC-920)	60
Tabela III.2	Concentração das soluções padrão mista para detectores FLD e UV.	61
Tabela III.3	Concentrações para construção do gráfico de linearidade e curva analítica	61
Tabela III.4	Data da realização das coletas dos corpos hídricos nas cidades de abrangência da UGRHI 21 e da UGRHI 22	68
Tabela III.5	Descrição e coordenadas geográficas os pontos de amostragem nas cidades de abrangência da UGRHI 21 e da UGRHI 22.	69
Tabela IV.1	Condições cromatográficas empregadas na análise dos fármacos e estrógenos pesquisados.	71
Tabela IV.2	Intervalo de resposta linear e coeficientes angular (a), linear (b) e de correlação (r) instrumentais para análise com detecção por fluorescência.	75
Tabela IV.3	Limites de detecção e quantificação instrumentais, obtidos para o sistema HPLC-FLD utilizado neste trabalho.	76
Tabela IV.4	Valores de recuperação e coeficiente de variação (CV) obtidos para o método de extração SPE utilizando os cartuchos Oasis-MCX e Strata-X.	77
Tabela IV.5	Valores de recuperação e coeficiente de variação (CV) obtidos para o método de extração SPE para água superficial	78
Tabela IV.6	Limites de detecção e quantificação do método para extração de fármacos e estrógenos em amostras de água superficial testemunha coletadas na UGRHI-21 e UGRHI-22	79
Tabela IV.7	Estimativa do efeito da matriz na eficiência da extração de estrógenos e fármacos de água superficial.	83
Tabela IV.9	Concentração dos fármacos e estrógenos naturais e sintético	85

Tabela	obtidos da análise em água na UGRHI 21 (Marília/SP)	
IV.10	Concentração dos fármacos e estrógenos naturais e sintético obtidos da análise em água na UGRHI 22 (Presidente Prudente/SP)	86

SUMÁRIO

	Introdução Geral	23
	Objetivos	25
	Capítulo I: Estrógenos e Fármacos no Ambiente Aquático	26
1.	Introdução	27
2.	A Presença de Estrógenos e Compostos Farmacêuticos em Água	28
3.	Propriedades Físico Químicas Relevantes dos Estrógenos e dos Fármacos para os Estudos de Contaminação Aquática	34
4.	Aporte e Destinos de Estrógenos e Fármacos em Águas Superficiais	37
4.1	Aterros	38
29	Esgoto Sanitário	39
4.3	Uso de Lodo de Esgoto e Dejetos Animais como Condicionadores de Solo	39
5.	Efeitos Tóxicos de Estrógenos e Fármacos aos Organismos	41
	Capítulo II: Qualidade das Águas Superficiais nas UGRHI's 21 E 22	46
1.	Introdução	47
2.	Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos 21 – Peixe	49
3.	Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos 22 – Pontal do Paranapanema	52
4.	Perfil Populacional e de Saneamento das Cidades de Abrangência da UGRHI 21 e 22	56
	Capítulo III: Otimização e Validação de Métodos Analíticos para Determinação de Estrógenos e Fármacos em Amostras de Água Superficial das UGRHI's 21 E 22	58
1.	Materiais e Métodos	59
1.1	Padrões Analíticos, Solventes e Reagentes	59
1.2	Condições Cromatográficas de Análise	59
1.3	Avaliação do Desempenho do Sistema Analítico	60
1.3.1	Faixa de trabalho, linearidade e curvas analíticas	60
1.3.2	Limites de detecção e quantificação instrumental e do método	62
1.3.3	Precisão e exatidão	63
1.3.4	Avaliação do efeito matriz	64
1.4	Obtenção da Amostra Testemunha de Água Superficial	65
1.5	Método para Análise de Estrógenos e Fármacos em Água Superficial	66
1.6	Análise por HPLC/FLU e UV	68
1.6.1	Amostragem	68
1.6.2	Descrição dos Pontos de amostragem	68
	CAPÍTULO IV: Resultados e Discussão	70
1.	Otimização das condições cromatográficas de análise	71

2.	Avaliação da resposta do sistema cromatográfico	73
3.	Otimização e validação de métodos	77
3.1	Avaliação do método de extração	77
3.2	Avaliação do Efeito Matriz	80
4.	Ocorrência de estrógenos e fármacos em duas cidades da área de abrangência da UGRHI 21 e 22	84
4.1	Ocorrência dos Analitos nas Cidades de Marília e Presidente Prudente	84
	CONCLUSÕES	95
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

INTRODUÇÃO GERAL

O lançamento de efluentes domésticos sem tratamento inviabiliza diversos usos humanos dos ecossistemas aquáticos continentais. Essa redução do potencial de uso é decorrente da degradação ecológica (redução da diversidade de espécies biológicas) e sanitária (redução da qualidade da água para o uso humano) causada pelo aporte de esgotos nos rios e lagos (MAROTA, SANTOS, ENRICH-PRAST, 2008)

A poluição das águas gerada por esgoto sanitário, efluentes industriais e contaminação difusa (urbana e agrícola) pode ser avaliada por indicadores químicos e biológicos (ANDREOLI, 2000). Dentre os indicadores químicos, fármacos, desreguladores endócrinos (dentre eles, os estrógenos) e poluentes orgânicos persistentes (POP's) são classes de substâncias muito investigadas devido, principalmente, aos seus efeitos sobre a biota aquática (BILA e DEZOTTI, 2007). Fármacos e estrógenos, de um modo geral, não são contemplados pela legislação brasileira.

A lei 7663/91 que estabelece a Política Estadual de Recursos Hídricos divide o estado de São Paulo em 22 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHI's) (SÃO PAULO, 1991). Dentre as 22 UGRHI's, tem-se a UGRHI 21, denominada Peixe e a UGRHI 22, denominada Pontal do Paranapanema. Nelas as principais cidades, em termos de industrialização e volume populacional, são Marília e Presidente Prudente, respectivamente. As águas superficiais destas UGRHI's são avaliadas pela Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), observando-se que a maioria dos alteradores endócrinos e fármacos não estão incluídos nos parâmetros de qualidade observados (CETESB, 2013).

Diante desse contexto, neste trabalho foram realizados estudos analítico e ambiental para avaliar a ocorrência de estrógenos e fármacos em água de rio, visando a avaliação da eficiência do tratamento de água e esgoto na eliminação destas substâncias.

Nesta tese, no capítulo I, serão abordados aspectos gerais relacionados aos estrógenos e fármacos no tocante à sua presença nos corpos d'água, propriedades físico químicas relevantes, aporte e comportamento no ambiente bem como toxicidade em organismos.

No capítulo II serão apresentados e discutidos dados históricos referentes à qualidade das águas superficiais nas UGRHI's que são objeto de estudo deste trabalho.

No capítulo III, serão apresentados os procedimentos de otimização e validação de métodos analíticos para determinação de estrógenos e fármacos na água, com rigor analítico necessário para garantir a confiabilidade dos resultados gerados neste estudo.

Por fim, no capítulo IV, serão abordados os aspectos do estudo da ocorrência de estrógenos e fármacos nos compartimentos aquáticos por meio da análise de água de corpos hídricos receptores de efluente tratado e *in natura* em diferentes períodos.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a ocorrência de alteradores endócrinos e fármacos, em água de rio em dois municípios do Estado de São Paulo, de importância regional, e que possuem infraestrutura de saneamento básico distintas.

Como objetivos específicos destacam-se:

- Otimizar e validar método para determinação dos fármacos propranolol, atenolol e ciprofloxacina, simultaneamente à análise de estrógenos naturais estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e estriol (E3) bem como do sintético 17 α -etinilestradiol, em água de rio;

- Diagnóstico quali e quantitativo da presença dos contaminantes em água de rio, a montante e a jusante ETE e ETA das cidades de Marília e Presidente Prudente, que possuem destaque sócio-econômico nas unidades de gerenciamento de recursos hídricos (UGRHI) 21 – Peixe e da UGRHI 22 – Pontal do Paranapanema, respectivamente.

- Com os dados obtidos, inferir a influência dos processos de tratamento na eficiência na retirada dos contaminantes estudados.

CAPÍTULO I

ESTRÓGENOS E FÁRMACOS NO AMBIENTE AQUÁTICO

1. Introdução

A presença de compostos farmacêuticos no ambiente pode representar uma ameaça a vida humana e selvagem. Assim como outras substâncias antropogênicas, o sistema aquático se tornou o destino final destas substâncias, sendo encontradas em sistemas de tratamento de efluentes, águas superficiais e de abastecimento público. Até o momento, mais de 100 fármacos e produtos de higiene pessoal foram detectados em efluentes de sistemas de tratamento de água em diversos países da União Européia (FERNÁNDEZ, 2010). Desde o ano 2000 uma grande quantidade de estudos e revisões tem sido feitas no mundo todo, tendo a maioria conclusões muito similares:

- produtos farmacêuticos são detectados em águas superficiais na faixa de ng L^{-1} , anteriormente essa verificação não era possível devido às técnicas empregadas;
- a principal fonte dos produtos farmacêuticos no ambiente é a excreção de humana ou animal, embora descartes incorretos e efluentes e resíduos industriais não devam ser desconsiderados (TAYLOR, SENAC, 2014).

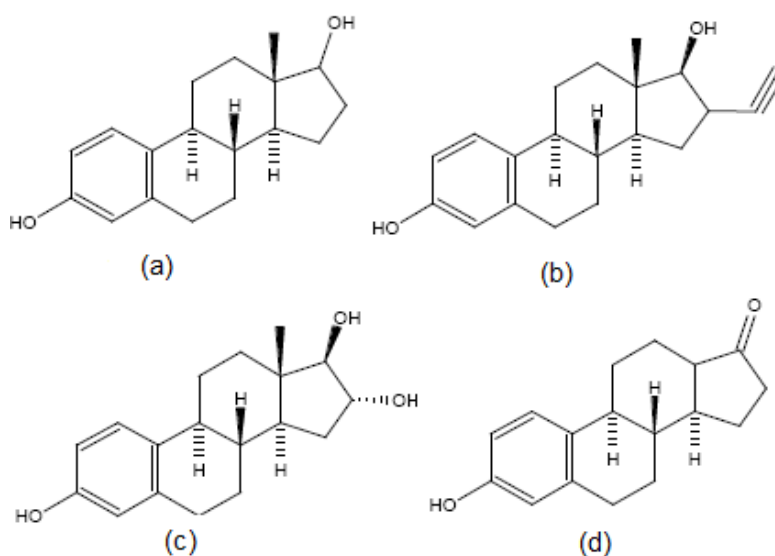
Revisões da literatura mostram que aproximadamente 160 fármacos (de uso humano e veterinário) e 30 subprodutos têm sido estudados recentemente (MOMPELAT *et al*, 2009). Estes compostos estão subdivididos em 24 classes terapêuticas, sendo quatro dominantes em termos referenciais. Aproximadamente 40% dos estudos focam em antiinflamatórios não esteroidais (AINE's) e 25 a 30% evidenciam anticonvulsionantes, antibióticos e reguladores lipídicos. Os AINE's são essencialmente representados pelo acetaminofeno e diclofenaco. O genfibrozil é o regulador lipídico mais estudado (MOMPELAT *et al*, 2009).

Além disso, nos últimos 10 anos, muitos compostos sintéticos, assim como substâncias naturais (provenientes do metabolismo animal, humano e vegetal) presentes no ambiente aquático natural parecem afetar as funções hormonais de organismos aquáticos. Entre estas substâncias, os hormônios sexuais esteroidais (estrógenos e progestrogênios) usados difundidamente com propósito medicinal, exibem as mais altas atividades estrogênicas, sendo considerados potentes alteradores endócrinos (KUSTER, 2009).

Os desreguladores endócrinos incluem hormônios sintéticos e naturais, substâncias naturais e uma grande quantidade de substâncias sintéticas amplamente utilizadas pela sociedade moderna, com estruturas distintas (KUHNEN et al., 2009), que ao interagir com um receptor hormonal altera uma resposta natural do sistema endócrino (YAN et al, 2010). Sendo assim, um estrógeno pode atuar como um alterador endócrino.

Estrógenos são hormônios esteroidais que desempenham um importante papel na fisiologia humana, incluindo, entre outros, funções reprodutivas femininas e a regulação do crescimento de tecidos e ossos. Os estrógenos de ocorrência mais comum são a estrona – E1, o 17 β -estradiol – E2, o 17 α -etinilestradiol – EE2 e o estriol – E3, produto de degradação de estrona e estradiol (Figura I.1). Amplamente empregados em contraceptivos, são frequentemente encontrados nas águas superficiais.

Figura I.1: Estruturas dos estrógenos de interesse neste trabalho. (a) 17 β -estradiol (E2); (b) 17 α -etinilestradiol (EE2) (c) estriol (E3); (d) estrona (E1).



2. A Presença de Estrógenos e Compostos Farmacêuticos em Água

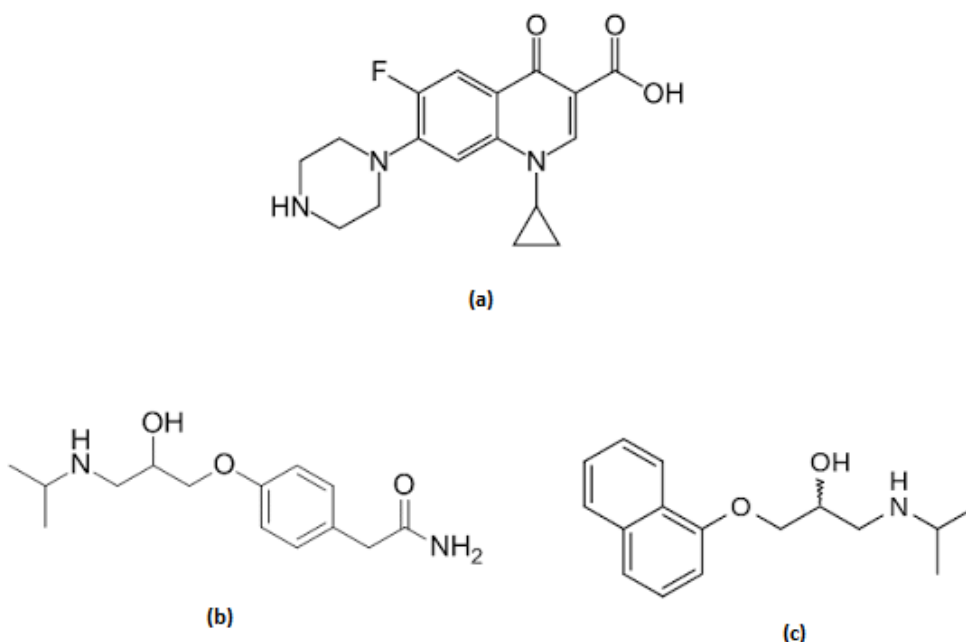
Os medicamentos de uso mais comum na América do Norte, Ásia e Europa são: analgésicos/anti-inflamatórios, reguladores de pressão arterial (β -bloqueadores / diuréticos), estimulantes, estrogênios e antiepiléticos . Entre estas classes de

medicamentos alguns são bem conhecidos: diclofenaco, ibuprofeno, amoxilina, ciprofloxacino, atenolol, propranolol, cafeína, 17 α - etinilestradiol e carbamazepina (LI, 2014). A presença e comportamento destes compostos nos recursos hídricos tem sido investigados amplamente.

O ciprofloxacino é um antibiótico da classe das fluorquinilonas que tem sido usado para extensivamente em cuidados com a saúde humana e animal. Este composto tem sido detectado em efluentes sanitários, estações de tratamento de esgoto e águas superficiais na ordem de ng a $\mu\text{g.L}^{-1}$.

O atenolol e o propranolol são denominados fármacos de uso contínuo, utilizados para o tratamento de doenças crônicas, como a hipertensão. São beta-bloqueadores (BB), também chamados de antagonistas beta-adrenérgicos. Constituem um dos medicamentos mais prescritos para tratar perturbações do ritmo cardíaco, angina de peito, hipertensão, taquicardia ou infarto agudo do miocárdio. Estes fármacos tem sido detectados nos sistemas aquáticos da América do Norte e da Europa. A Figura I.2 apresenta as estruturas dos fármacos de interesse deste projeto.

Figura I.2: Estruturas dos fármacos de interesse deste trabalho. (a) ciprofloxacino; (b) atenolol; (c) propranolol.



A Tabela I.1 sumariza alguns dados da literatura sobre a ocorrência de fármacos em água superficial, sistemas de tratamento de lodo de esgoto, sistemas de tratamento de esgotos e água subterrânea.

Os fármacos mostrados na Tabela I.1 são os que apresentam maior frequência de detecção em efluentes, águas superficiais e águas subterrâneas, nas regiões consideradas no artigo. Alguns compostos diminuem sua concentração, para a estação de tratamento de esgoto, à água subterrânea e às fontes de água doce. Isto provavelmente acontece em função de processos como biotransformação, fotólise, sorção, volatilização e dispersão, que atenuam a concentração dos fármacos na superfície. Sendo assim, as concentrações de fármacos em efluentes são geralmente maiores.

Tabela I.1: Concentração dos fármacos encontrados em efluentes, água doce e água subterrânea da América do Norte, Europa e Ásia (Fonte: LI, 2014).

Fontes		Faixa de concentração (ng.L ⁻¹)										Limite de exposição de efeito deletério* (ng.L ⁻¹)	
Localização		América do Norte					Europa			Ásia			
		Efluente (estação de tratamento de esgoto)	Rios	Água subterrânea	Efluente (estação de tratamento de esgoto)	Rios	Água subterrânea	Efluente (estação de tratamento de esgoto)	Rios	Água subterrânea			
Antibióticos													
Trimetoprina	2550	145	18	39	59,9							1000	
Ciprofloxacino		77	0,28	499	nd						40	20	
Sulfametaxazol	310	170	458	185	33					397	4330	3	20000
Analgésicos													
Naproxeno	1550	555			80,5								37000
Ibuprofeno		203	3,97		468					1600	30		5000
Acetaminofeno			1890		40								9200
Quetoprofeno		16		940	293					128	620		1,56.10 ⁶
Diclofenaco	4200			740	794					1760	62		10000
Ácido salicílico					184								11200
Antiepiléticos													
Carbamazepina	1550	735	420	150	366					3600	120		25000
Estimulantes													
Cafeína			290	300	568					4500	3180		
Referência	Brown et al., 2006	Gibs et al., 2013	Van Stempvoort et al., 2013	Martin et al., 2012	Calderón- Preciado et al.,	Loos et al, 2010	Sim et al., 2011	Chang et al., 2008	Hoa et al., 2011				
	Terzic et al., 2008	Kleywegt et al., 2011	Fram e Belitz, 2011	Al Aukidy et al., 2012	2011 López- serna et al., 2012		Fang et al., 2012						

*O limite de exposição de efeito deletério, é tido como um valor padrão entre aquele em que se observa efeito à espécies mais sensíveis e a concentração onde não é observado efeito .

É interessante observar que alguns compostos, como o ciprofloxacino e a trimetropina foram detectados em águas subterrâneas e superficiais, respectivamente, em concentrações bem acima daquelas estabelecidas como sendo limite de exposição de efeito deletério.

A ocorrência dos β -bloqueadores atenolol e propranolol também foi bastante estudada em águas superficiais, em diversas localidades, como demonstrado na Tabela I.2.

Tabela I.2: Ocorrência dos fármacos atenolol e propranolol (ng.L^{-1}) em águas superficiais em diferentes localidades.

País	Período de estudo	Atenolol	Propranolol	Referência
Itália				
Rio Po	2001	33/42	na	Calamari et al. (2003)
Rio Lambro	2001	241	na	
Reino Unido				
Sudoeste da Inglaterra	2002	na	29/115	Ashton et al. (2004)
Rio Taff	2007	5/560	< LQ/ 40	Kasprzyk-Hoderm et al. (2009)
Rio Eli	2007	<LQ/ 510	< LQ/ 74	
Espanha				
Bacia do Rio Ebro	2005 – 2006	241/465	5/63	Gros et al. (2007)
Suécia				
Rio Hölje	2002	10/60	60/70	Bendz et al. (2005)
Argentina				
Bacia do Rio Súquia	2011 – 2012	9/581	< LD	Valdéz et al. (2014)
Tailândia				
Rio Chao Phraya	2011 – 2012	22/101	na	Tewari et al. (2013)
na = não analisado				

na = não analisado

Há poucas informações na literatura sobre a presença de compostos farmacêuticos em países em desenvolvimento com economias emergentes. É previsível que estes compostos sejam detectados em áreas urbanizadas da América Latina, dada a falta de controle sobre a comercialização e uso de medicamentos, assim como a ausência de limites máximos permitidos pela legislação de qualidade de recursos hídricos, como é o caso do Brasil. Estudos são necessários para investigar a concentração de fármacos presentes em ambientes aquáticos nestas regiões para determinar o efeito potencial destas substâncias em regiões com

populações consideravelmente crescentes e com sistemas de tratamento de água menos avançados (CAMACHO- MUNÕS, 2009).

De acordo com a revisão da literatura realizada, ainda existem poucos estudos no Brasil relatando a ocorrência de fármacos no ambiente e seus possíveis efeitos, na biota tendo sido a maioria deles realizados em países desenvolvidos (TORRES et al., 2012).

