



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



TESE DE DOUTORADO

CONTAMINANTES EMERGENTES EM ÁGUA TRATADA E SEUS MANANCIASIS: SAZONALIDADE, REMOÇÃO E ATIVIDADE ESTROGÊNICA

Cassiana Carolina Montagner Raimundo

Orientador: Prof. Dr. Wilson de Figueiredo Jardim

Campinas

2011.

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

R133c Raimundo, Cassiana Carolina Montagner (1981-).
Contaminantes emergentes em água tratada e seus
mananciais: sazonalidade, remoção e atividade
estrogênica / Cassiana Carolina Montagner Raimundo. –
Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Wilson de Figueiredo Jardim.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Química.

1. Contaminantes emergentes. 2. Interferentes
endócrinos. 3. Água tratada. 4. Mananciais. I. Jardim,
Wilson de Figueiredo. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Emerging contaminants in source and drinking waters: seasonalities, removal and estrogenic activity

Palavras-chave em inglês:

Emerging contaminants
Endocrine disruptors compounds
Drinking water
Surface water

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

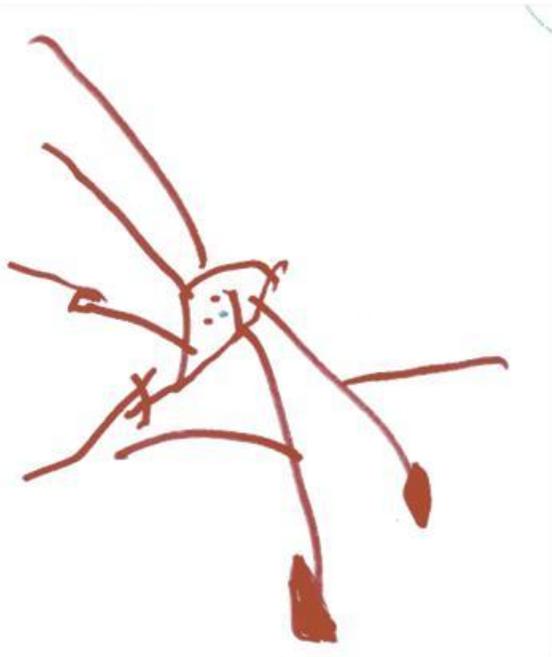
Wilson de Figueiredo Jardim [Orientador]
Antonio Aparecido Mozeto
Robson José de Cássia Franco Afonso
Susanne Rath
Carol Hollingworth Collins

Data de defesa: 22/09/2011

Programa de pós-graduação: Química

***“Nem tudo que se enfrenta
pode ser modificado,
mas nada pode ser modificado
até que seja enfrentado.”
(Albert Einstein)***

DEDICATÓRIA



*Ao meu amado marido Ivo,
pela paciência infinita, e
por nunca me deixar desistir.*

*Em especial, à minha princesa
Giovanna, tesouro da minha vida.
Nasceu e cresceu com esse trabalho
e hoje, comemora