Em 1997, antilipêmicos, antiinflamatórios e alguns metabólitos foram detectados em esgoto, em efluente de ETE e em águas de rios no estado do Rio de Janeiro por Stumpf et al. (1999). A concentração média, nos efluentes da ETE, da maioria dos fármacos investigados esteve na faixa de 0,1 a 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Nos rios, as concentrações médias situaram-se entre 0,02 e 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$, como consequência da remoção incompleta dos fármacos durante sua passagem pela ETE e pelo descarte de esgoto *in natura*. A taxa de remoção de fármacos individuais durante a passagem pela ETE variou de 12 a 90%. Em outro estudo também relacionado ao Brasil, realizado por Ternes et al. (1997), foram encontrados estrogênios naturais e contraceptivos sintéticos na ETE da Penha/RJ. Em esgoto bruto, os estrogênios 17 β -estradiol e estrona foram detectados nas concentrações de 0,021 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. As taxas de remoção de estrona observadas foram de 67% para o efluente tratado em filtro biológico e 83% para o efluente tratado pelo processo de lodos ativados. Para o 17 β -estradiol, estas taxas foram de 92 e 99,9% para o efluente tratado em filtro biológico e para o efluente tratado pelo processo de lodos ativados, respectivamente. Para o estrogênio contraceptivo 17 α -etinilestradiol, as taxas de remoção na ETE foram de 64 e 78% para o efluente do filtro biológico e para o efluente do tanque de lodo ativado.

Em um levantamento apresentado em Souza *et al* (2008) sobre as concentrações dos estrogênios em afluente e efluente de ETE e em águas superficiais e potáveis de vários países, é observado que o Brasil tem apresentado altas concentrações de E1 e E2 nas águas superficiais. Altos valores também são encontrados em água de abastecimento público. Todos os valores do levantamento estão bem acima daqueles encontrados em países da União Européia e da América do Norte. As altas densidades populacionais, as características físico-químicas das águas brasileiras, o clima e os sistemas de tratamento de água e esgoto empregados são

fatores que parecem influenciar nas concentrações dos compostos nas matrizes estudadas. No Brasil, os estudos sobre a presença e efeitos dos estrógenos no ambiente são recentes.

O primeiro estudo brasileiro sobre estrógenos em matrizes ambientais foi realizado em 1997, no Rio de Janeiro, por Ternes *et al.* (1999). Depois deste, pode-se encontrar estudos desenvolvidos em Campinas por Ghiselli (2006), Raimundo (2007), em Jaboticabal por Lopes (2007), em Campo Grande (MS) por Souza (2008), em São Carlos por Reis Filho (2008), em Barueri por Silva (2009), em São José do Rio Preto por Cordeiro (2009) e em 14 municípios integrantes da UGRHI 13 por Moura (2009).

3. Propriedades Físico Químicas Relevantes dos Estrógenos e dos Fármacos para os Estudos de Contaminação Aquática

Nos estudos de contaminação ambiental é importante relacionar características físico-químicas das substâncias com características do ambiente, dadas as possíveis previsões de destino e impacto ambiental. Os fármacos geralmente possuem algumas características que os tornam diferentes dos poluentes convencionais e isto deve estar bem elucidado no momento do planejamento dos experimentos de investigação da ocorrência de fármacos no meio ambiente.. Algumas destas características são:

- Tendência dos compostos originais e seus sais de formar polimorfos no estado sólido: moléculas polimorfas e pseudopolimorfas, como solvatos e hidratos, normalmente diferem quanto às propriedades de biodisponibilidade, solubilidade, taxa de dissolução, estabilidade química e física, ponto de fusão, cor, filtrabilidade, densidade e viscosidade;
- Introdução ao ambiente após o metabolismo humano: compostos normalmente são metabolizados a formas menos polares e derivados solúveis que possuem atividade farmacológica reduzida e excreção mais rápida. Os fármacos podem ser excretados como:
 - Suas estruturas originais;
 - Glucoronídeo ou sulfato conjugado;
 - Metabólito majoritário;

- Uma mistura complexa de metabólitos.
- Estruturas químicas grandes e complexas: os fármacos variam significativamente em relação ao peso, grupos funcionais, formas salinas, polimorfos, etc;
- Possuir nas suas formas ionizadas vários sítios de ionização: a presença de heteroátomos e a composição multifuncional dos fármacos os tornam relativamente polares e ionizáveis, propriedades estas que são significativamente dependentes do pH da solução. Sendo assim, o coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) deve ser avaliado cuidadosamente. As mudanças nas cargas dos compostos influenciam também o estado iônico das substâncias, emparelhamento iônico e mecanismos de complexação. (KUMMERER, 2008 pag 23)

Acredita-se que as propriedades físico-químicas importantes no comportamentos dos fármacos no ambiente são a solubilidade em água, pressão de vapor, coeficientes de partição octanol-água (K_{ow}) e constante de dissociação em água (pK_a) (KUMAR, 2010).

A Tabela I.3 apresenta algumas propriedades químicas dos estrógenos incluídos neste estudo.

Tabela I.3: Propriedades químicas dos estrógenos em estudo (PIETRO, 2008; YIING *et al*, 2002, GAMA e NOGUEIRA, 2011)

Estrógeno	Log K_{ow}	pK_a	Pressão de Vapor (Pa)	Solubilidade em água (mg.L ⁻¹)
Estrona	3,43	10,3	$3,1 \cdot 10^{-8}$	13
Estriol	2,81	-	$8,9 \cdot 10^{-13}$	13
17 β -estradiol	3,94	10,4	$3,1 \cdot 10^{-8}$	13
17 α -etinilestradiol	4,15	10,4	$6,0 \cdot 10^{-9}$	4,8

A natureza hidrofóbica de alguns estrógenos, baseados nos seus valores de K_{ow} , favorece a ocorrência de reações de adsorção no material em suspensão. Assim, em estações de tratamento de água ou esgoto, é esperado que técnicas de separação mecânica, como a sedimentação, promovam uma remoção significativa de vários

compostos orgânicos e enriqueçam o lodo de esgoto com estes compostos (SODRÉ *et al*, 2007). Por possuírem baixas pressões de vapor, não são voláteis e se encontram na forma neutra no meio natural, já que seus valores de pK_a estão próximos de 10. Em suas estruturas existem anéis aromáticos e grupos hidroxila e/ou cetônicos e portanto a extração destes analitos das amostras de interesse podem estar governadas por interações hidrofóbicas, troca de cátions ou pontes de hidrogênio, dependendo das características do extrator selecionado (PIETRO, 2008)

O K_{ow} para compostos orgânicos dá uma idéia geral de como um produto químico será distribuído no meio ambiente. Valores de K_{ow} representam a tendência de partição do produto químico entre uma fase orgânica (i.e. peixes, solo) e uma fase aquosa. Produtos químicos com valores baixos K_{ow} (ie < 10) podem ser considerados relativamente hidrofílicos, ou seja, eles tendem a ter alta solubilidade na água, pequenos coeficientes adsorção solo/sedimento, e fatores de bioconcentração pequenos para a vida aquática. Por outro lado, produtos químicos com altos valores K_{ow} (ie $> 10^4$) são muito hidrofóbicos. Em geral, um valor elevado significa que um produto químico tende a estar em um ambiente orgânico (não-polar) e não na água. É claro que o K_{ow} está estreitamente correlacionado a solubilidade dos compostos químicos em água e são desta maneira, as duas mais importantes propriedades físico-químicas relacionadas ao comportamento ambiental das moléculas (KUMAR, 2010).

Fármacos podem ser constituídos de uma combinação de grupos funcionais polares, apolares e ionizáveis. Para fármacos com grupamentos ionizáveis, o pK_a estabelecerá a porção protonada ou deprotonada existente conforme o pH do meio. Quando os valores de pH do meio forem menores que o pK_a do composto, o grupo funcional existirá predominantemente na forma neutralizada, do contrário o grupo funcional estará predominantemente ionizado (LORPHENSRI *et al*, 2006).

A Tabela I.4 apresenta algumas propriedades químicas dos fármacos deste estudo.

Tabela I.4: Propriedades químicas dos fármacos em estudo (LORPHENSRI *et al*, 2006; JOHNSON *et al*, 2006, KUMAR, 2010, KÜMMERER, 2008)

Fármaco	Log K _{ow}	pK _a	Pressão de Vapor (Pa)	Solubilidade em água (mg.L ⁻¹)
Acetaminofeno	0,46	9,38	$1,9 \cdot 10^{-5}$	$1,3 \cdot 10^4$
Atenolol	0,16	9,60	-----	267*
Cafeína	0,01	13,0	$1,3 \cdot 10^{-6}$	$2,0 \cdot 10^4$
Ciprofloxacino	- 1,74	6,09	$3,80 \cdot 10^{-11}$	$3,0 \cdot 10^4$
Diclofenaco	0,7 – 4,5	4,15	$8,19 \cdot 10^{-6}$	2,4
Propranolol	0,78 -3,5	9,5	$4,37 \cdot 10^{-6}$	$1,0 \cdot 10^4$

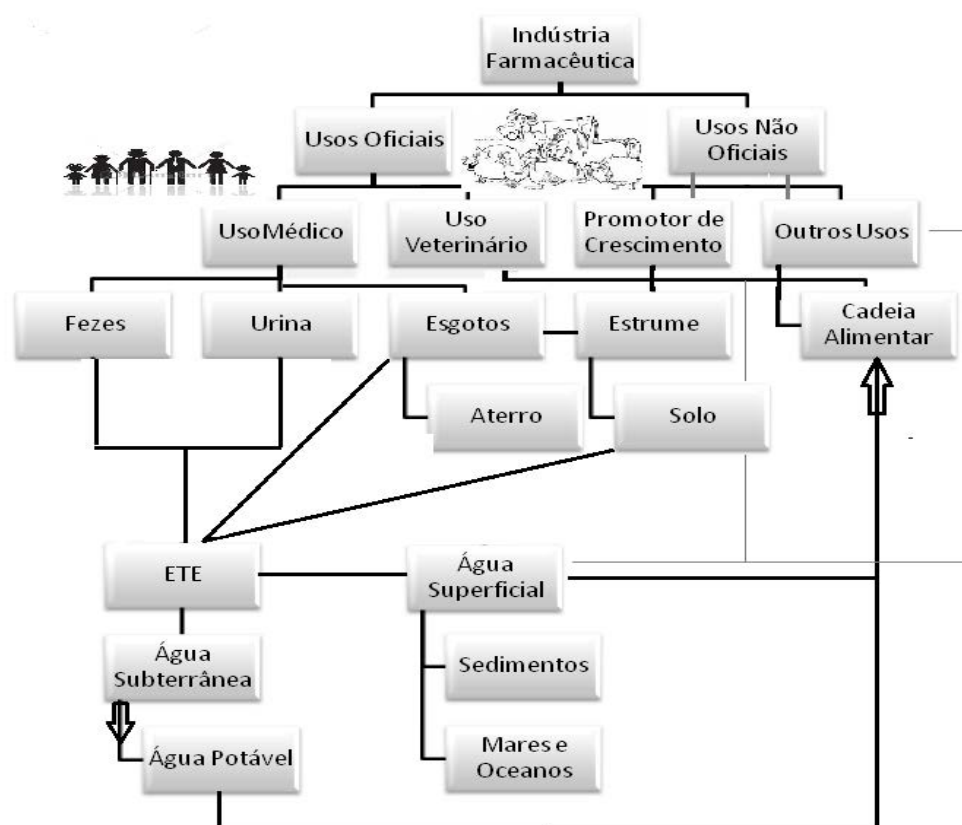
*Valores expressos em g.L⁻¹.

A presença de fármacos em ETE's nos últimos anos tem sido relatada. Em alguns sistemas de tratamento os níveis de concentração do acetaminofeno aparecem acima de $85 \mu\text{g L}^{-1}$, com porcentagens de eliminação menores que 20%. A concentração de fármacos no ambiente, sua evolução temporal e possíveis efeitos sinérgicos e antagonistas dependem não somente das vazões das estações, mas também de condições geográficas e climáticas. Por isso é necessário relacionar estes fatores para se avaliar os efeitos negativos destes fármacos no ambiente (SANTOS *et al*, 2005).

4. Aporte e Destinos de Estrógenos e Fármacos em Águas Superficiais

As fontes de fármacos no meio ambiente podem ser divididas em dois tipos: pontuais e difusas. As fontes pontuais são caracterizadas como efluentes industriais e de hospitais e clínicas, estações de tratamento de esgoto doméstico, tanques sépticos, etc (LI, 2014). As fontes difusas são difíceis de serem localizadas, pois a distribuição acontece ao longo de extensas regiões geográficas, como por exemplo, provenientes do run-off de dejetos de animais em áreas de pecuária, ou de sistemas de tratamento de esgotos domésticos. A figura I.2 ilustra vias de entrada e distribuição de fármacos no ambiente.

Figura 1.3: Rotas de entrada e distribuição dos fármacos no ambiente (KÜMMERRER, 2008).



As principais fontes pontuais são os aterros sanitários, os dejetos de animais, os resíduos de piscicultura, os efluentes de hospitais, os efluentes industriais e os resíduos domésticos. Os principais locais de recepção dos fármacos no ambiente, por sua vez, são o solo, as águas superficiais e subterrâneas (LI, 2014).

4.1 Aterros

Os aterros municipais se enquadram como uma fonte de compostos diversos. O lixo depositado neles contém substâncias que podem afetar negativamente o ambiente. Estas substâncias podem ser lixiviadas, junto com compostos orgânicos, metais pesados e outras substâncias. Um estudo desenvolvido por Buszka et al (2009), mostrou que diversos tipos de contaminantes como hormônios, fármacos e retardantes de chama, estão presentes em poços de monitoramento. Barnes et al. (2004) encontraram resultados similares, verificando que as concentrações de

fármacos são mais altas quanto maior a proximidade do aterro, pois estão associadas à matéria orgânica que percola pelo solo e atinge as águas subterrâneas.

4.2 Esgoto Sanitário

Os esgotos são um dos principais contribuintes para o enriquecimento do meio aquático com fármacos. Existem muitos estudos nos Estados Unidos, Reino Unido, Espanha e Austrália, que mostram a presença de dezenas fármacos, como anti-inflamatórios, antibióticos e antiepilêpticos, sendo encontrados nos esgotos (LI, 2014), sendo que as faixas de concentração vão de ng L^{-1} até $\mu\text{g L}^{-1}$. De fato os esgotos domésticos recebem diversos tipos de substâncias oriundas de diversos locais, por exemplo, residências, indústrias e hospitais.

Grande parte das águas residuárias chega às estações de tratamento através dos sistemas de coleta de esgoto. Entretanto em regiões onde não se observa coleta de esgoto, os resíduos sanitários entram em contato direto com os corpos d'água.

Os sistemas de coleta de esgoto têm sido considerados como uma das principais rotas de entrada de fármacos no ambiente aquático (TERNES, 1998). Os efluentes de hospitalares e os resíduos industriais também contribuem para o enriquecimento dos esgotos com estes tipos de substâncias. Gómes et al. (2006) encontraram mais de 16 fármacos, incluindo anti-inflamatórios e anti-epiléticos nas águas residuárias de um hospital. Outros estudos verificaram que a remoção dos fármacos nas estações de tratamento é incompleta, ao serem analisadas amostras de água coletadas antes e depois do tratamento (VIENO et al, 2007, SNYDER, 2008, BUENO et al. 2012, GAO et al. 2012).

4.3 Uso de Lodo de Esgoto e Dejetos Animais como Condicionadores de Solo

Os solos também podem ser afetados pela presença de fármacos, quando do uso sobre os mesmos de águas residuárias e lodos de esgotos para irrigação e fertilização, respectivamente. Este fator foi bastante estudado em países como a China e a Tunísia (WU et al., 2010; FENET, 2012; DURÁN-ALVAREZ et al., 2012).

Os contaminantes orgânicos também aparecerem no solo e na água através de contaminação difusa. Podem ser citados quatro principais tipos de contaminação difusa: as fossas sépticas, os biossólidos usados em fertilização agrícola; a recarga artificial de aquíferos e ainda a interface existente entre a água superficial e a água subterrânea (LI, 2014).

De acordo com um estudo recente, desenvolvido por Godfrey et al. (2007) existem 22 tipos diferentes de fármacos que podem ser detectados em tanques sépticos e outros 18 que estão acima dos limites de detecção dos métodos utilizados, sendo a cafeína o principal deles. Ibuprofeno, paracetamol, ácido salicílico e triclosan estão entre os principais fármacos encontrados nestes locais (CARRARA et al., 2007; GODFREY et al., 2007; CONN et al., 2007). O problema se torna mais delicado onde as águas subterrâneas estejam próximas da superfície, quando as fossas sépticas poderão contribuir mais significativamente com a entrada das substâncias.

A aplicação de lodo de esgoto para fertilização do solo tem se tornado comum na América. Estima-se que dos 8 milhões de toneladas de lodo de esgoto produzido, metade tenha sido aplicado ao solo, já que este contém diversos nutrientes importantes para áreas agrícolas (KINNEY, 2008). Como já mencionado, muitos contaminantes não são completamente removidos dos sistemas de tratamento de esgotos, o que torna o uso agrícola do lodo de esgoto uma fonte de contaminação difusa do ambiente com fármacos e seus metabólitos. A cafeína, carbamazepina e tiabendazol, estão entre os fármacos mais encontrados em lodos de esgotos usados em fertilização (LAPWORTH et al., 2012)

A recarga artificial de aquíferos, processo onde se abastece os depósitos subterrâneos com água superficial proveniente de rios e lagos, tem se tornado comum, principalmente em países que dependem dos depósitos subterrâneos para abastecimento da população, como acontece em algumas regiões do estado de São Paulo, como a UGRHI 13, cuja demanda por água subterrânea é de 50% da área explotável, segundo dados dos Relatório de Qualidade das águas Subterrâneas do Estado de São Paulo (2013). Sendo assim, poderá ocorrer uma aceleração na contaminação destes locais devido ao “encurtamento” do ciclo da água que muitas vezes atua como um fator de atenuação e minimização de substâncias químicas no ambiente (LAPWORTH et al., 2012)

A interface entre as águas superficiais e as águas subterrâneas também são considerados um mecanismo de contaminação difusa. É uma rota indireta de troca de substâncias entre a água superficial e a água subterrânea, pelos processos de run-off e migração descendente (LAPWORTH et al., 2012; PAL et al, 2010, DREWES, 2009).

5. Efeitos Tóxicos de Estrógenos e Fármacos aos Organismos

Os estrógenos são um grupo de hormônios esteróides de origem natural e sintética que podem agir como alteradores endócrinos. Essa alteração endócrina ocorre quando um alterador/desregulador endócrino (EDCs) interage com o receptor hormonal, alterando a resposta natural do sistema endócrino. A alteração endócrina pode ser entendida como qualquer alteração no funcionamento do sistema endócrino, o qual é responsável pela manutenção de várias funções vitais (YAN et al., 2010) e pode ser causada por substâncias que imitam, bloqueiam ou reduzem a atividade hormonal, produzindo uma resposta indesejada, que pode afetar a saúde e reprodução de vários organismos, inclusive do homem.

Muitos EDCs competem com o 17 β -estradiol pelo receptor hormonal, podendo exercer efeito de feminilização ou masculinização no organismo. Isso acontece porque os receptores de estrógeno (ER) particularmente são pouco específicos e essa característica os torna suscetíveis à ativação por uma variedade de compostos ambientais (xenoestrógenos) (FONTENELE et al., 2010). Substâncias que produzem efeitos de feminilização são conhecidas como estrogênicas e as que produzem efeitos de masculinização são as androgênicas (SÁNCHEZ-ANDRADE e KENDRICK, 2011). Em humanos, a exposição aos alteradores endócrinos tem sido associada à perda da libido, impotência, redução da qualidade e quantidade de esperma, diversos tipos de câncer do sistema reprodutivo (testículos, próstata, mama etc), ovários policísticos e endometriose (GONG et al., 2009).

Uma primeira evidência dos possíveis efeitos que esses compostos provocariam em seres humanos foi observada entre os anos 1950 a 1970 com mulheres grávidas que tomaram dietilestilbestrol, um estrógeno sintético prescrito para evitar aborto espontâneo e promover o crescimento do feto. A maioria das filhas dessas mulheres, quando adultas apresentaram infertilidade e algumas desenvolveram um tipo raro de

câncer vaginal. Os filhos destas mulheres apresentaram anormalidade nos órgãos sexuais, baixa contagem de espermatozóides e tendência a desenvolverem câncer nos testículos (PAL et al., 2010). Outro estudo (SWAN et al., 2007) mostrou que a fase embrionária humana é muito mais suscetível à ação dos interferentes endócrinos em comparação ao indivíduo adulto.

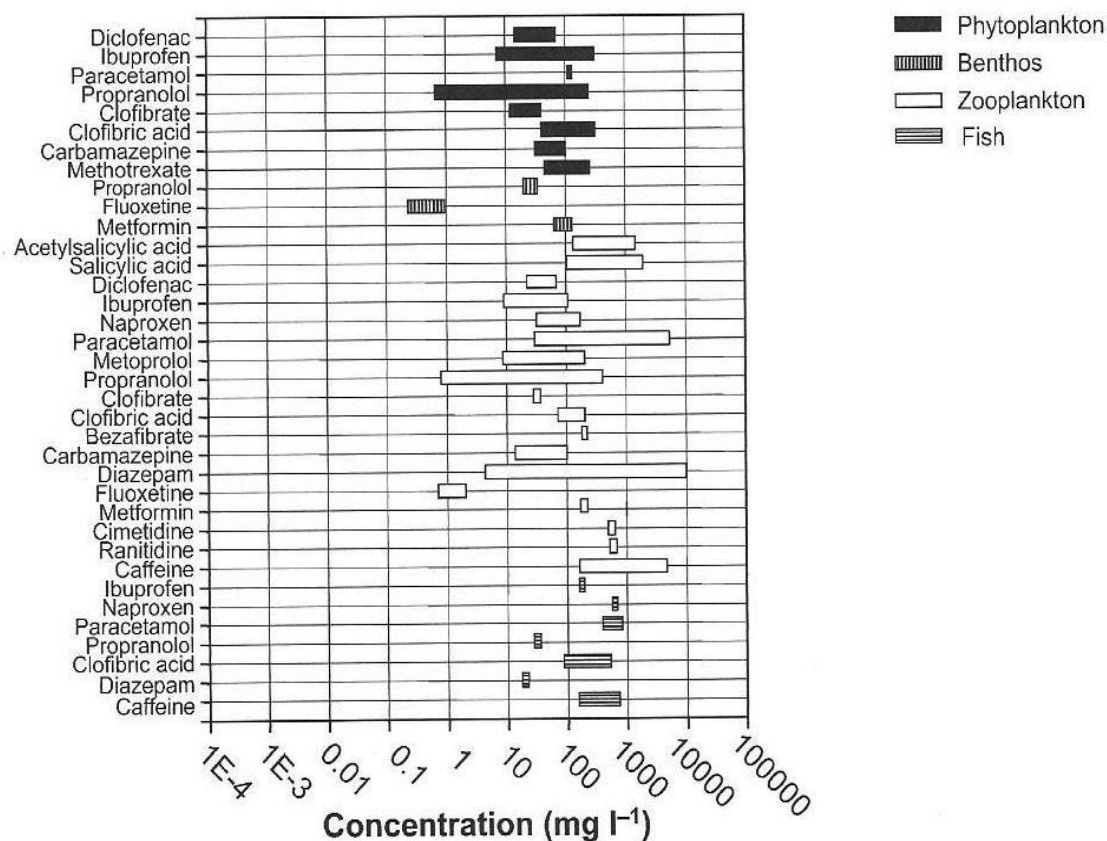
Efeitos sobre a vida selvagem, principalmente animais aquáticos, também tem sido reportados (WEI e JIN-MING, 2010; POJANA et al., 2007). O principal problema relatado em consequência de estrógenos em águas naturais é a feminilização de peixes machos, detectada pela indução da vitelogenina (Vtg) no plasma, um gene normalmente presente em fêmeas considerado biomarcador da exposição estrogênica em machos jovens, que apresentam a expressão hepática da Vtg induzida quando expostos a ambientes contaminados (SANCHES, 2006). Como o sistema de desintoxicação em peixes é menos efetivo quando comparado aos mamíferos, os efeitos dos EDCs nessa espécie são mais facilmente detectáveis (SURI et al., 2007).

A persistência e atividade biológica de fármacos, principalmente nos processos de desenvolvimento e reprodução, tem sido motivo de preocupação. Somente nos últimos anos agências regulatórias passaram a elaborar documentos que orientem na investigação do possível efeito ambiental dos fármacos. Ao contrário do conhecimento a respeito das concentrações dos fármacos no ambiente, pouco se sabe dos efeitos dos fármacos nos organismos terrestres e aquáticos, tanto em escala laboratorial quanto em estudos de campo (KÜMMERER, 2008)

Tais substâncias são desenvolvidas para atuar sobre vias metabólicas e moleculares específicas nos seres humanos, mas possuem efeitos secundários. Quando são introduzidos no ambiente, podem afetar animais que possuam fisiologias similares à humana ou levar à efeitos desconhecidos. Muitas drogas não possuem seu mecanismo de ação completamente compreendido, isto faz com que estudos específicos de toxicidade, particularmente em pequenos animais sejam complicados de serem desenvolvidos. De forma geral, as investigações de efeito agudo e crônico, assim como variantes como o pH do meio e a biodisponibilidade dos fármacos precisam ser muito melhor elucidados para que conclusões mais coerentes sejam obtidas (KÜMMERER, 2008)

A Figura 1.4 apresenta dados da exposição crônica a fármacos, para fitoplâncton, zooplâncton, bentos e peixes. Os dados indicam que 38% dos fármacos como o ácido acetilsalicílico, betaxolol, sotalol, bezafibrato, gemfibrozil, cimetidina e ranitidina possuem LC_{50} acima de 100 mg L^{-1} , o que de acordo com a Diretiva 93/67/EEC os classifica como não perigosos aos organismos aquáticos. 17% dos fármacos apresentam uma toxicidade aguda abaixo de 100 mg L^{-1} . Para a fluoxetina os valores de toxicidade estão sempre abaixo de 10 mg L^{-1} . A grande maioria dos fármacos tem valores de $EC_{50} > 1 \text{ mg L}^{-1}$ (KÜMMERER, 2008).

Figura 1.4: Toxicidade aguda de fármacos de uso humano em diferentes organismos aquáticos de níveis tróficos diferentes (KÜMMERER, 2008).

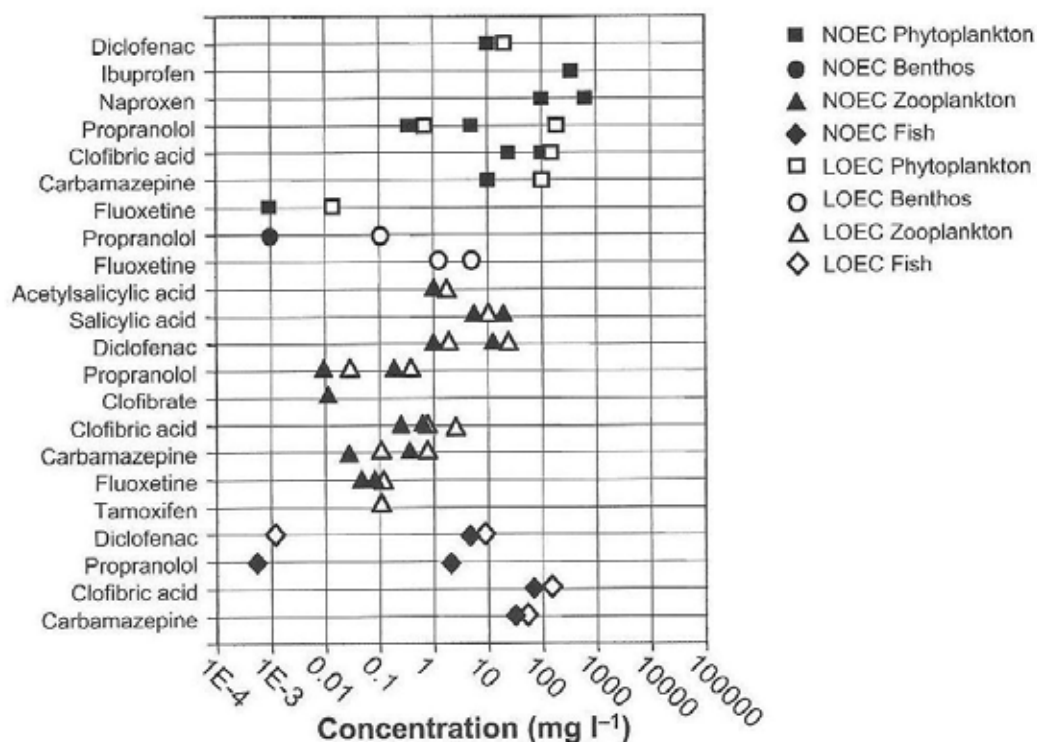


Os testes seguem protocolos definidos, em condições controladas. Entretanto, com concentrações dos compostos que muitas vezes ultrapassam àquela ambiental em até 1000 vezes. Por exemplo, o menor valor onde se observam efeitos agudos tóxicos da fluoxetina é de $20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto que a concentração ambiental

normalmente encontrada é de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$. Entretanto situações como na qual uma população de abutres na Índia e no Paquistão em 2004, sofreu uma alta taxa de morte causada entre outros, por falência renal associada ao diclofenaco encontrado nos animais, mostra que efeitos adversos importantes podem ocorrer sob certas circunstâncias (OAK's et al, 2004).

Quando sob influência de esgotos, espécies aquáticas estão submetidas à exposição contínua de algumas substâncias. Entretanto, dados de exposição crônica são escassos, quando não superficiais, pois deixam de levar em consideração importantes aspectos, como o ciclo de vida dos organismos. Nas avaliações de perigo e risco ambiental, muitas vezes as taxas entre os efeitos agudos e crônicos são derivadas por ponderações. A figura 1.5 apresenta alguns valores de toxicidade crônica de fármacos, para fitoplâncton, zooplâncton, bentos e peixes. São apresentadas concentrações em que não se observam efeitos (NOEC) ou aquelas nas quais os efeitos observados são baixos (LOEC) (KÜMMERER, 2008).

Figura 1.5: Toxicidade crônica de fármacos de uso humano em diferentes organismos aquáticos de níveis tróficos diferentes (KÜMMERER, 2008).



Da figura 1.5 observa-se, por exemplo, que o propanolol teve apenas as doses de exposição crônica a peixes estudados, até o momento. Os melhores dados a respeito de exposição crônica são para o EE2, que exibe estrogenicidade e inibe a fertilização e a reprodução de peixes em concentrações ambientais muito baixas (KÜMMERER, 2008)

Existem lacunas nos dados de exposição crônica dos fármacos, particularmente para os peixes, no que se refere a alterações do seu sistema hormonal, estado imunológico, alterações fisiológicas e histológicas. Para melhores esclarecimentos, estudos paralelos baseados em moléculas alvo, incluindo de mamíferos, tecidos e órgãos devem ser seguidos para produzirem previsões e resultados mais relevantes à respeito do crescimento, reprodução e sobrevivência das espécies, como para corroborar para as estimativas dos potenciais efeitos ecotoxicológicos.

CAPÍTULO II

QUALIDADE DAS ÁGUAS SUPERFICIAIS NAS UGRHI'S 21 e 22

1. Introdução

O monitoramento da qualidade das águas e suas tendências são um método importante para garantir a sustentabilidade das características desejadas de ambientes aquáticos, como sua estrutura, função e usos (WANG et al., 2014)

No Brasil as redes de monitoramento da qualidade das águas superficiais tiveram início nos anos 1970, quando foram implantadas as primeiras redes estaduais. Desde então, as Unidades da Federação (UF) têm adotado diferentes estratégias no estabelecimento de seus programas de monitoramento da qualidade das águas. Considerando que existem 2.167 pontos de monitoramento ativos em todo território nacional, isto representa uma densidade de 0,25 ponto para cada 1.000 km². Outros países apresentam densidades maiores, como o Canadá, que apresenta densidade de 0,8/1.000 km² (ANA, 2012)

A distribuição desses pontos de monitoramento no território brasileiro é bastante desigual e concentrada em algumas regiões hidrográficas. A frequência de amostragem assim como os parâmetros analisados são estabelecidos à critério de cada UF (ANA, 2012).

A Lei Estadual Paulista nº 7.663 de 30/12/1991, que dispõe sobre a Política Estadual de Recursos Hídricos, estabelece como princípio, no artigo 3º, inciso II, a adoção da bacia hidrográfica como unidade físico-territorial de planejamento e gerenciamento dos recursos hídricos (SANTOS e LEAL, 2014). Esta mesma lei, contribuiu para a institucionalização de 22 Unidades de Gerenciamento dos Recursos Hídricos – UGRHI's, como unidades de planejamento e gestão das bacias hidrográficas paulistas.

No estado de São Paulo, o órgão responsável pelo monitoramento de qualidade das águas superficiais, dentro das UGRHI's, é a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB. A avaliação das águas superficiais é feita através da rede de monitoramento de águas doces, iniciada em 1974. Os resultados são publicados anualmente através do Relatório das águas Superficiais do Estado de São Paulo. A avaliação da qualidade da água doce é complementada por meio de análises temporais e espaciais. São estabelecidos índices de qualidade com o objetivo de identificar trechos críticos (CETESB, 2013)

A CETESB faz a determinação de cerca de 60 variáveis de qualidade da água (físicas, químicas, hidrobiológicas, microbiológicas e ecotoxicológicas) consideradas mais representativas (Tabela II.1). Essas variáveis são determinadas em, pelo menos, 70% da rede.

Tabela II.1: Variáveis de qualidade da Rede Básica (água doce) (CETESB, 2013)

Grupo	Principais variáveis	Outras variáveis
Físicos	Condutividade, temperatura da água, temperatura do ar	Nível da Água, Salinidade, Transparência
Químicos	Alumínio Dissolvido, Alumínio Total, Bário Total, Cádmio Total, Carbono Orgânico Total, Chumbo Total, Cloreto Total, Cobre Dissolvido, Cobre Total, Cromo Total, DBO(5, 20), Ferro Dissolvido, Ferro Total, Manganês Total, Mercúrio Total, Níquel Total, Nitrogênio Amoniacal, Nitrogênio Kjeldhall, Nitrogênio-Nitrato, Nitrogênio-Nitrito, Oxigênio Dissolvido, pH, Potássio, Sódio, Sólido Dissolvido Total, Substâncias Tensoativas que Reagem c/ Azul De Metileno, Turbidez e Zinco Total.	Alcalinidade Total, Arsênio Total, Boro Total, Carbono Orgânico Dissolvido, Compostos Orgânicos Voláteis (COV's), Cor Verdadeira, DQO, Dureza, Fenóis Totais, Fluoreto Total, Herbicidas, Hidrocarbonetos Aromáticos Polinucleares (PAH's), Óleos e Graxas, Pesticidas Organofosforados, Potencial de Formação de THM
Hidrobiológicos	Clorofila <i>a</i> e Feotinina <i>a</i>	Comunidade Fitoplanctônica e Zooplanctônica
Microbiológicos	<i>Escherichia coli</i>	
Ecotoxicológicos	Ensaio de toxicidade crônica com microcrustáceo <i>Ceriodaphnia dubia</i>	Ensaio de Toxicidade Aguda– <i>Vibrio fischeri</i> (Sistema Microtox), Microcistinas, (Teste de Ames)

O estabelecimento de índices de qualidade das águas apoiados nas variáveis utilizadas pela CETESB já não se tornam eficientes quando levamos em consideração que contaminantes emergentes como alteradores endócrinos e fármacos, tem impacto potencial sobre a biota aquática. Sendo assim estabelecesse uma falha no

Tabela II.2: Características populacionais e de uso da água na UGRHI 21 (Fonte: PERH, 2007)

Dados demográficos	Área (km ²)		8425,5
	População total (nº hab)		447571
	Densidade demográfica (hab/ km ²)		53,1
	Taxa de urbanização (%)		90,6
Demanda de água	Urbana (m ³ /s)		0,659
	Industrial (m ³ /s)		1095
	Agropecuária (m ³ /s)		0,633
	Outros usos (m ³ /s)		0,001
	Total (m ³ /s)		2388
Saneamento	Carga orgânica poluidora doméstica	Gerada (kg DBO/dia)	21954,0
		Remanescente (kg DBO/dia)	13703,8
	Municípios com ICTEM BOM (%)		80,8
	Disposição adequada de resíduos sólidos (%)		22,1
	Municípios com IQR adequado (%)		46,2

A agroindústria canavieira opera em diversos municípios da UGRHI, principalmente na região próxima ao município de Adamantina. Consequentemente as lavouras de cana-de-açúcar predominam na produção rural. Marília é o polo regional onde se concentra grande parte das atividades industriais, com destaque para o segmento alimentício (PERH, 2007)

Segundo o Plano Estadual de Recursos Hídricos, referente ao período 2004 a 2007 (PERH,2007) os principais problemas desta UGRHI são:

- Carência de informações sistemáticas e representativas da região;
- Deficiência de pontos de monitoramento e necessidade de modernização;
- Baixo índice de tratamento de esgoto;
- Baixa qualidade da água (IAP e IVA) próximo a Marília;
- Alta suscetibilidade a processos erosivos;
- Carência de educação ambiental voltada ao pequeno produtor rural (PERH,2013).

Segundo o Relatório de Qualidade das Águas Superficiais da CETESB (2013) nesta UGRHI estão alocados 4 pontos (Tabela II.3) de amostragem para monitoramento da qualidade de água, segundo as metodologias de variáveis de qualidade da rede básica.

Tabela II.3: Descrição dos pontos de amostragem das redes de monitoramento – 2013 na UGRHI 21 (Fonte: CETESB, 2013)

Corpo hídrico	Cód. CETESB	Local de amostragem	Latitude S	Longitude W	Município
Reservatório do Arrependido	ARPE 02800	No reservatório do Rio Arrependido, na captação de Marília	22 19 09	50 01 21	Marília
	PEIX 02100	Ponte na rodovia que liga Marília a Assis	22 18 16	50 03 00	Marília
Rio do Peixe	PEIX 02600	Ponte na estrada que liga Caiabú a Mariápolis, 3km a montante da captação da SABESP de Pres. Prudente	21 49 31	51 11 51	Caiabu
	PEIX 02800	Ponte na Rod. que liga Tupi Paulista a Presidente Venceslau	21 36 16	51 42 10	Dracena

A Tabela II.4 apresenta os resultados das principais variáveis de qualidade de água nos pontos de amostragem da UGRHI 21.

Tabela II.4: Média das principais variáveis de qualidade de água de 2013 para os pontos de amostragem da UGRHI 21 (Fonte: CETESB, 2013)

Ponto	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Turbidez (NTU)	Nitrato (mg.L^{-1})	Nitrogênio amoniacal (mg.L^{-1})	Oxigênio dissolvido (mg.L^{-1})	DBO _{5,20} (mg.L^{-1})	Fósforo (mg.L^{-1})	<i>E. coli</i> (NMP/100mL)	Clorofila <i>a.</i> ($\mu\text{g}/\text{L}$)
ARPE 02800	196	2	0,12	0,12	6,6	2	0,011	7	3,9
PEIX02100	212	77	1,5	0,14	7,0	3	0,095	6,8E+3	2,8
PEIX02600	107	79	0,82	0,16	7,4	2	0,049	480	3,7
PEIX02800	114	197	0,82	0,14	6,5	2	0,089	465	8,0

Nestes pontos de amostragem, no período compreendido entre 2008 e 2013, verificaram-se altas taxas de não conformidades para os parâmetros manganês nos

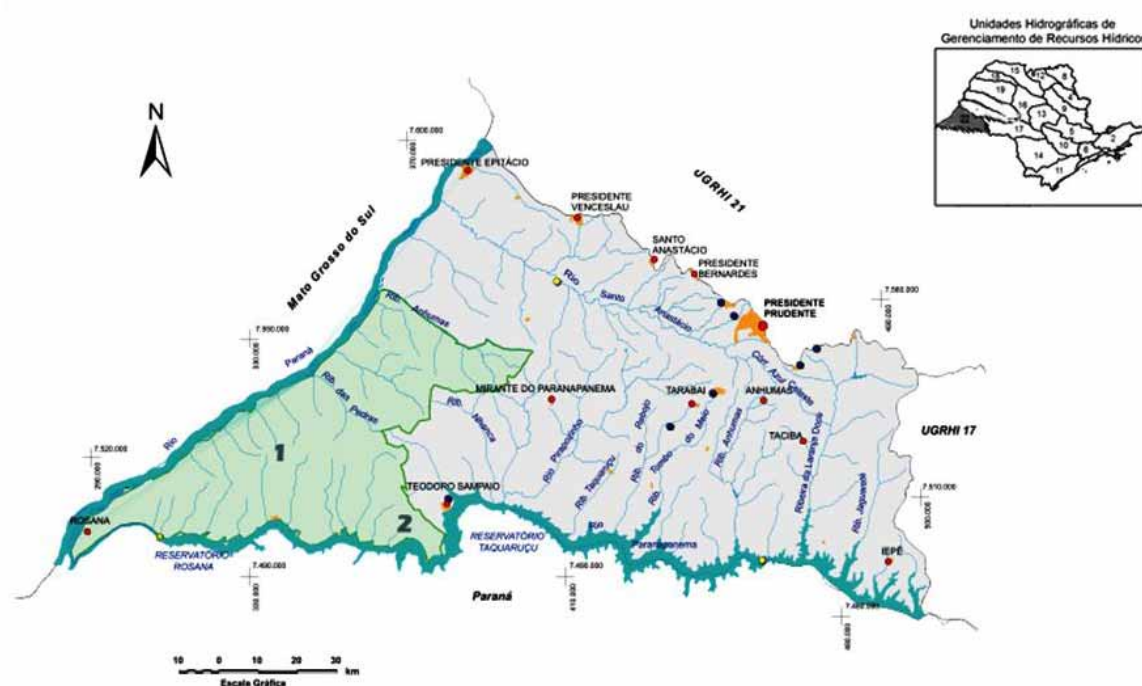
pontos denominados ARPE 02800, PEIX 02100 e alumínio dissolvido e ferro dissolvido, nos pontos denominados PEIX 02600 e PEIX 02800. Estes parâmetros contribuem para a estimativa do IQA.

Para os fins de cálculos do índice de qualidade das águas (IQA) e do índice de qualidade das águas para fins de abastecimento público (IAP) esta UGRHI apresentou resultados classificados como BOM e REGULAR, respectivamente, no ano de 2013, segundo a CETESB (2013).

3. Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos 22 – Pontal do Paranapanema

A UGRHI 22, denominada também como Pontal do Paranapanema, agrega os tributários da margem direita do curso inferior do rio Paranapanema e inclui alguns afluentes pela margem esquerda do rio Paraná, localizando-se na porção extremo-oeste do Estado de São Paulo (Figura II.2). Os principais rios desta UGRHI são os rios Paranapanema, Paraná, Santo Anastácio e Pirapozinho.

Figura II.2: Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos 22 – Pontal do Paranapanema (Fonte: CBH-PP, 2011)



Os dados de caracterização populacional, de uso da água e saneamento da UGRHI 22 estão apresentados na Tabela II.5.

Tabela II.5: Características populacionais e de uso da água na UGRHI 22 (Fonte: PERH, 2013)

Dados demográficos	Área (km²)		13301,3
	População total (nº hab)		475443
	Densidade demográfica (hab/ km²)		36,0
	Taxa de urbanização (%)		90,4
Demanda de água	Urbana (m³/s)		0,607
	Industrial (m³/s)		1,124
	Agropecuária (m³/s)		0,166
	Outros usos (m³/s)		0,000
	Total (m³/s)		1,897
Saneamento	Carga orgânica	Gerada (kg DBO/dia)	23626,0
	poluidora doméstica	Remanescente (kg DBO/dia)	5228,0
	Municípios com ICTEM BOM (%)		90,5
	Disposição adequada de resíduos sólidos (%)		7,4
	Municípios com IQR adequado (%)		38,1

A agroindústria é a base da estrutura econômica da região, onde se despontam as usinas de álcool e açúcar, frigoríficos e abatedouros. Presidente Prudente é o pólo regional que concentra a maior parte dos empreendimentos produtivos industriais, sendo também a referência primeira em ensino universitário (PERH, 2007).

Segundo o Plano Estadual de Recursos Hídricos, referente ao período 2004 a 2007 (PERH,2007) os principais problemas desta UGRHI são:

- Disposição inadequada de resíduos sólidos e efluentes industriais;
- Aterros com IQR inadequado;
- Ausência de tratamento de esgotos;
- Abrangência incompleta dos sistemas de abastecimento de água;
- Necessidade de fortalecimento da outorga como instrumento de gestão;
- Existência de processos erosivos, assoreamento em reservatórios, ausência de dados sobre erosão e assoreamento;

- Comprometimento da qualidade das águas;
- Deficiência das redes de monitoramento;
- Necessidade urgente de discussão sobre o reenquadramento;
- Necessidade de implantação da cobrança pelo uso da água;
- Aumento da atividade sucroalcooleira, com aumento da pressão sobre os recursos hídricos;
- Necessidade de estudos sobre recursos hídricos e usos futuros;
- Falta sistema de análise integrada dos dados da UGRHI;
- Desconhecimento e descumprimento das legislações vigentes;
- Falta de conscientização na aplicação dos recursos financeiros, falta de prestação de contas ao CBH;
- Ausência de união na composição do CBH-PP;
- Inobservância ao estatuto do CBH-PP e regimento interno das câmaras (PERH,2013).

Segundo o Relatório de Qualidade das Águas Superficiais da CETESB (2013) Nesta UGRHI estão alocados 6 pontos (Tabela II.6) de amostragem para monitoramento da qualidade de água, segundo as metodologias de variáveis de qualidade da rede básica.

Tabela II.6: Descrição dos pontos de amostragem das redes de monitoramento – 2013 na UGRHI 22 (Fonte: CETESB, 2013)

Corpo hídrico	Cód. CETESB	Local de amostragem	Latitude S	Longitude W	Município
Rio Paraná	PARN 02900	Na barragem do reservatório de Porto Primavera	22 28 36	52 57 26	Rosana
Rio Paranapanema	PARP 02750	Ponte a 800m a jusante da represa capivara	22 39 40	51 23 18	Taciba
	PARP 02900	A jusante da barragem da Usina de Rosana, na rodovia SP-613	22 35 50	52 52 28	Teodoro Sampaio

Tabela II.6 (continuação)

	STAN 02700	Ponte na rodovia que liga Presidente Venceslau a Teodoro Sampaio, SP-563	22 01 25	51 53 27	Piquerobi
Rio Santo Anastácio	STAN 02900	A jusante da ponte da estrada vicinal km 8,5 Pres. Epitácio x Planalto do Sul, próximo a pousada Cururu	21 50 50	52 09 55	Presidente Epitácio
	STAN 04400	Ponte sobre o rio Santo Anastácio, na divisa do bairro Cruzeiro com o bairro Boa Esperança	22 09 02	51 34 36	Alvares Machado

A Tabela II.7 apresenta os resultados das principais variáveis de qualidade de água nos pontos de amostragem da UGRHI 22.

Tabela II.7: Média das principais variáveis de qualidade de água de 2013 para os pontos de amostragem da UGRHI 22 (Fonte: CETESB, 2013)

Ponto	Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Turbidez (NTU)	Nitrato (mg.L^{-1})	Nitrogênio amoniacoal (mg.L^{-1})	Oxigênio dissolvido (mg.L^{-1})	DBO _{5,20} (mg.L^{-1})	Fósforo (mg.L^{-1})	<i>E. coli</i> (NMP/ 100mL)	Clorofila <i>a</i> . ($\mu\text{g}/\text{L}$)
PARN 02900	60	2	0,22	0,11	7,4	2	0,013	1	1,1
PARP 02750	63	11	0,42	0,10	7,3	2	0,016	4	0,87
PARP 02900	67	12	0,44	0,10	8,3	2	0,016	2	1,5
STAN 02700	142	94	1,0	0,48	7,0	4	0,16	703	4,7
STAN 04400	487	56	0,68	8,89	3,9	18	0,74	1,4E+3	*

* valor não determinado.

Nestes pontos de amostragem, no período compreendido entre 2008 e 2013, verificaram-se taxas de não conformidades para os parâmetros manganês, mercúrio total, chumbo, alumínio, ferro e cobre dissolvido no ponto denominado STAN 02700. Nos pontos denominados PARP 02750, PARP 02900 e STAN 02700 os níveis de alumínio, ferro e cobre dissolvidos estavam ao conformes. Estes parâmetros contribuem para a estimativa do IQA.

Para os fins de cálculos do índice de qualidade das águas (IQA) esta UGRHI apresentou resultados classificados como ÓTIMOS para todos os pontos dos rios

Paraná e Paranapanema no ano de 2013. Entretanto, para os pontos alocados no rio Santo Anastácio os índices variaram de RUIM a BOM, com predominância de índices regulares, no ano de 2013, segundo a CETESB (2013).

Os valores correspondentes ao IAP desta UGRHI foram apresentados apenas no relatório de 2009, ÓTIMOS para todos os pontos dos rios Paraná e Paranapanema no ano de 2013. Entretanto, para os pontos alocados no rio Santo Anastácio os índices foram regulares ou ruins, segundo a CETESB (2010).

4. Perfil Populacional e de Saneamento das Cidades de Abrangência da UGRHI 21 e 22

As cidades de Marília e Presidente Prudente compõem os maiores núcleos urbanos das UGRHI 21 e 22 respectivamente, segundo dados publicados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2014) e pelo Relatório de Qualidade das Águas da CETESB (2013). Possuem sua economia baseada principalmente no setor de prestação de serviços e industrial, sendo este ligado principalmente à transformação de produtos de origem vegetal e animal, respectivamente.

A Tabela IV.8 traz um perfil das duas cidades, quanto às características populacionais e de unidade territorial.

Tabela II.8: Perfil das cidades de Marília e Presidente Prudente, quanto às características populacionais e de unidade territorial (Fonte: IBGE, 2015)

Cidade		
Marília	População estimada (2014)	230336
	População 2010	216745
	Área da unidade territorial (km ²)	1170,174
	Densidade demográfica (hab/km ²)	185,21
	População predominante	Jovem/ feminina de 20 a 30 anos
Presidente Prudente	População estimada (2014)	220559
	População 2010	207610
	Área da unidade territorial (km ²)	560,637
	Densidade demográfica (hab/km ²)	368,89
	População predominante	Jovem/ feminina de 20 a 30 anos

No que se refere à dados de saneamento, Marília possui 80% de coleta de esgoto, mas não possui tratamento do mesmo, obtendo um Indicador de Coleta e Tratabilidade de Esgoto da População Urbana de Município (ICTEM) de 1,2, considerado péssimo pelos órgãos reguladores. A cidade de Presidente Prudente por sua vez, possui 98% de coleta de esgoto e 100% de tratamento, obtendo um ICTEM de 9,97 (CETESB, 2013). Considerado que as substâncias monitoradas neste trabalho estão associadas à presença de esgotos nos recursos hídricos, os dados do ICTEM se tornam importantes para as discussões deste trabalho, pois consideram não somente as porcentagens de coleta e tratamento de esgotos, mas ponderam à eficiência do sistema empregado. Esta ponderação é baseada nas diminuições de carga orgânica, deixando de lado uma análise mais rigorosa quanto, por exemplo, à presença de microcontaminantes.

Outro fator relevante para as correlações com as substâncias analisadas é que a população jovem e feminina é predominante nas cidades, o que justifica a ocorrência dos estrógenos na região de estudo.

Nestas cidades, estudos a respeito da ocorrência de fármacos e estrógenos são inexistentes, assim, devido à importância econômica regional e no tocante à cidade de Marília, não contar com sistemas de tratamento de esgotos, este trabalho se torna importante.

CAPÍTULO III

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE ESTRÓGENOS E FÁRMACOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA SUPERFICIAL DAS UGRHI'S 21 e 22

1. Materiais e Métodos

1.1 Padrões Analíticos, Solventes e Reagentes

Os padrões dos estrógenos estrona (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3), 17 α -etinilestradiol (EE2), atenolol (ATN), propranolol (PROP), ciprofloxacina (CPR) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, (EUA), todos com grau de pureza > 98%. As soluções padrão estoque (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) individuais dos estrógenos, atenolol, propranolol, foram preparadas em metanol (MeOH, grau HPLC). A solução de ciprofloxacina foi preparada em solução formada por metanol (MeOH, grau HPLC) mistura com água de alta pureza, obtida de um sistema Mili-Q (Millipore), na proporção 50:50.

Os solventes acetonitrila e metanol foram adquiridos da JT Baker, todos em grau HPLC. Foram utilizados, ainda, fosfato de potássio monobásico anidro (p.a. Sigma-Aldrich) e ácido acético glacial (p.a. Dinâmica). Para o desenvolvimento do processo de extração em fase sólida foram utilizados cartuchos de fase polimérica Strata X (200mg/6mL, Phenomenex, USA) e Oasis MCX (60mg/ 3mL, Waters, USA)

Utilizaram-se membranas de fibra de vidro (Boeco, Germany, 0,6 μm de poro, 47 mm de diâmetro) para filtração das amostras de água superficial utilizadas na estimativa do efeito matriz e do estudo ambiental.

1.2 Condições Cromatográficas de Análise

Nesse trabalho, foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) (Varian, modelo 920 - LC), equipado com bomba ternária, injetor automático, detectores de fluorescência e ultravioleta, em série nesta sequência e software Galaxie para aquisição dos dados. As condições cromatográficas foram otimizadas para ajustar a separação cromatográfica e permitir a determinação simultânea dos estrógenos e fármacos. A Tabela III.1 apresenta as condições cromatográficas utilizadas.

Tabela III.1: Condições cromatográficas (HPLC/ FLD e UV, Varian LC-920) adaptadas de Camacho-Munõs (2009).

Equipamento	Varian 920 – LC		
Fase móvel (gradiente)	KH ₂ PO ₄ 25mM : Acetonitrila (ACN) 5-18,5% ACN em 13min, 18,5-50% ACN em 37min, 50-55% de ACN em 2 min, sendo mantida por 5 min, e voltando para 5% de ACN em 10 min, com tempo de equilíbrio de 10 min.		
Fase estacionária	Phenomenex - Luna C18 150x4,60mm 5µm		
Vazão	1,2mL.min ⁻¹		
Temperatura da coluna	30°C		
Volume de injeção	20µL		
Deteção UV	220nm		
Deteção FLU	Tempo (min)	λ _{excitação} (nm)	λ _{emissão} (nm)
	0 – 8	230	306
	8,1 - 11	230	320
	11,1 - 18	280	480
	18,1 - 64	230	320

1.3 Avaliação do Desempenho do Sistema Analítico

Os critérios adotados foram linearidade, precisão intermediária, exatidão, limites de detecção e quantificação.

1.3.1 Faixa de trabalho, linearidade e curvas analíticas

A partir das soluções padrão estoque individual (1000 µg mL⁻¹) preparadas em MeOH, dos estrógenos, atenolol e propranolol, e da solução de ciprofloxacino em MeOH: H₂O 50:50, preparou-se 5 mL da solução intermediária dos analitos nas concentrações listadas na Tabela III.2 para análise nos detectores de fluorescência (FLD) e ultravioleta (UV). Estas soluções foram mantidas sob refrigeração em freezer a -18°C durante 6 meses, exceto a solução de ciprofloxacino que era preparada a cada uso.

Tabela III.2: Concentração das soluções padrão mista para detectores FLD e UV.

Analito	Detecção por FLD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Detecção por UV ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Atenolol	10	-
Ciprofloxacino	10	-
17 β - Estradiol (E2)	10	-
Estriol (E3)	10	-
Estrona (E1)	-	10
17 α-Etinilestradiol (EE2)	10	-
Propranolol	10	-

Para a construção dos gráficos de linearidade e das curvas analíticas foram preparadas soluções constituídas das misturas de padrões, em diferentes níveis de concentração (Tabela III.3).

Tabela III.3: Concentrações para construção do gráfico de linearidade e curva analítica.

Pontos da Curva	Concentrações						
	Fluorescência						Ultravioleta
	$(\mu\text{g mL}^{-1})$						$(\mu\text{g mL}^{-1})$
	E2	E3	EE2	ATN	CPR	PROP	E1
Ponto 1	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	1,0
Ponto 2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	1,5
Ponto 3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	3,0
Ponto 4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	5,0
Ponto 5	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	10,0
Ponto 6	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-
Ponto 7	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	-
Ponto 8	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	-
Ponto 9	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	-
Ponto 10	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	-

Tais soluções foram preparadas a cada 6 meses, com exceção da solução de ciprofloxacino, cuja solução estoque tinha prazo de validade de 1 mês. Esta validade foi estabelecida quando das observações da atenuação significativa dos picos

cromatográficos referentes à solução padrão injetada, durante o período de otimização do método, neste trabalho e em outros desenvolvidos no grupo de pesquisa.

Cada solução foi injetada em triplicata e a média dos valores obtidos aplicada aos cálculos.

Os gráficos de linearidade e as curvas analíticas foram construídos de acordo com Valente (2010) aplicando-se o Teste de Huber, para eliminação dos valores anômalos.

No procedimento baseado no método de Huber, a linearidade é obtida calculando-se os valores de resposta (Área/Concentração) para cada nível de concentração, um valor central (mediana) e, em seguida a diferença entre cada valor individual e a mediana.

Estabelece-se um interlavo de confiança, escolhendo-se um fator “k”, entre 2 e 8, para multiplicar o valor médio das diferenças em relação a mediana. Assim são estabelecidos os limites superior (mediana + k * média das diferenças) e inferior (mediana – k * média das diferenças).

Neste trabalho, a constante utilizada foi k = 3. Os pontos situados entre esses limites pertencem ao intervalo linear dinâmico e devem ser utilizados para a construção da curva analítica (RIBANI et al.,2004).

1.3.2 Limites de detecção e quantificação instrumental e do método

Os limites de detecção e quantificação do sistema analítico e dos métodos para extração de estrógenos nas matrizes ambientais – água, sedimento e material particulado em suspensão – foram calculados de acordo com o proposto por Ribeiro et al. (2008), segundo as equações:

$$LD = 2. (s_y \cdot t/a_1) \cdot \left[\sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + (y_c - \bar{y}) / \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \right]$$

$$LQ = (y_h - a_0 - a_1) + \left[\sqrt{(s_y \cdot t - a_1) \left(\frac{1}{N} + 1 + (y_h - \bar{y}) / (a_2^1 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2) \right)} \right]$$

Onde:

s_y - desvio padrão residual da curva analítica

t - t de Student

a_0 e a_1 são, respectivamente coeficientes linear e angular

N - número total de replicatas

$\bar{y}$ - média dos valores dos sinais analíticos

y_c - (y crítico) - o intercepto do limite superior do intervalo de confiança

$\bar{x}$ - média dos valores das concentrações

y_h - valor do sinal analítico para a projeção da concentração crítica no limite superior do intervalo de confiança.

Este método de estimativa dos limites baseado em parâmetros da curva analítica leva em consideração o intervalo de confiança da regressão o que resulta em maior confiabilidade estatística em relação aos métodos comumente descritos na literatura (DUONG et al., 2010; KOZLIK, et al., 2011; SALVIA et al., 2012) - visual e da relação sinal-ruído - que estão baseados em parâmetros qualitativos.

1.3.3 Precisão e exatidão

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade por meio do cálculo da estimativa do desvio padrão absoluto (s) e do coeficiente de variação (CV) para um número de três repetições do procedimento analítico e injeções (triplicata do tratamento x triplicata da análise = 9 replicatas), onde são aceitos CV de até 20%, dependendo do nível de concentração da amostra (INMETRO, 2010).

A eficiência dos métodos (exatidão) foi avaliada empregando-se ensaios de recuperação, estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas dos compostos de interesse, em três níveis de concentração. Os intervalos aceitáveis de recuperação para determinação de compostos em baixas concentrações situam-se entre 70 e 120%, com precisão de até 20% (COMMISSION..., 2002).

$$Rec (\%) = \frac{\text{valor obtido}}{\text{valor adicionado}} \times 100$$

$$CV (\%) = S/X \times 100$$

Onde:

S – desvio padrão das médias

X – média entre os valores

1.3.4 Avaliação do efeito matriz

O efeito de matriz, também chamado efeito da resposta cromatográfica induzida pela matriz, foi avaliado por comparação da resposta do detector (coeficiente angular) nas curvas preparadas em solvente (MeOH) com aquelas preparadas em extratos da matriz (THOMPSON et al., 2002), confirmadas pelos testes estatísticos F e t de Student (CANTARERO et al., 2011), bem como pela análise dos coeficientes de correlação ponto a ponto das curvas (CARDOSO et al., 2008) conforme apresentado pelas equações (1) e (2), a seguir.

$$1) \% \text{ efeito matriz} = \frac{\delta_{matriz} - \delta_{solvente}}{\delta_{solvente}} \times 100\%$$

$$2) CV (\%) = \frac{x_a}{x_b} \times 100$$

Onde:

δ - coeficiente angular da curva analítica

x_a – desvio padrão entre área/concentração obtidas para cada ponto das curvas no solvente e na matriz

x_b – média entre área/ concentração obtidas para cada ponto das curvas no solvente e na matriz

Utilizando-se a equação (1) obtém-se a variação em termos de sensibilidade (THOMPSON et al., 2002) como influência positiva ou negativa dos constituintes da matriz nos resultados, sendo aceitável uma diferença de até 10%, em módulo. Pela equação (2) faz-se a comparação do efeito matriz em cada ponto da curva (CARDOSO et al., 2008). Nesse teste, os coeficientes de variação (CV) obtidos entre a área/concentração na matriz e no solvente devem ser inferiores a 20%.

1.4 Obtenção da Amostra Testemunha de Água Superficial

As amostras utilizadas no processo de otimização e validação dos respectivos métodos de análise, foram coletadas em pontos à montante das estações de tratamento de água e esgotos das cidades que foram objeto deste trabalho, de forma que fontes potenciais de contaminação fossem minimizadas.

Para a UGRHI 21, amostra testemunha foi coletada num trecho da rodovia Transbrasiliana, que liga Marília a Ourinhos-SP, na ponte do km 269 (sul), próximo à cidade de Marília ($22^{\circ}19'09,2''\text{S}$ $49^{\circ}53'54,4''\text{O}$), no Rio do Peixe (Figura III.1). Para a UGRHI 22, a amostra testemunha foi coletada à montante da estação de captação da SABESP ($22^{\circ}10'36,1''\text{S}$ $51^{\circ}28'55,3''\text{O}$), no Rio Santo Anastácio (Figura III.2).

Figura III.1: Localização do ponto de coleta ($22^{\circ}19'09,2''\text{S}$ $49^{\circ}53'54,4''\text{O}$) da amostra testemunha de água superficial no Rio do Peixe, Marília/SP (Fonte: Google Earth, 2014).



Figura III.2: Localização do ponto de coleta (22°10'36,1"S 51°28'55,3"O) da amostra testemunha de água superficial no Rio do Santo Anastácio, Presidente Prudente/SP (Fonte: Google Earth, 2014).



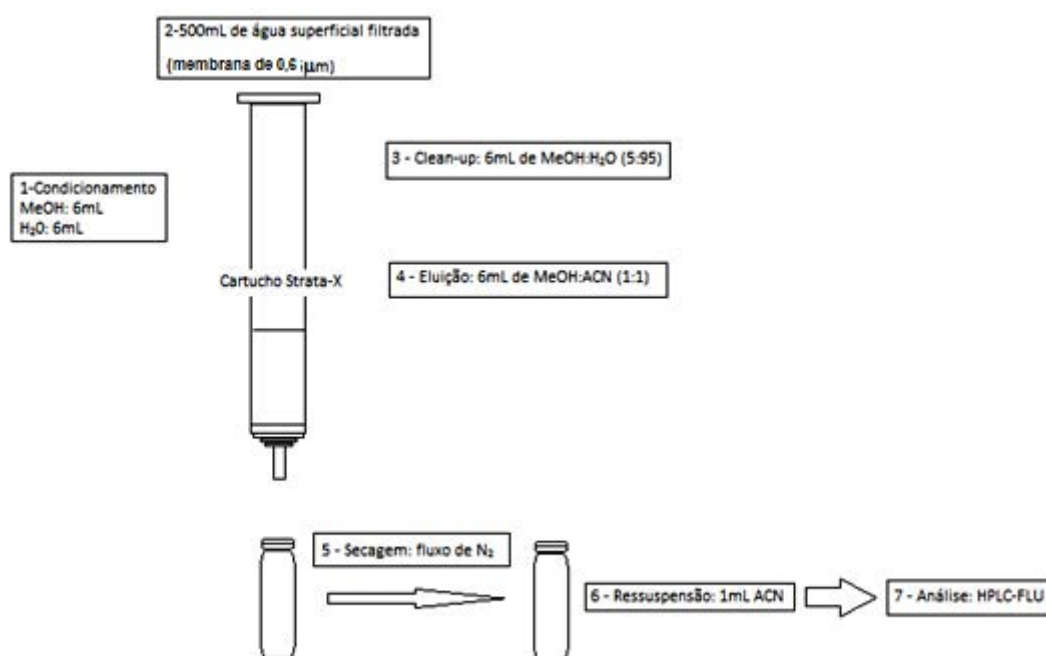
A coleta de água superficial foi realizada utilizando-se garrafas de vidro âmbar (4L) previamente limpas com detergente neutro (Extran 4%) enxaguados com água Milli-Q, secos em estufa e acidificados com H_3CCOOH p.a. (2% do volume do frasco). As amostras foram mantidas em caixa isotérmica para transporte até o laboratório. Uma vez no laboratório, as amostras foram filtradas utilizando membrana de fibra de vidro 0,60 μm de poro (Boeco Germany), para retirada de material em suspensão. Foram separados 0,5 L em garrafas de vidro âmbar para o procedimento de extração.

1.5 Método para Análise de Estrógenos e Fármacos em Água Superficial

Esse método consiste em uma extração em fase sólida – SPE com cartuchos Strata-X (200 mg/6 mL) previamente condicionados com metanol (6,0 mL) e água (6,0 mL) sequencialmente. Foram passados 500mL de amostra pelo cartucho e posteriormente foi feito clean-up com uma mistura MeCN:MeOH (5:95, v/v). O extrato eluído com 6,0 mL da mistura MeCN:MeOH (50:50, v/v), foi posteriormente seco em fluxo suave de N_2 e, ressuspenso em 1,0 mL de MeCN para análise por HPLC-FLD-UV, conforme detalhado na Figura III.3.

Para a verificação da eficiência do processo de extração em fase sólida, análises preliminares foram realizadas com amostras fortificadas com uma mistura de padrões com concentração inicial de 2,5ppm mantidas por 2h em frasco fechado e à temperatura ambiente para promover o equilíbrio entre analito e amostra, até o momento do procedimento de extração. Amostras não fortificadas - denominadas de testemunha, a análise de um branco do processo e ainda a análise do ponto na matriz, acompanharam esta etapa do procedimento analítico.

Figura III.3: Método para determinação de estrógenos e fármacos em água superficial.



Para que a repetibilidade do método fosse garantida, controlou-se a vazão pela regulação da pressão no sistema Manifold, tanto na etapa de extração dos analitos das amostras coletadas quanto em suas eluições dos cartuchos.

1.6 Análise por HPLC/FLU e UV

1.6.1 Amostragem

A amostragem foi feita num período de 6 meses (de julho a novembro de 2014), combinando estação seca e chuvosa dado que o maior volume de água, o revolvimento dos sedimentos, assim como o escoamento superficial pode influenciar na distribuição dos estrógenos e dos fármacos no ambiente aquático. As datas das coletas estão descritas na Tabela III.4

Tabela III.4: Data da realização das coletas dos corpos hídricos nas cidades de abrangência da UGRHI 21 e da UGRHI 22.

	Data da Coleta		Data da Coleta
UGRHI 21	09/07/2014	UGRHI 22	11/07/2014
(Marília)	27/08/2014	(Presidente	19/08/2014
	11/09/2014	Prudente)	10/09/2014
	20/10/2014		14/10/2014
	10/11/2014		09/11/2014
	25/11/2014		24/11/2014

Após a coleta as amostras foram imediatamente armazenadas em caixa térmica com gelo e encaminhada ao laboratório para o processo de extração dos analitos e subsequente análise por HPLC-FLD, com intervalo máximo de 48h entre coleta e análise das amostras.

1.6.2 Descrição dos Pontos de amostragem

Na cidade de Marília/ SP os pontos de coleta incluíram água superficial proveniente do Rio do Peixe, que em parte abastece a cidade, assim como recebe seus efluentes domésticos. Também foram feitas amostragens à montante e à jusante das duas ETA – Peixe e Cascata, instaladas no município.

Não existem ETE instaladas e em operação neste município. Sendo assim a água coletada no Rio do Peixe à montante da ETA Peixe do Departamento de Água e Esgoto

de Marília (DAEM), foi efetuada em um ponto situado após este manancial receber efluentes domésticos, industriais e águas pluviais no trecho que permeia a zona urbana.

Na cidade de Presidente Prudente/ SP os pontos de coleta incluíram água superficial proveniente do Rio Santo Anastácio, que em parte abastece a cidade e córrego Limoeiro, à montante e jusante do sistema de tratamento de esgotos da cidade.

A Tabela III.5 descreve os pontos de amostragem nas cidades de Marília e Presidente Prudente.

Tabela III.5: Descrição e coordenadas geográficas os pontos de amostragem nas cidades de abrangência da UGRHI 21 e da UGRHI 22.

Amostragem da UGRHI 21 – cidade de Marília/SP		
Ponto de amostragem	Descrição	Coordenadas Geográficas
Rio do Peixe	Água superficial à montante da cidade de Marília	22°19'09.2"S 49°53'54.4"O
Montante ETA Peixe	Montante do sistema de tratamento da ETA Peixe do DAEM	22° 14'37,086''S 49°58'52,1364''O
Jusante ETA Peixe	Jusante do sistema de tratamento da ETA Peixe do DAEM	22°14'36,5922''S 49°58'51,5172''O
Montante ETA Cascata	Montante do sistema de tratamento da ETA Cascata do DAEM	22°12'39.2"S 49°56'19.0"O
Jusante ETA Cascata	Jusante do sistema de tratamento da ETA Cascata do DAEM	22°12'40.0"S 49°56'19.1"O
Amostragem da UGRHI 22 – cidade de Presidente Prudente/SP		
Ponto de amostragem	Descrição	Coordenadas Geográficas
Montante ETA PP	Na lagoa de captação de água da SABESP de Presidente Prudente	22°10'36.1"S 51°28'55.3"O
Jusante ETA PP	No sistema de distribuição de água à jusante da ETA da SABESP de Presidente Prudente	22°07'57.4"S 51°24'11.3"O
Montante ETE PP	No rio santo Anastácio à montante da ETE da SABESP de Presidente Pudente	22°06'56.7"S 51°28'10.6"O
Jusante ETE PP	No rio santo Anastácio à jusante da ETE da SABESP de Presidente Pudente	22°06'59.0"S 51°28'14.1"O

CAPÍTULO IV
RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Otimização das condições cromatográficas de análise

As informações sobre métodos de análise utilizados neste projeto foram obtidas a partir de um levantamento de referências relacionadas aos fármacos, abordando características da matriz, do processo de extração dos compostos, das técnicas de análise e limites de detecção e quantificação apresentados (CASTIGLIONI et al., 2005; CAMACHO-MUNÕS et al., 2009; KUSTER et al., 2009; NEBOT et al., 2007; ARTEAGA et al., 2010; SANTOS et al., 2005; ZHANG e ZHOU, 2007; GOMES et al., 2006).

Procurou-se avaliar as condições cromatográficas a partir do método proposto por Camacho-Munõs et al. (2009), utilizando-se fase móvel gradiente com a programação ilustrada na Tabela IV.1. Foram realizadas injeções individuais das soluções padrão dos analitos em solvente para identificação dos tempos de retenção (t_R) e ajuste das condições mais adequadas à separação cromatográfica de análise simultânea dos fármacos e dos estrógenos.

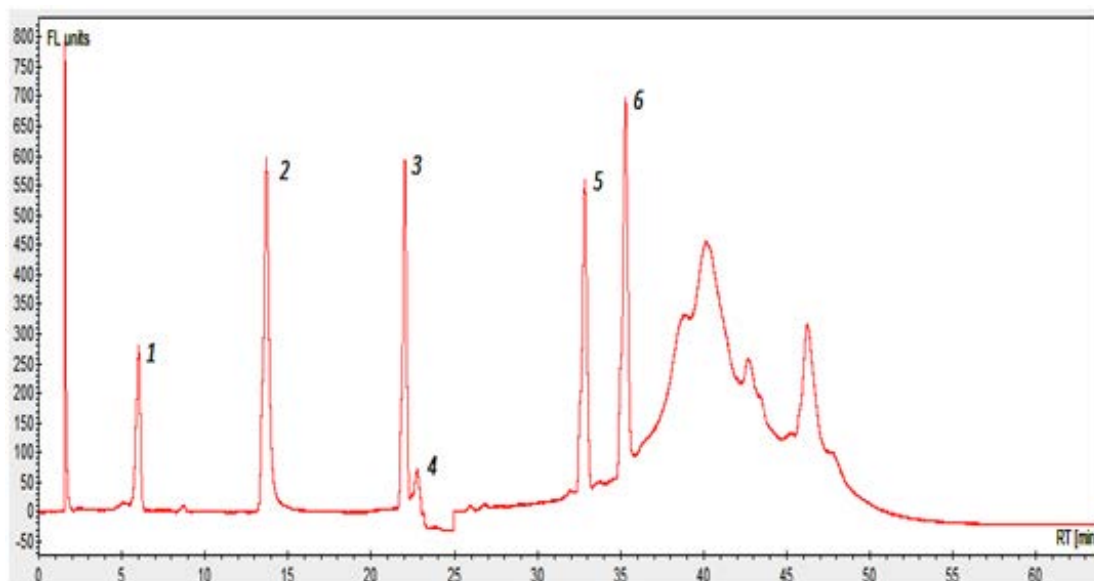
Tabela IV.1: Condições cromatográficas empregadas na análise dos fármacos e estrógenos pesquisados.

Composição da fase móvel	5-18,5% ACN ¹ :H ₂ O em 13 min 18,5-50% ACN ¹ :H ₂ O em 37min 50-55% ACN ¹ :H ₂ O em 2 min, e mantida por 5 min 5-18,5% ACN ¹ :H ₂ O em 10 min;equilíbrio em 10 min.
Vazão (mL.min⁻¹)	1,2
Tempo (min)	64
Coluna	Phenomenex - Luna C18 (150 x 4,60mm 5µm)
Volume de injeção (µL)	20
Deteção	UV/FLD

A Figura IV.1 apresenta os cromatogramas obtidos nas condições descritas.

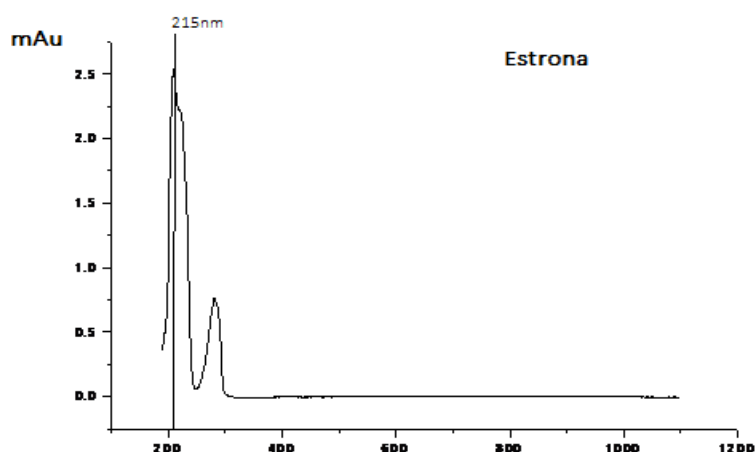
O método com eluição gradiente apresentou uma adequada resolução e sensibilidade com picos estreitos, sem formação de caudas, através da análise do cromatograma no espectrômetro de fluorescência. para 7 dos 8 analitos desta tese. As condições ótimas foram apresentadas na Tabela III.1.

Figura IV.1: Cromatogramas (HPLC/FLD) obtidos para uma mistura de padrões de 1,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em metanol, sob as condições cromatográficas da Tabela III.1 (1: atenolol; 2: ciprofloxacina; 3: estriol; 4: propanolol; 5: estradiol; 6: etinilestradiol)



Não se verificou boa resposta da estrona, tanto na detecção por ultravioleta quanto por fluorescência. Foram feitas avaliações no comprimento de onda utilizado na análise através de varredura (de 190 a 1100nm) de solução padrão individual do analito a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em KH_2PO_4 25mM, utilizando-se para isso um espectrômetro UV-Vis HP 8453, Figura IV.2.

Figura IV.2: Espectro UV, obtido no um espectrômetro UV-Vis HP 8453, utilizando solução 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de estrona em KH_2PO_4 25mM.



A análise por varredura mostrou uma melhor resposta da estrona para leitura em 215nm, entretanto, experiências do nosso grupo de pesquisa e as

referências bibliográficas comprovaram a adequação do comprimento de onda da análise deste composto em 220nm.

Modificações de comprimento de onda no sistema cromatográfico foram feitas e a resposta para este analito foi pequena mesmo em concentrações muito elevadas de solução padrão, o que não se reflete nas concentrações ambientais observáveis na literatura para esta substância. Pressupõe-se que a resposta do detector espectrométrico do aparelho esteja afetada e para que não houvesse prejuízo na análise dos outros compostos, as condições de análise cromatográficas testadas foram mantidas, apenas para a análise dos outros estrógenos e fármacos deste trabalho.

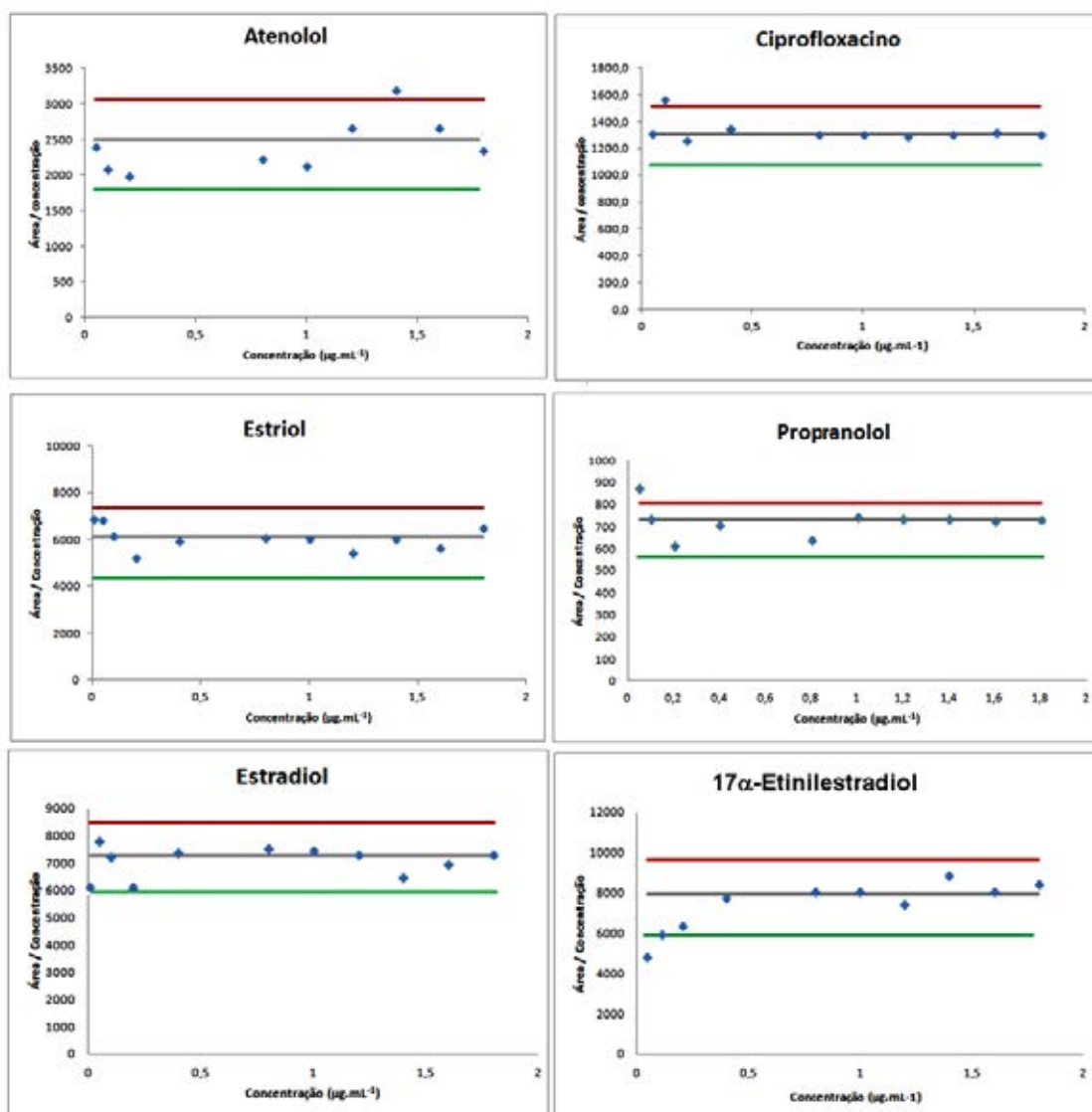
Para as análises de amostras ambientais (jul/2014 e nov/2014), foram realizadas apenas as detecções por FLD, pois este se apresentou como o detector mais adequado para a maioria dos compostos de interesse desta tese.

2. Avaliação da resposta do sistema cromatográfico

A Figura IV.3 exemplifica a construção das curvas de linearidade preparadas em solvente (acetonitrila) e detecção por FLD.

De acordo com o teste de Huber, os pontos que se situam fora dos limites inferior e superior nos intervalos delimitados pelos gráficos de linearidade, não podem ser utilizados nas construções das curvas analíticas. Sendo assim, o ponto referente à sétima concentração do atenolol e a primeira concentração do propranolol, por exemplo deverão ser desconsiderados.

Figura IV.3: Gráficos de linearidade para os estrógenos (HPLC-FLD). Linha vermelha: limites superior; linha verde: limite inferior; linha cinza: mediana.



Novas curvas analíticas foram construídas a cada semestre, pois a lâmpada do detector espectrométrico tem sua emissão afetada de acordo com o tempo de uso.

A Tabela IV.2 apresenta os coeficientes de regressão linear da curva analítica e linearidade do intervalo de concentrações estudado, obtidos para todos os analitos deste trabalho.

Tabela IV.2: Intervalo de resposta linear e coeficientes angular (a), linear (b) e de correlação (r) instrumentais para análise com detecção por fluorescência.

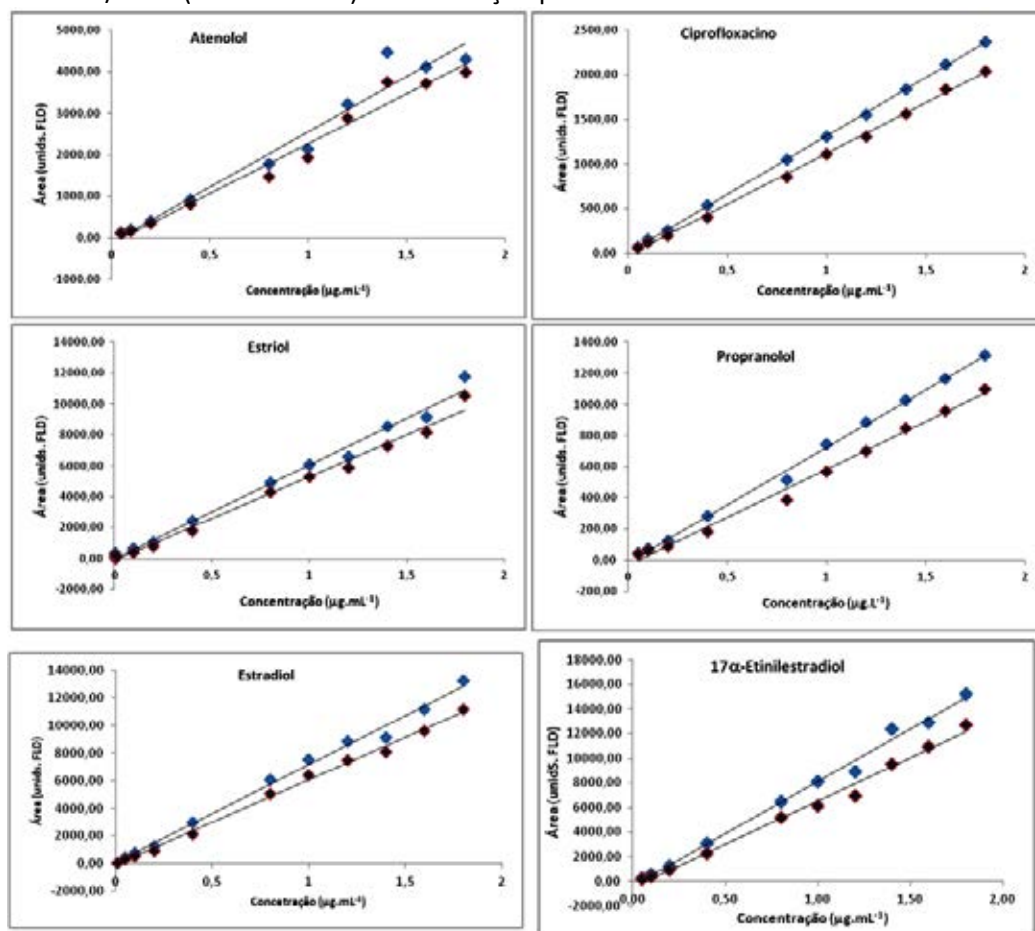
	Intervalo linear	a	b	r
Atenolol	0,05 – 1,0	2656,7	-108,42	0,9582
Ciprofloxacino	0,2 – 1,8	1306,6	+5,676	0,9997
Estriol	0,005 – 1,8	6094,3	-54,466	0,9918
Propranolol	0,1 – 1,8	737,12	-12,678	0,9975
Estradiol	0,05 – 1,8	7106,1	+35,283	0,9939
17 α -Ethinilestradiol	0,2 – 1,8	8488,4	-335,62	0,9935

Valores expressos em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

As curvas foram preparadas e injetadas no mesmo dia para eliminação de eventuais erros inerentes ao equipamento ou estocagem das soluções de trabalho, sendo que cada ponto da curva foi injetado em triplicata. Os coeficientes de correlação obtidos dessas curvas analíticas foram considerados aceitáveis de acordo com o preconizado pelo INMETRO (2010) e ANVISA (2012) que estabeleceram como requisito, nesta ordem, o coeficiente ser igual a 0,90 e superior a 0,99.

Como a resposta dos detectores espectrofotométricos pode mudar, de acordo com o tempo de uso das lâmpadas, foram construídas curvas analíticas das soluções padrão em solvente, no início da campanha de amostragem e no final (Figura IV.4).

Figura IV.4: Curvas analíticas em metanol obtidas nos meses de Julho/2014 (em azul) e Outubro/2014 (em vermelho) com detecção por FLD.



Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) instrumentais determinados estão apresentados na Tabela IV.3.

Tabela IV.3: Limites de detecção e quantificação instrumentais, obtidos para o sistema HPLC-FLD utilizado neste trabalho.

Analitos	Fluorescência (µg.mL ⁻¹)	
	LD	LQ
Atenolol	0,005	0,01
Ciprofloxacino	0,01	0,05
Estriol	0,001	0,004
Propranolol	0,02	0,05
Estradiol	0,005	0,02
17α-Etinilestradiol	0,01	0,03

3. Otimização e validação de métodos

Os ensaios de exatidão e precisão do método foram realizados utilizando amostras fortificadas com os analitos. As amostras enriquecidas foram mantidas em contato com os analitos após a fortificação pelo tempo de 1 a 1,5h, antes da análise para que o equilíbrio fosse alcançado.

3.1 Avaliação do método de extração

Neste trabalho foram testados dois cartuchos: Oasis MCX e Strata-X. A Tabela IV.4 apresenta os resultados das recuperações e os coeficientes de variação obtidos com cada cartucho.

Tabela IV.4: Valores de recuperação e coeficiente de variação (CV) obtidos para o método de extração SPE utilizando os cartuchos Oasis-MCX e Strata-X.

Analitos (1 µg mL ⁻¹)	Cartucho Strata -X		Cartucho Oasis	
	Recuperação (%)	C.V.(%)	Recuperação (%)	C.V.(%)
Atenolol	84	0,02	59	0,24
Ciprofloxacino	88	0,04	83	0,15
Estriol	91	0,01	11	0,12
Propranolol	77	0,07	115	0,40
Estradiol	95	0,01	8	0,42
17α- Ethinilestradiol	97	0,01	79	0,09

De acordo com os resultados apresentados verifica-se que o cartucho Strata-X foi mais adequado para a extração dos estrógenos nas amostras de águas superficiais do que o cartucho Oasis-MCX.

O cartucho Oasis-MCX possui uma fase polimérica otimizada para alcançar maior seletividade e sensibilidade na extração de compostos básicos com grupos de troca catiônica. É de se esperar que o mesmo fosse mais eficiente na extração de compostos mais básicos como os fármacos deste projeto, pois como visto na Tabela 1.4, estas substâncias possuem caráter mais básico. Dado que a fase

polimérica presente no cartucho testado era constituída de 30mg de sorbente, este fator pode ter contribuído para a não retenção dos analitos.

Visto que as recuperações utilizando-se os cartuchos STRATA-X foram satisfatórias, tanto para a extração dos fármacos, quanto para os estrógenos deste trabalho, optou-se por continuar com este no estudo ambiental. Deve-se levar em consideração também que o cartucho Strata-X é mais barato que o cartucho Oasis MCX.

A verificação da eficiência da extração (Tabela IV.5) foi feita através das análises de amostras fortificadas, em níveis de concentração baseados nos níveis de resposta do detector utilizado nas análises e com outros trabalhos apresentados na literatura (CAMACHO-MUNÕS, 2009; CASTIGLIONI, 2005; NEBOT et al, 2007; VALCARCÉL et al., 2011)

Tabela IV.5: Valores de recuperação e coeficiente de variação (CV) obtidos para o método de extração SPE para água superficial

Analitos	Nível de Fortificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% Recuperação média	CV (%)
Atenolol	0,5	75	0,06
	1,0	84	0,02
	1,5	80	0,03
Ciprofloxacino	0,5	75	0,03
	1,0	88	0,04
	1,5	74	0,13
Estriol	0,5	85	0,02
	1,0	91	0,01
	1,5	97	0,01
Propanolol	0,5	75	0,15
	1,0	77	0,07
	1,5	73	0,08
Estradiol	0,5	95	0,01
	1,0	95	0,01
	1,5	92	0,01
17 α - Ethinilestradiol	0,5	91	0,06
	1,0	97	0,01
	1,5	91	0,02

Os valores médios das áreas obtidas no ensaio de recuperação, para cada analito, foram comparados às áreas do ponto da curva analítica correspondente,

preparado no extrato da matriz. O desempenho do método foi avaliado com a amostra acidificada a pH 3 pela adição de ácido acético. Este procedimento foi feito, pois com base em resultados de outros projetos desenvolvidos no grupo de pesquisa, verificou-se que a recuperação é melhorada com a amostra acidificada, já que este procedimento aumenta a polaridade dos analitos, deixando-os menos retidos na fase polimérica (SPE).

Os resultados revelam eficiência da extração para os três níveis de fortificação com valores de recuperação entre 71 – 95% e coeficientes de variação entre 0,01 e 0,15%. Estes valores estão inseridos no limite aceitável para metodologias de extração em matrizes complexas (50 – 120%) estabelecido pela Diretiva 2002/657/EC indicando que a metodologia para extrair os compostos é altamente reprodutível.

A determinação dos limites de detecção e quantificação do método de extração (Tabela IV.6) foi realizada durante a validação do método através da análise de amostras testemunha conforme Ribeiro et al, 2008.

Tabela IV.6: Limites de detecção e quantificação do método para extração de fármacos e estrógenos em amostras de água superficial testemunha coletadas na UGRHI-21 e UGRHI-22

Analitos	Amostra testemunha	Fluorescência	
		LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Atenolol	UGRHI-21	0,17	0,51
	UGRHI-22	0,18	0,66
Ciprofloxacino	UGRHI-21	0,18	0,54
	UGRHI-22	0,28	1,05
Estriol	UGRHI-21	0,016	0,048
	UGRHI-22	0,031	0,070
Propranolol	UGRHI-21	0,17	0,51
	UGRHI-22	0,24	0,86
17 β -Estradiol	UGRHI-21	0,078	0,23
	UGRHI-22	0,10	0,39
17 α - Ethinilestradiol	UGRHI-21	0,12	0,34
	UGRHI-22	0,15	0,60

Dados que o estudo ocorreu em duas regiões diferentes, foram utilizadas amostras de água testemunha da UGRHI-21 e da UGRHI-22, coletadas nos mesmos pontos das amostras utilizadas nos testes de verificação do efeito matriz.

Os resultados apontam que os limites de detecção e quantificação estiveram mais altos quando o método foi empregado para as amostras coletadas na UGRHI-22. O relatório de qualidade das águas superficiais (CETESB, 2013) aponta que os valores de demanda bioquímica de oxigênio nesta região possui valores mais altos que na UGRHI-21. Este parâmetro de qualidade da água está relacionado com o teor orgânico das águas, o que explica a elevação dos LD's e LQ's do método para as amostras testemunhas coletadas na região.

3.2 Avaliação do Efeito Matriz

Como observado pelos LD's e LQ's do método de extração, é necessário avaliar a extensão da adsorção dos analitos aos componentes da matriz. Para que fosse feita uma estimativa do comportamento dos padrões em solvente e no extrato das águas superficiais, amostras testemunha de cada matriz foram submetidas ao processo de extração, porém a ressuspensão do extrato seco foi realizada com a solução dos padrões preparadas em solvente e em diferentes concentrações.

As Figuras IV.5 e IV.6 apresentam os cromatogramas separados e sobrepostos para o nível de $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, dentro da faixa de trabalho, utilizados na otimização dos métodos.

Figura IV.5: Cromatogramas (HPLC – FLD) das soluções preparadas em solvente (vermelho), no extrato da matriz (rosa) e amostra testemunha (azul) (cromatogramas separados).

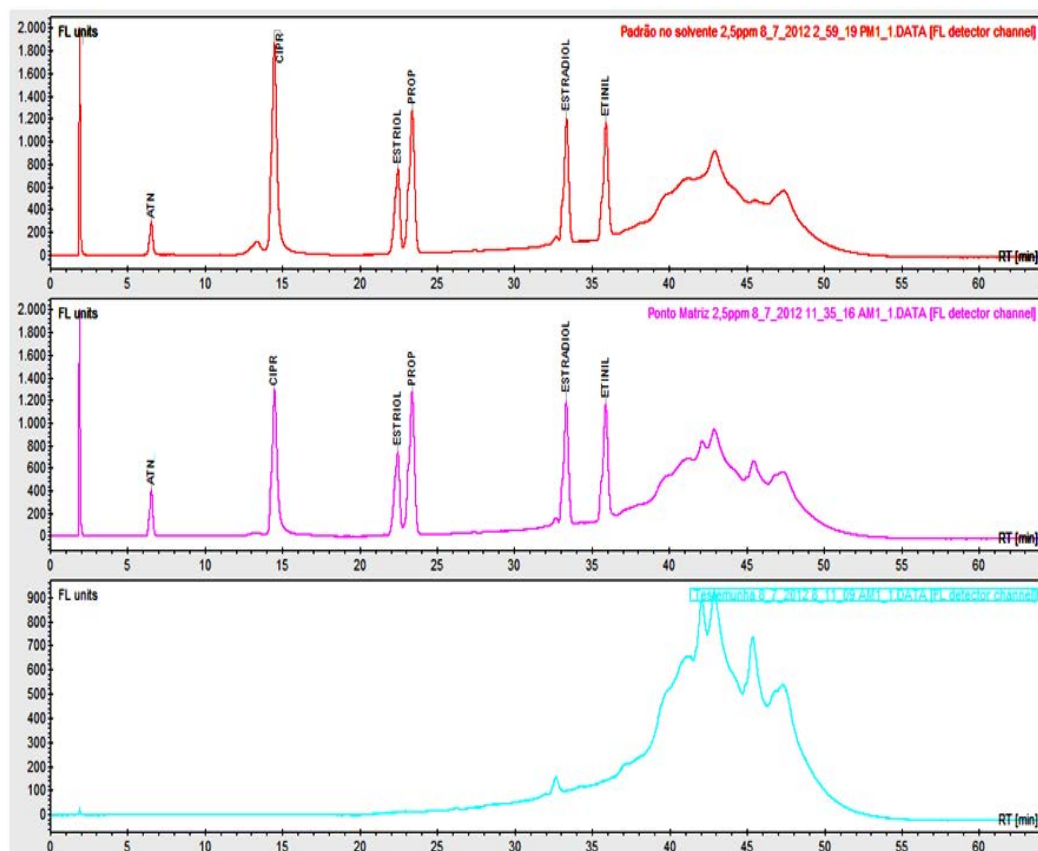
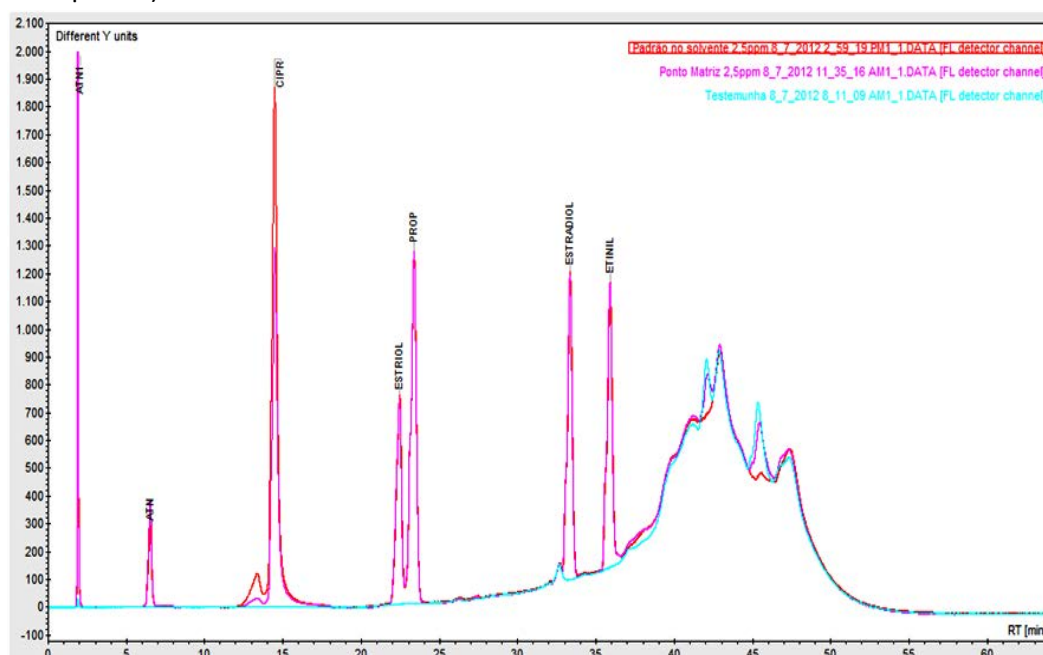
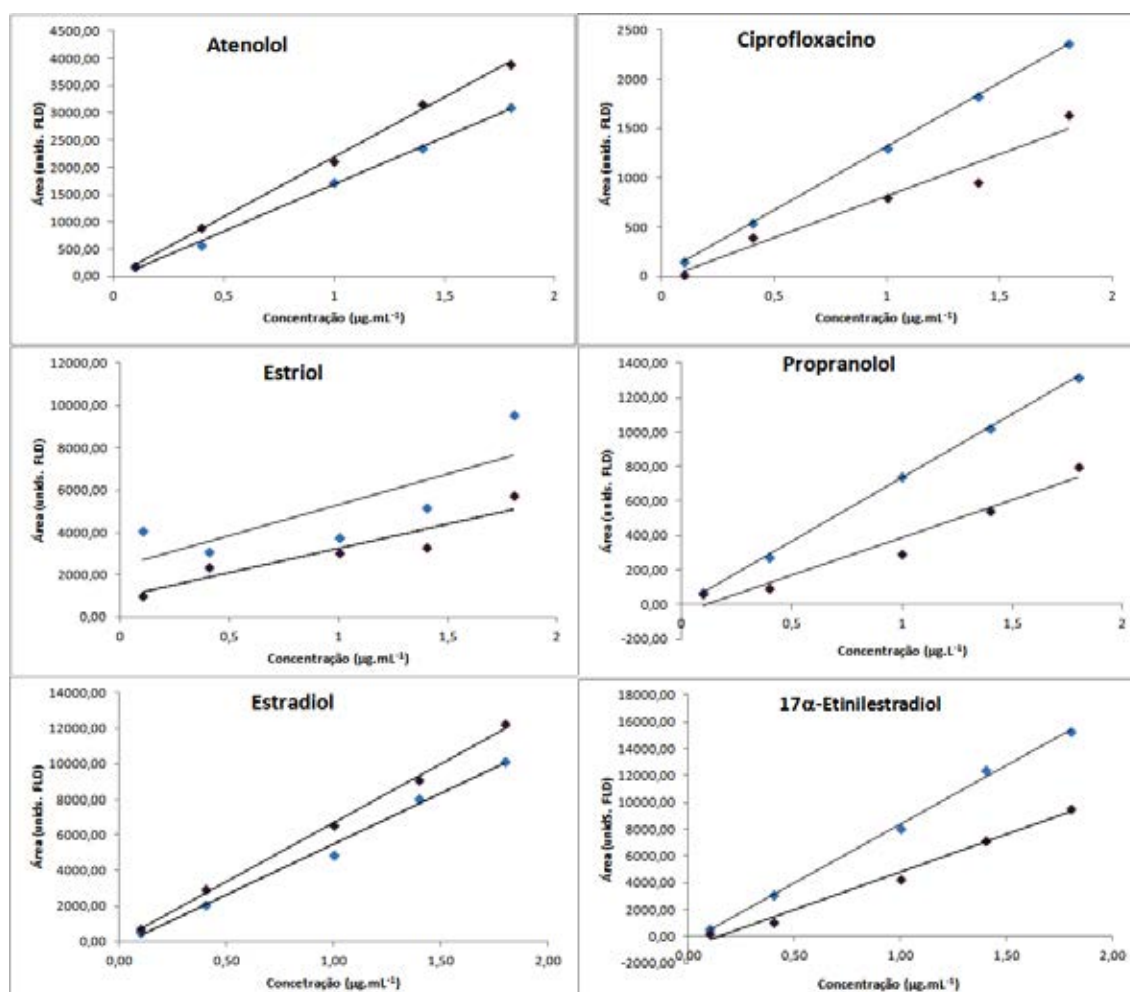


Figura IV.6: Cromatogramas (HPLC – FLD) das soluções preparadas em solvente (vermelho), no extrato da matriz (rosa) e amostra testemunha (azul) (cromatogramas sobrepostos).



Para análise do efeito induzido pela matriz em água de rio foram utilizados 5 pontos da curva de calibração do sistema analítico. Na Figura IV.7 estão apresentadas as curvas analíticas sobrepostas obtidas para cada analito em solvente e no extrato da matriz. Nelas, é possível notar superestimação do sinal analítico para todas as substâncias, exceto para atenolol.

Figura IV.7: Curvas analíticas obtidas em solvente acetonitrila e na matriz água de rio detecção por FLU. Azul – curva no solvente; Vermelho – curva na matriz.



De acordo com a comparação dos coeficientes angulares (sensibilidade) das curvas os resultados indicam que a resposta é afetada pelo efeito da matriz.

A Tabela IV.7 indica a extensão dos efeitos da matriz na sensibilidade do método de extração, avaliados estatisticamente através do teste t de *Student* e teste F de *Snedecor* pela comparação das variâncias. Comparando-se os

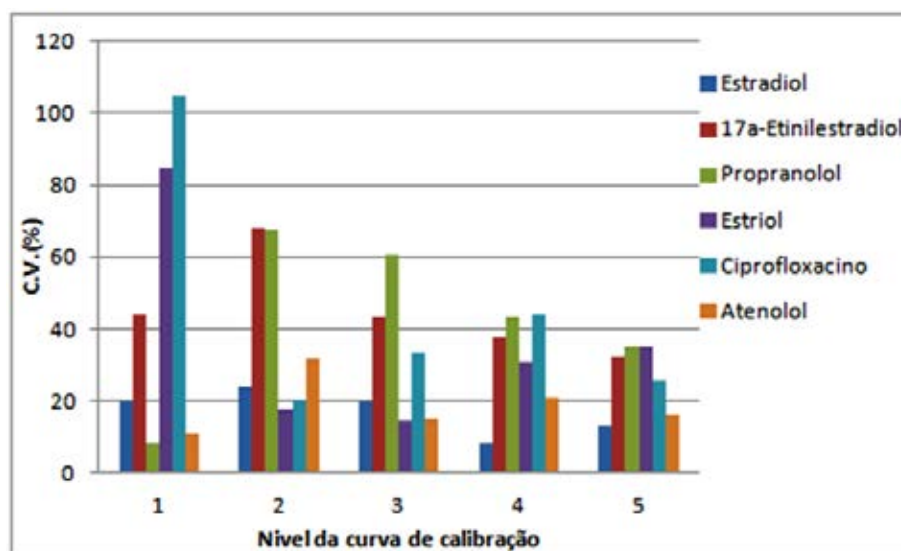
coeficientes de variação ponto a ponto da curva de calibração observa-se efeito matriz em todas as concentrações das curvas geradas.

Tabela IV.7: Estimativa do efeito da matriz na eficiência da extração de estrógenos e fármacos de água superficial.

Analito	Efeito	Teste F	Teste t	Conclusão
Estradiol	- 13%	$F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$	$T_{\text{calc}} > t_{\text{tab}}$	Há efeito
17α - Ethinilestradiol	- 36%	$F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$	$T_{\text{calc}} > t_{\text{tab}}$	Há efeito
Propranolol	- 41%	$F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$	$T_{\text{calc}} > t_{\text{tab}}$	Há efeito
Estriol	- 21%	$F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$	$T_{\text{calc}} > t_{\text{tab}}$	Há efeito
Ciprofloxacino	- 34%	$F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$	$T_{\text{calc}} > t_{\text{tab}}$	Há efeito
Atenolol	26%	$F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$	$T_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$	Há efeito

Comparando-se os coeficientes de variação (figura IV.8) em cada um dos pontos onde a curva de calibração responde satisfatoriamente, observa-se efeito matriz especialmente para as concentrações mais baixas utilizadas no estabelecimento da curva.

Figura IV.8: Coeficientes de variação (CV) obtidos para as análises dos padrões em solvente acetonitrila e no extrato da matriz água.



Sendo assim, as quantificações dos analitos foram feitas baseando-se nas curvas preparadas na matriz, para todos os analitos deste trabalho.

Concomitantemente à injeção de pontos da curva no solvente e na matriz, injetou-se amostra testemunha, sem adição de padrão. Ao se observar os cromatogramas sobrepostos destas três injeções, pode-se concluir que os efeitos de matriz estão relacionados à interações moleculares que os analitos tenham com componentes da água superficial, já que na amostra testemunha não são observados os picos eluídos nos mesmos tempos de retenção dos analitos.

As condições cromatográficas de análise pré-estabelecidas foram otimizadas para realizar detecção simultânea de fármacos e estrógenos por fluorescência sem afetar o desempenho do método.

O método foi submetido ao procedimento de validação que engloba parâmetros de confiabilidade analítica, incluindo o estudo da influência da matriz, que foi pronunciado para todos os analitos e, que pode ser atribuído a compostos ligados aos analitos.

O efeito matriz calculado indica que a quantificação dos analitos deverá ser realizada com base na curva preparada no extrato da matriz correspondente.

4. Ocorrência de estrógenos e fármacos em duas cidades da área de abrangência da UGRHI 21 e 22

4.1 Ocorrência dos Analitos nas Cidades de Marília e Presidente Prudente

Os analitos presentes nas amostras de água superficial coletadas nas cidades de Marília e Presidente Prudente foram quantificados por HPLC-FLD. Este por ser um sistema analítica mais sensível, está mais adequado à quantificação de substâncias como as deste trabalho, que normalmente aparecem em concentrações da ordem de ng.L⁻¹, em águas superficiais, como demonstrado nas Tabelas I.1 e I2.

A Tabelas IV.9 e IV.10 sumarizam os resultados das concentrações dos fármacos e estrógenos deste estudo, obtidos em Marília nas entradas e saídas das suas ETA's e no rio do Peixe antes de passar pela cidade, assim como em Presidente Prudente, à montante e jusante da ETE, na lagoa de captação do Rio Santo Anastácio e no sistema de distribuição de água.

Tabela IV.9: Concentração dos fármacos e estrógenos naturais e sintético obtidos da análise em água na UGRHI 21 (Marília/SP)

Ponto de Coleta	Análito ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Data da Coleta					
		09/07/14	27/08/14	11/09/14	20/10/14	10/11/14	25/11/14
Rio do Peixe	Atenolol	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Ciprofloxacino	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Estríol – E3	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Propranolol	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	17 β - Estradiol – E2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	17 α -Ethinilestradiol – EE2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Montante ETA Peixe	Atenolol	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Ciprofloxacino	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Estríol – E3	< LD	< LD	< LD	< LQ	< LD	< LQ
	Propranolol	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	17 β - Estradiol – E2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LQ
	17 α -Ethinilestradiol – EE2	< LD	< LD	< LD	< LQ	< LD	< LQ
Jusante ETA Peixe	Atenolol	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Ciprofloxacino	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Estríol – E3	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Propranolol	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	17 β - Estradiol – E2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	17 α -Ethinilestradiol – EE2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Montante ETA Cascata	Atenolol	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Ciprofloxacino	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Estríol – E3	< LD	< LD	< LD	< LQ	< LD	< LQ
	Propranolol	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	17 β - Estradiol – E2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LQ
	17 α -Ethinilestradiol – EE2	< LD	< LD	< LD	< LQ	< LQ	< LQ
Jusante ETA Cascata	Atenolol	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Ciprofloxacino	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Estríol – E3	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Propranolol	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	17 β - Estradiol – E2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	17 α -Ethinilestradiol – EE2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD

Tabela IV.10: Concentração dos fármacos e estrógenos naturais e sintético obtidos da análise em água na UGRHI 22 (Presidente Prudente/SP)

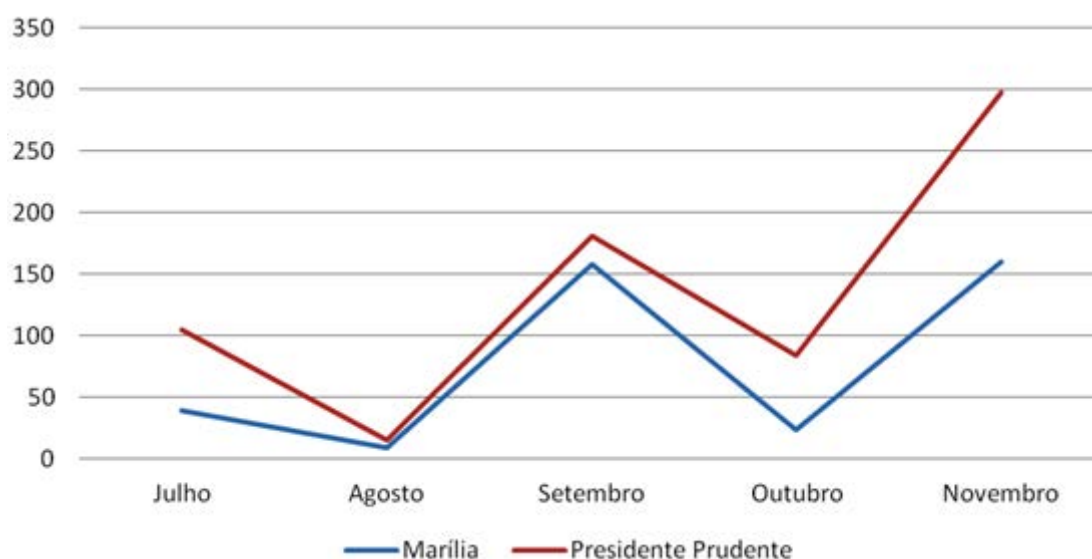
Ponto de Coleta	Analito ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Data da Coleta					
		11/07/14	19/08/14	10/09/14	14/10/14	09/11/14	24/11/14
Montante ETA PP – Captação	Atenolol	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Ciprofloxacino	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Estriol – E3	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Propranolol	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	17 β - Estradiol – E2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Jusante ETA PP – Rede de Distribuição	17 α -Etinilestradiol – EE2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Atenolol	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Ciprofloxacino	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Estriol – E3	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Propranolol	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Montante ETE PP	17 β - Estradiol – E2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	17 α -Etinilestradiol – EE2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Atenolol	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Ciprofloxacino	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Estriol – E3	< LQ	< LD	< LD	< LQ	< LD	< LQ
Jusante ETE PP	Propranolol	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	17 β - Estradiol – E2	< LD	< LD	< LD	< LQ	< LD	< LQ
	17 α -Etinilestradiol – EE2	< LQ	< LD	< LD	< LQ	< LD	< LQ
	Atenolol	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Ciprofloxacino	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Jusante ETE PP	Estriol – E3	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	Propranolol	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	17 β - Estradiol – E2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	17 α -Etinilestradiol – EE2	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD

De todos os analitos inseridos neste projeto observa-se que houve detecção apenas dos estrógenos, abaixo das quantificações permitidas pelo método proposto. As detecções observadas ocorreram apenas nos meses mais chuvosos (setembro e novembro do ano de 2014) dentro do período de monitoramento e apenas à montante dos sistemas de tratamento de água para a cidade de Marília e do sistema de tratamento de esgoto de Presidente Prudente.

A elevação da precipitação média mensal determina o aumento do volume de água nos rios, que associado à turbulência e elevação da quantidade de matéria orgânica de fonte antropogênica, promove a liberação de estrógenos anteriormente adsorvidos aos sedimentos e às substâncias húmicas.

A Figura IV.9 apresenta os índices pluviométricos publicados pela Defesa Civil Estadual para a cidade de Marília e Presidente Prudente, durante este período.

Figura IV.9: Índices pluviométricos publicados pela Defesa Civil Estadual para a cidade de Marília e Presidente Prudente, no período de monitoramento.



As figuras IV.10 e IV.11 apresentam os dados de temperatura (máxima e mínima) e dias com chuva observados no período de monitoramento.

Figura IV.10: Temperaturas máximas e mínimas e dias com chuva, durante o período de Monitoramento para a cidade de Marília (Fonte: Defesa Civil de São Paulo)

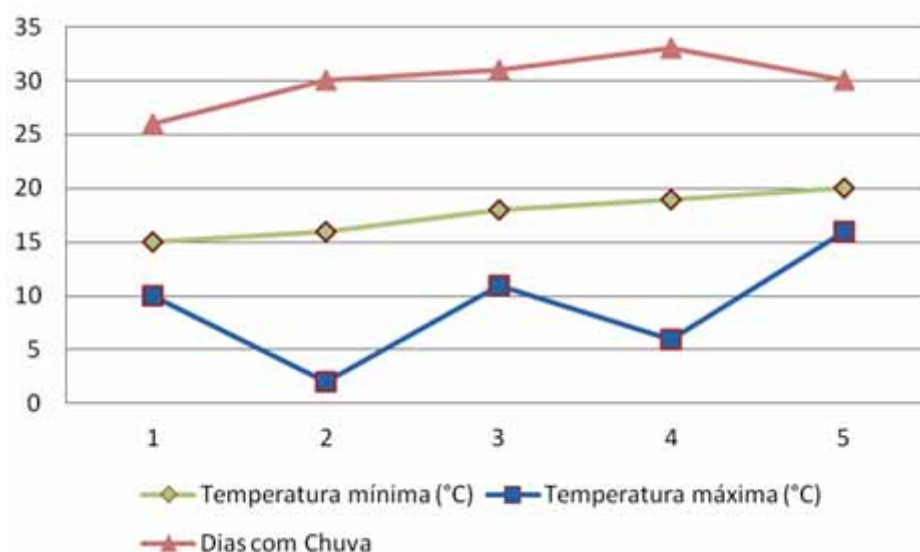
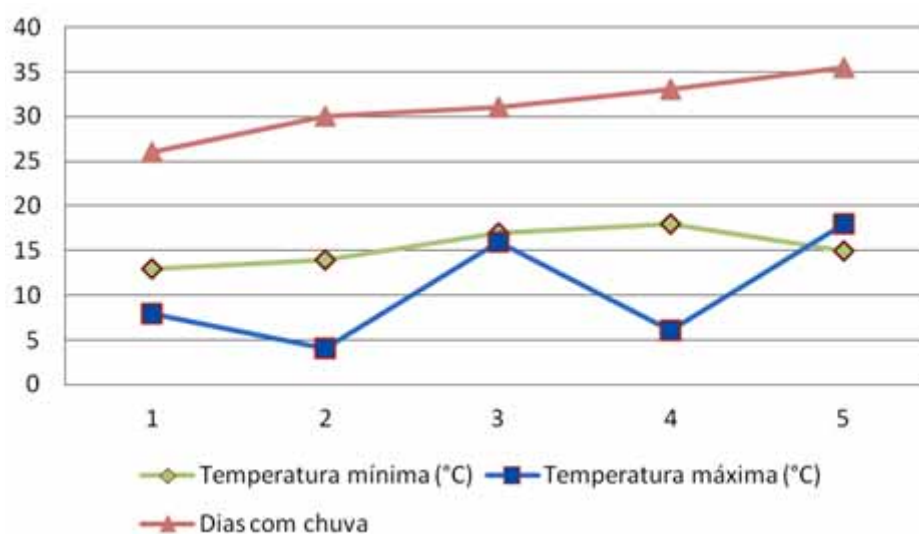


Figura IV.11: Temperaturas máximas e mínimas e dias com chuva, durante o período de Monitoramento para a cidade de Presidente Prudente (Fonte: Defesa Civil de São Paulo)



A distribuição dos microcontaminantes nos pontos escolhidos para monitoramento na cidade de Marília sugere que ao atravessar a cidade, o Rio do Peixe esteja recebendo cargas de esgoto doméstico não tratado. De acordo com dados do Relatório sobre Qualidade das Águas Superficiais da CETESB (2013) para esta cidade, a carga poluidora remanescente equivale à produzida, ou seja, não há tratamento de esgotos coletados. Dados coletados na Prefeitura Municipal de

Marília informam que a cidade não possui ETE em operação, mas que a implantação da mesma está sendo realizada, com previsão de entrega em agosto do ano de 2015 (PM, 2015)

As detecções dos estrógenos ocorreram principalmente à entrada dos sistemas de tratamento de água na cidade de Marília, indicando que há um aporte contínuo destas substâncias. Este comportamento, entretanto não foi observado à jusante dos sistemas indicando que o mesmo é capaz de diminuir as concentrações das substâncias à níveis mais seguros.

Verlicchi et al. (2012) relataram eficiências de remoção globais de micropoluentes em 244 sistemas convencionais no Mundo (localizada em países europeus, na América incluindo o Brasil, Ásia e Austrália). As remoções de estrogênio foram entre 67% e 80%. Froehner et al. (2011) estudando as eficiências de remoção de sistemas de lodo ativado, manta de lodo anaeróbio com fluxo ascendente e lagoas de estabilização, relataram eficiências de remoção de hormônio de 73,1%, 66,5% e 56,5% respectivamente. Os autores observam, entretanto que a monitorização da qualidade da água deve ser contínua e expandida a outras matrizes como lodo de esgoto. A elucidação dos mecanismos bióticos e abióticos envolvidos na degradação dos micropoluentes também poderá contribuir com o planejamento de sistemas de tratamento mais eficientes na remoção destes compostos.

É interessante observar que o estrógeno E3 foi detectado mais vezes que o E2 à montante das ETA's. Este comportamento combina com o fato do E3 ser o produto final da degradação de E2.

O estrogênio sintético EE2, princípio ativo de pílulas anticoncepcionais foi detectado com maior frequência, à montante dos sistemas de tratamento de água. Tal fator certamente está relacionado ao seu uso difundido e contínuo pela população feminina, assim como ao seu comportamento mais estável em relação aos outros estrógenos.

Para a cidade de Presidente Prudente, a visão geral que se tem em relação ao comportamento dos estrógenos, é que estavam presentes apenas à montante do sistema de tratamento de esgoto da cidade, nos períodos em que houve maior precipitação (Figura 15).

A cidade conta com sistemas de tratamento de esgotos por lodo ativado, sendo a carga orgânica remanescente de 11%, segundo dados do Relatório de Qualidade das Águas da CETESB (2013). Assim como foi observado para a cidade de Marília, o estrógeno E3 foi detectado mais vezes que E2, confirmando as discussões já apresentadas a respeito do sua degradação. O estudo publicado por Pessoa et al. (2014), onde três tipos de tratamento de esgotos foram investigados quanto à remoção de estrógenos, mostra que há maior eficiência na remoção pelo sistema de lodo ativado com pós cloração, com taxas aproximadas a 80%.

As Figuras IV.12 e IV.13 ilustram as porcentagens de ocorrência dos estrógenos nas cidades de abrangência da UGRHI 21 e 22, ao longo do monitoramento deste trabalho.

Figura IV.12: Porcentagens de ocorrência dos estrógenos na UGRHI 21 (Marília)

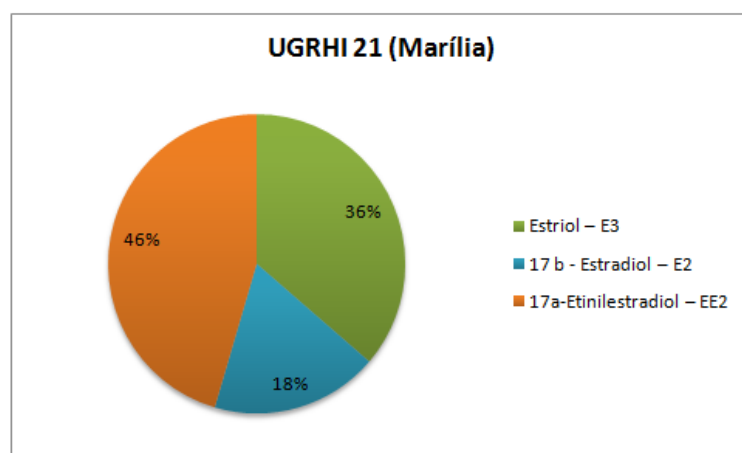
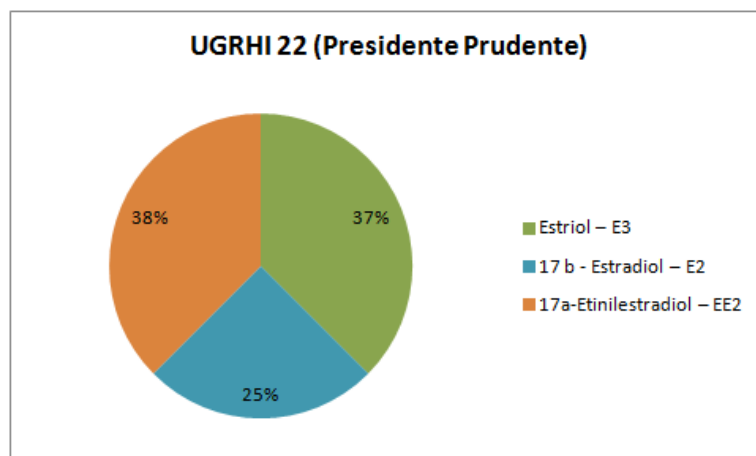


Figura IV.13: Porcentagens de ocorrência dos estrógenos na UGRHI 22 (Presidente Prudente)



A não detecção dos fármacos deste estudo pode estar relacionada a dois fatores principais: os limites de detecção do método empregado e possíveis fatores ambientais que minimizem suas concentrações ambientais.

Muitas metodologias analíticas têm sido relatadas para a quantificação de uma variedade de produtos farmacêuticos em amostras de água e efluentes, incluindo LC-MS e, em menor grau, GC-MS, como apontado na revisão analítica sobre métodos de rastreamento de resíduos de fármacos em água e efluentes, escrito por Fatta et al. em 2007.

A técnica de LC-MS e técnicas relacionadas, como cromatografia líquida de ultra performance (UPLC-MS), são técnicas robustas e sensíveis para a detecção destes tipos de compostos e dos produtos de transformação, em níveis traço, nas matrizes ambientais. Ao contrário da cromatografia gasosa (GC-MS) a LC-MS pode determinar os analitos sem a necessidade da derivatização, o que é atrativo quando se analisam simultaneamente compostos pertencentes a estruturas distintas, que envolveriam mais de uma reação de derivatização por GC-MS (FARRÉ et al, 2008).

De acordo com LI (2014) as concentrações dos fármacos normalmente diminuem do efluente das estações de tratamento de esgotos para as águas superficiais e subterrâneas. Isto porque ocorrem processos naturais, como biotransformação, fotólise, sorção, volatilização e dispersão, atenuam sua presença na água (GURR e REINHARD, 2006). Os níveis com que os fármacos são encontrados nas estações de tratamento de esgoto normalmente são mais altos, visto que muitos deles estão associados à carga orgânica do efluente.

Em um levantamento sobre a análise de β -bloqueadores em estações de tratamento de efluentes domésticos e hospitalares e águas superficiais, conduzido por Hernando et al (2005) foi observado que estes fármacos são encontrados em altas concentrações. Dado que o propranolol é eliminado do organismo com apenas 10% de sua forma metabolizada, é um dos compostos encontrados em maiores taxas, com valores que variaram entre 2,1 a 10 ng.L⁻¹. É observado que há uma redução da sua concentração na ETE de 95%. Isto acontece porque o valor de K_{ow} do propranolol é relativamente alto, indicando que o mesmo estará bastante

associado à matéria orgânica, sendo retido nas ETE's que apresentem boa redução de carga poluidora.

A ocorrência do atenolol e outros fármacos e produtos de higiene pessoal, foi investigada no rio Han (Coreia do Sul) por Yoon et al (2010). Os níveis de concentração encontrados estavam próximos de 83 ng L^{-1} e valores máximos de 150 ng L^{-1} . Os autores chamam a atenção para o fato deste fármaco possuir eliminação incompleta em sistemas de tratamento de efluentes. Comparativamente ao propranolol, o atenolol possui K_{ow} baixo o que sugere que esteja mais solubilizado na água, apresentando concentrações maiores nas águas superficiais e que seja pouco retido nas estações de tratamento de efluentes.

Um fator que contribui com a atenuação de substâncias químicas no ambiente são os processos de fotólise. As cinéticas de degradação de β -bloqueadores, incluindo atenolol e propranolol, foram estudadas por Qin-Taoliu e Willians (2006). Os autores extrapolaram os tempos de meia vida das duas substâncias para condições de radiação natural no verão e inverno europeus. Foi observado para o propranolol que no verão europeu a meia vida é de 0,6 a 1,9 dia e no inverno de 3,9 a 12 dias. Este tempo diminui para regiões onde a radiação solar é mais intensa como nas áreas tropicais. Para o atenolol os valores de meia vida variaram entre 15 e 35 dias no verão e 104 e 166 dias no inverno, confirmando que suas estruturas químicas possuem grande impacto na cinética da fotólise.

A biodegradação também deve ser levada em consideração quando da diminuição da concentração ambiental de fármacos. O atenolol é especialmente susceptível a este processo, com taxas de degradação de até 96% em 24h (MAURER, 2007).

O ciprofloxacino vem sido detectado em diversas matrizes ambientais como estações de efluentes domésticos e de hospitais e em água superficial, em concentrações que variam de ng a $\mu\text{g L}^{-1}$ (VASCONCELOS et al, 2009). Sabe-se entretanto que sua meia vida no ambiente aquático é pequena (aproximadamente 2h) pela susceptibilidade que possui a fatores ambientais que diminuem a sua concentração. Este composto tende a se adsorver ao material particulado de origem orgânica e plâncton. A biodegradação é tida como um importante

mecanismo de dissipação desta substância no ambiente, mas o principal fator de atenuação é a fotodegradação (BELDEN, MAUL, LYDY, 2006).

A análise das amostras ambientais realizadas em períodos com diferentes índices pluviométricos mostrou que a concentração ambiental dos estrógenos é fortemente influenciada por este fator climático.

Em Marília a ocorrência dos estrógenos ocorreu principalmente à montante dos sistemas de tratamento de água da cidade, sendo mais presente o E3, produto final da degradação de E2, e EE2, hormônio sintético empregado em pílulas anticoncepcionais. Em Presidente Prudente, houve maior ocorrência dos estrógenos (E3 e EE2) à montante do sistema de tratamento de esgotos, sendo que à jusante não foram detectados os mesmos níveis de E3 e EE2.

Ficou evidente que a disposição inadequada de esgotos domésticos contribui com a degradação da qualidade da água e que contaminantes emergentes estão cada vez mais presentes nos mananciais de abastecimento. O melhoramento dos sistemas de tratamento, o emprego de novas tecnologias e principalmente, medidas adequadas de esgotamento sanitário deverão ser alvo de investimentos para que esta situação seja controlada.

As condições cromatográficas de análise pré-estabelecidas foram satisfatoriamente otimizadas para análise simultânea dos fármacos atenolol, propranolol, ciprofloxacino, dos estrógenos naturais estradiol (E2) e estriol (E3) e do estrógeno sintético etinilestradiol (EE2), em detecção por fluorescência.

O método desenvolvido para análise de fármacos e estrógenos em água superficial foi submetido ao procedimento de validação que engloba parâmetros de confiabilidade analítica, incluindo linearidade, precisão intermediária, exatidão, limites de detecção e quantificação. Os coeficientes de correlação para as curvas analíticas, assim como a precisão intermediária e exatidão, foram considerados aceitáveis de acordo com o preconizado pelo INMETRO (2010) e ANVISA (2012).

O estudo da influência da matriz foi pronunciado para todos os analitos e, que pode ser atribuído a compostos ligados aos analitos. Sendo assim, a quantificação deverá ser realizada com base na curva preparada no extrato da matriz correspondente.

O método desenvolvido apesar de convencional substitui os cartuchos comumente utilizados por uma alternativa mais econômica com interações similares, o cartucho Strata-X.

A ocorrência dos estrógenos ocorreu à montante dos sistemas de tratamento de água na cidade de Marília e em Presidente Prudente as detecções aconteceram à montante do sistema de tratamento de esgoto.

Não foram observadas quantidades detectáveis dos analitos após os tratamentos de água e esgoto, assim como no Rio do Peixe em Marília e na lagoa de captação em Presidente Prudente.

CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi otimizado e validado método para análise de estrógenos (17 β estradiol, 17 α etinilestradiol e estriol) e alguns fármacos (atenolol, ciprofloxacino e propranolol) que apresentou confiabilidade e limites de detecção e quantificação da mesma ordem de grandeza de outros trabalhos relatados na literatura, utilizando-se HPLC/FLD, com a vantagem de ter sido estudado o efeito de matriz, geralmente negligenciado nos estudos existentes na literatura.

Para as amostras coletas em Marília e Presidente Prudente, foi possível a detecção apenas dos estrógenos, sendo que sua ocorrência esteve associada aos dias com maior precipitação, dentro do período de estudo.

Este foi o primeiro estudo enfocando a ocorrência de fármacos e estrógenos nestas duas UGRHs do interior de São Paulo. Estudos adicionais deverão ser efetuados, no sentido de alcançar menores limites de detecção e quantificação das moléculas estudadas, inclusão de outras moléculas com atividade biológica importante, como as oriundas de produtos de cuidado pessoal, além da extensão do estudo ambiental, em uma base espacial e temporal mais abrangente.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE nº 899, de 29 maio 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 13 jul. 2014.

AL AUKIDY, M.; VERLICCHI, P.; JELIC, A.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Monitoring release of pharmaceutical compounds: occurrence and environmental risk assessment of two WWTP effluents and their receiving bodies in the Po Valley, Italy. **Science of the Total Environment**, v. 438, n. 1, p. 15-25, Nov. 2012.

ANDREOLI, C. V.; DALARMI, O.; LARA, A. I.; ANDREOLI, F. N. Os mananciais de abastecimento do sistema integrado da Região Metropolitana de Curitiba – RMC. In: SIMPÓSIO SUL-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 9., 2000, Porto Seguro. **Anais...** Rio de Janeiro: ABES, 2000. p. 196-205.

BARNES, K. K.; CHRISTENSOON, S. C.; KOLPIN, D. W.; FOCAZIO, M. J.; FURLONG, E. T.; ZAUGG, S. D.; MEYER, M. T.; BARBER, L. B. Pharmaceuticals and other organic waste water contaminants within a leachate plume downgradient of a municipal landfill. **Groundwater Monitoring & Remediation**, v. 24, n. 2, p. 119-126, May 2004.

BELDEN, J. B.; MAUL, J. D.; LYDY, M. J. Partitioning and photodegradation of ciprofloxacin in aqueous systems in the presence of organic matter. **Chemosphere**, v. 66, p. 1390-1395, Nov. 2006.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651-666, 2007.

BROWN, K. D.; KULIS, J.; THOMSON, B.; CHAPMAN, T. H.; MAWHINNEY, D. B. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. **Science of the Total Environment**, v. 366, n. 2/3, p. 772-783, Aug. 2006

BUENO, M. J.; GOMEZ, M. J.; HERRERA, S.; HERNANDO, M. D.; AGÜERA, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: two years pilot survey monitoring. **Environmental Pollution**, v. 164, p. 267-273, Jan. 2012.

BUSZKA, P. M.; YESKIS, D. J.; KOLPIN, D. W.; FURLONG, E. T.; ZAUGG, S. D.; MEYER, M. T. Waste-indicator and pharmaceutical compounds in landfill-leachate-affected ground water near Elkhart, Indiana, 2000-2002. **Bulletin of the Environmental Pollution**, v. 82, p. 653-659, Mar. 2009.

CALDERÓN-PRECIADO, D.; MATAMOROS, V.; BAYONA, J. M. Occurrence and potential crop uptake of emerging contaminants and related compounds in an agricultural irrigation network. **Science of the Total Environment**, v. 412/413, p. 14-19, Dec. 2011

CAMACHO-MUNOZ, D.; MARTIN, J.; SANTOS, J. L.; APARICIO, I.; ALONSO, E. An affordable method for the simultaneous determination of the most studied pharmaceutical compounds as wastewater and surface water pollutants. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 18, p. 3064-3073, Sept. 2009.

CARRARA, C.; PTACEK, C. J.; ROBERTSON, W. D.; BLOWES, D. W.; MONCUR, M. C.; SVERKO, E.; BACKUS, S. Fate of pharmaceutical and trace organic compounds in three septic systems plumes, Ontario, Canada. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 8, p. 2805-2811, Mar. 2008.

CHANG, H.; HU, J. Y.; WANG, L. Z.; SHAO, B. Occurrence of sulfonamide antibiotics in sewage treatment plants. **Chinese Science Bulletin**, v. 53, n. 4, p. 514-520, Feb. 2008.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Relatório de qualidade das águas superficiais do Estado de São Paulo**. São Paulo, 2013a. 303 p.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Relatório de qualidade das águas subterrâneas do Estado de São Paulo**. São Paulo, 2013b. 222 p.

CONN, K. E.; LOWE, K. S.; DREWES, J. E.; HOPPE-JONES, C.; TUCHOLKE, M. B. Occurrence of pharmaceuticals and consumer product chemical in raw wastewater and septic tank effluent from single-family homes. **Environmental Engineering Science**, v. 27, n. 4, p. 347-356, Apr. 2010.

CORDEIRO, D. **Uso de bioindicador de efeito endócrino e validação do método para determinação de hormônios na água da Represa Municipal de São José do Rio Preto (SP)**. 2009. 45 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

DREWES, J. E. Ground water replenishment with recycled water e water quality improvements during managed aquifer recharge. **Ground Water**, v. 47, n. 4, p. 502-505, July/Aug. 2009.

DURÁN-ÁLVAREZ, J. C.; PRADO-PANO, B.; JIMÉNEZ-CISNEROS, B. Sorption and desorption of carbamazepine, naproxen and triclosan in a soil irrigated with raw wastewater: estimation of the sorption parameters by considering the initial mass of the compounds in the soil. **Chemosphere**, v. 88, n. 1, p. 84-90, June 2012.

FANG, T. H.; NAN, F. H.; CHIN, T. S.; FENG, H. M. The occurrence and distribution of pharmaceutical compounds in the effluents of a major sewage treatment plant in Northern Taiwan and the receiving coastal waters. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 7, p. 1435-1444, July 2012.

FARRÉ, M.; PÉREZ, S.; KANTIANI, L.; BARCELÓ, D. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, p. 991-1007, Dec. 2008.

FATTA, D.; NIKOLAOU, A.; ACHILLEOS, A.; MERIÇ, S. Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 515-533, June 2007.

FENET, H. Carbamazepine, carbamazepine epoxide and dihydroxycarbamazepine sorption to soil and occurrence in a wastewater reuse site in Tunisia. **Chemosphere**, v. 88, n. 1, p. 49-54, Mar. 2012.

FERNANDEZ, M. P.; NOQUEROL, T. N.; LACORTE, S.; BUCHANAN, I.; PIÑA, B. Toxicity identification fractionation of environmental estrogens in waste water and sludge using gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry and recombinant yeast assay. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 957-968, 2009.

FONTENELE, E. G. P.; MARTINS, M. R. A.; QUIDUTE, A. R. P.; MONTENEGRO JUNIOR, R. M. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 54, n. 1, p. 6-16, 2010.

FRAM, M. S.; BELITZ, K. Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 18, p. 3049-3417, Aug. 2011.

FROEHNER, S.; PICCIONI, W.; MACHADO, K.; AISSE, M. Removal capacity of caffeine, hormones, and bisphenol by aerobic and anaerobic sewage treatment. **Water Air Soil Pollution**, v. 216, n. 1/4, p. 463-471, Mar. 2011.

GAMA, M. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Degradação de hormônio por processo Fenton: incorporação em ciclodextrina. In: ENCONTRO SOBRE APLICAÇÕES AMBIENTAIS DE PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS, 5., 2009, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: USP, 2009. Disponível em: <<http://www.cepema.usp.br/wp-content/uploads/2011/06/6-Degrada%C3%A7%C3%A3o-de-h%C3%B4rmonio-por-processo-Fenton-incorpota%C3%A7%C3%A3o-em-ciclodextrina.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2011.

GAO, P.; DING, Y.; LI, H.; XAGORARAKI, I. Occurrence of pharmaceuticals in a municipal wastewater treatment plant: mass balance and removal processes. **Chemosphere**, v. 88, n. 1, p. 17-24, Apr. 2012.

GIBBS, J.; HECKATHORN, H. A.; MEYER, M.T.; KLAPINSKI, F. R.; ALEBUS, M.; LIPPINCOTT, R. L. Occurrence and partitioning of antibiotic compounds found in the water column and bottom sediments from a stream receiving two wastewater treatment plant effluents in Northern New Jersey. **Science of the Total Environment**, v. 458/480, p. 107-116, Aug. 2013.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3 695-706, maio/jun. 2007.

GODFREY, E.; WOESSNER, W. W.; BENOTTI, M. J. Pharmaceuticals in on-site sewage effluent and ground water, Western Montana. **Ground Water**, v. 5, n. 3, p. 263-271, May/June 2007.

GOMÉS, M. J.; PETROVIĆ, M.; ALBA, A. R. F.; BARCELÓ, D. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. **Journal of Chromatography A**, v. 1114, n. 2, p. 224-233, May 2006.

GONG, J.; RAN, Y.; CHEN, D.; YANG, Y.; MA, X. Occurrence and environmental risk of endocrine-disrupting chemicals in surface waters of the Pearl River, South China. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 156, n. 1/4, p. 199-210, Sept. 2009.

GURR, C. J.; REINHARD, M. Harnessing natural attenuation of pharmaceuticals and hormones in rivers. **Environmental Science Technology**, v. 40, p. 2872-2876, May 2006.

HERNANDO, M. D.; MEZCUA, M.; FERNANDEZ-ALBA, A. R.; BARCELO, D. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. **Talanta**, v. 69, p. 334-342, Nov. 2005.

HOA, P. T.; MANAGAKI, S.; NAKADA, N.; TAKADA, H.; SHIMIZU, A.; ANH, D. H.; VIET, P. H.; SUZUKI, S. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 15, p. 2894-2901, July 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Brasília, 2010. 35 p.

JOHNSON, A. C.; KELLER, V.; WILLIAMS, R. J.; YOUNG, A. A practical demonstration in modelling diclofenac and propranolol river water concentrations using a GIS hydrology model in a rural UK catchment. **Environmental Pollution**, v. 146, n. 1, p. 155-165, Aug. 2007.

KINNEY, C. A. Bioaccumulation of pharmaceuticals and other anthropogenic waste indicators in earthworms from agricultural soil amended with biosolid or swine manure. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 6, p. 1863-1870, Feb. 2008.

KLEYWEGT, S.; PILEGGI, V.; YANG, P.; HAO, C.; ZHAO, X. M.; ROCKS, C.; THACH, S.; CHEUNG, P.; WHITEHEAD, B. Pharmaceuticals, hormones and bisphenol A in untreated source and finished drinking water in Ontario, Canada d occurrence and treatment efficiency. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 8, p. 1481-1488, Mar. 2011.

KUHNEN, A.; IMPROTA, R. L.; SILVEIRA, S. M. Comportamento humano e recursos naturais: qualidade e disponibilidade da água avaliadas pelos usuários. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 25, n. 3 p. 453-460, jul./set. 2009.

KUMAR, S. S. **Correlating molecular structures and properties of emerging contaminants with environmental fate models**. 2010. 89 f. Thesis (Master of Science) - Oklahoma State University, Oklahoma, 2010.

KÜMMERER, K. **Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks**. 3rd ed. Berlin: Springer, 2008. 521 p.

KUSTER, A.; AZEVEDO, D. A.; ALDA, M. J. L.; AQUINO NETO, F. R.; BARCELÓ, D. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil). **Environment International**, v. 35, n. 7, p.997-1003, Oct. 2009.

LAPWORTH, D. J.; BARAN, N.; STUART, M. E.; WARD, R. S. Emerging organic contaminants in groundwater: a review of sources, fate and occurrence. **Environmental Pollution**, v. 163, p. 287-303, Apr. 2012.

LI, W. C. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. **Environmental Pollution**, v. 187, p. 193-201, Apr. 2014.

LIU, Q - T; WILLIAMS, H. Kinetics and degradation products for direct photolysis of β -blockers in water. **Environmental Science Technology**, v. 41, p. 803-810, Dec. 2006

LOOS, R.; LOCORO, G.; COMERO, S.; CONTINI, S.; SCHWESIG, D.; WERRES, F.; BALSAA, P.; GANS, O.; WEISS, S.; BLAHA, L.; BOLCHI, M.; GAWLIK, B.M. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. **Water Research**, v. 44, n.15, p. 4115-4126, July 2014.

LOPES, L. G. **Estudo sobre a ocorrência de estrógenos em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal – SP**. 2007. 122 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

LÓPEZ-SERNA, R.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Occurrence and distribution of multi-class pharmaceuticals and their active metabolites and transformation products in the Ebro River basin (NE Spain). **Science of the Total Environment**, v. 440, p. 280-289, Dec. 2012.

LORPHENSRI, O.; INTRAVIJIT, J.; SABATINI, D. A.; KIBBEY, T. C. G.; OSATHAPAN, K.; SAIWAN, C. Sorption of acetaminophen, 17-ethynylestradiol, nalidixic acid, and norfloxacin to sílica, alumina, and a hydrophobic medium. **Water Research**, v. 40, n. 7, p. 1481-1491, Apr. 2006.

MAROTTA, H.; SANTOS, R. O.; ENRICH-PRAST, A. Monitoramento limnológico: um instrumento para a conservação dos recursos hídricos no planejamento e na gestão urbano-ambientais. **Ambiente & Sociedade**, v. 11, n. 1, p. 67-69, jan./jun. 2008.

MARTÍN, J.; CAMACHO-MUÑOZ, D.; SANTOS, J. L.; APARICIO, I.; ALONSO, E. Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal. **Journal of Hazardous Material**, v. 239/240, p. 40-47, Nov. 2012.

MAURER, M.; ESCHER, B. I.; RICHLE, P.; SCHAFFNER, C.; ALDER, A. C. Elimination of β -blockers in sewage treatment plants. **Water Research**, v. 41, p. 1614-1622, Feb. 2007

MOMPELAT, S.; BOT, B. L.; THOMAS, O. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. **Environment International**, v. 35, n. 5, p. 803-814, July 2009.

MOURA, J. A. **Estudo da eficiência de Estações de Tratamento de Esgoto - ETE e Estações de Tratamento de Água – ETA na eliminação de resíduos de estrógenos naturais e sintéticos na UGRHI-13 (Tietê-Jacaré)**. 2009. 188 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

PAL, A.; GIN, K. Y.; LIN, A. Y.; REINHARD, M. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 24, p. 6062-6069, Nov. 2010.

PESSOA, G. P.; SOUZA, N. C.; VIDAL, C. B.; ALVES, J. A. C.; FIRMINO, P. I. M.; NASCIMENTO, R. F.; SANTOS, A. B. Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 490, p. 288-295, May 2014.

POJANA, G.; GOMIERO, A.; JONKERS, N.; MARCOMINI, A. Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a costal lagoon. **Environment International**, v. 33, n. 7, p. 929-936, Oct. 2007.

PREFEITURA DE MARÍLIA. **Obras do tratamento de esgoto são vistoriadas**. Marília, 2014. Disponível em: <<http://www.marilia.sp.gov.br/prefeitura/?p=44070>>. Acesso em: 01 fev. 2015.

PRIETO, A. G. **Coacervados y hemimicelas/admicelas como sistemas extractantes de alteradores endócrinos**. 2008. 243 f. Tesis (Doctoral en Ciencias Químicas) - Universidad de Córdoba, Córdoba, 2008.

RAIMUNDO, C. C. M. **Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais a bacia do rio Atibaia**. 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

REIS FILHO, R. W. **Hormônios estrógenos no Rio Monjolinho, São Carlos – SP: uma avaliação da problemática dos desreguladores endócrinos ambientais**. 2008. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

SÁNCHEZ-ANDRADE, G.; KENDRICK, K. M. Roles of α - and β -estrogen receptors in mouse social recognition memory: effects of gender and the estrous cycle. **Hormones and Behavior**, v. 59, n. 1, p. 114-122, Jan. 2011.

SANTOS, J. L.; APARICIO, I.; ALONSO, E.; CALLEJON, M. Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by SPE and HPLC-DAD-FL. **Analytica Chimica Acta**, v. 550, n. 1/2, p. 116-122, Sept. 2005.

SÃO PAULO (Estado). **Lei nº 7663, de 30 de dezembro de 1991**. Estabelece normas de orientação à Política Estadual de Recursos Hídricos bem como ao Sistema Integrado de Gerenciamento de Recursos Hídricos. Disponível em: < <http://governo-sp.jusbrasil.com.br/legislacao/180981/lei-7663-91> >. Acesso em: 06 fev. 2015.

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

SIM, W. J.; LEE, J. W.; LEE, E. S.; SHIN, S. K.; HWANG, S. R.; OH, J. E. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. **Chemosphere**, v. 82, n. 2, p. 179-186, Jan. 2011.

SNYDER, S. A. Occurrence, treatment, and toxicological relevance of EDCs and pharmaceuticals in water. **Ozone: Science & Engineering**, v. 30, n. 1, p. 65-69, Mar. 2008.

SOUZA, J. B. G. **Estudo da ocorrência de tetraciclinas e estrógenos em água superficial, subterrânea e esgoto tratado na cidade de Campo Grande (MS)**. 2008. 155 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

SOUZA, J. B. G.; MOURA, J. A.; LOPES, G. L.; MARCHI, M. R. R. Hormônios estrogênicos no ambiente e eficiência das tecnologias de tratamento para remoção em água e esgoto. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 13, n. 4, p. 123-131, out./dez. 2008

STUMPF, M.; TERNES, T. A.; WILKEN, R.-D.; RODRIGUES, S. V.; BAUMANN, W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1-2, p. 135-141, Jan. 1999.

SWAN, S. H.; LIU F.; OVERSTREET, J. W.; BRAZIL, C.; SKAKKEBAEK, N. E. Semen quality of fertile US males in relation to their mothers' beef consumption during pregnancy. **Human Reproduction**, v. 22, n. 6, p. 1497-1502, June 2007.

TAYLOR, D.; SENAC, T. Human pharmaceutical products in the environment – The “problem” in perspective. **Chemosphere**, v. 115, n. 95, p. 95-99, Nov. 2014.

TERNES, T. A.; STUMPF, M.; HABERER, K.; WILKEN, R. D.; SERVOS, M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants — I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1/2, p. 81-90, Jan. 1999.

TERZIC, S.; SENTA, I.; AHEL, M.; GROS, M.; PETROVIĆ, M.; BARCELO, D.; MÜLLER, J.; KNEPPER, T.; MARTÍ, I.; VENTURA, F.; JOVANČIĆ, P.; JABUČAR, D. Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region. **Science of the Total Environment**, v. 399, n. 1/3, p. 66-77, July 2008.

TORRES, N. H.; AMPERICO, J. H. P.; FERREIRA, L. F. R.; NAZATO, C.; MARANHO, L. A.; VILCA, F. Z.; TORNISIELO, V. L. Fármacos no ambiente – Revisão. **Revista de Estudos Ambientais**, v. 14, n. 4, p. 67-75, jul./dez. 2012.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. A.; RIEDO, C. R. Análise quantitativa por cromatografia. **Chemkeys: Liberdade para Aprender**, 2003. Disponível em: <http://chemkeys.com/br/wp-content/themes/chemkeysbr/articleI.php?u=YW5hbGlzZS1xdWFudGl0YXRpdmEtcG9yLWNyb21hdG9ncmFmaWE=>>. Acesso em: 10 jul. 2013.

Van STEMPOORT, D. R.; ROY, J. W.; GRABUSKI, J.; BROWN, S. J.; BICKERTON, G.; SVERKO, E. An artificial sweetener and pharmaceutical compounds as co-tracers of urban wastewater in groundwater. **Science of the Total Environment**, v. 461-462, p. 348-359, Sept. 2013.

VASCONCELOS, T. G.; KÜMMERER, K.; HENRIQUES, D. M.; MARTINS, A. F. Ciprofloxacin in hospital effluent: degradation by ozone and photoprocesses. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, p. 1154-1158, Apr. 2009

VERLICCHI, P.; AL AUKIDY, M.; ZAMBELLO E. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment - a review. **Science of the Total Environment**, v. 429, p. 123-155, July 2012.

VIENO, N. M.; HÄRKKI, H.; TUHKANEN, T.; KRONBERG, L. Occurrence of pharmaceuticals in river water and their elimination in a pilot-scale drinking water treatment plant. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 14, p. 5077-5084, June 2007.

WEI, Y.; JIN-MING, L. Progress in sample pretreatment for analysis of estrogens with liquid chromatography-mass spectrometry. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 38, n. 4, p. 598-606, Apr. 2010.

WU, C. X.; SPONGBERG, A. L.; WITTER, J. D.; FANG, M.; CZAJKOWSKI, K. P. Uptake of pharmaceutical and personal care products by soybean plants from soils applied with biosolids and irrigated with contaminated water. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 16, p. 6157-6161, Aug. 2010.

YAN, S.; SUBRAMANIAN, B. S.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y.; ZANGT, C. Emerging contaminants of environmental concern: source, transport, fate, and treatment. **Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management**, v. 14, p. 2-20, 2010.

YING, G.-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, Dec. 2002.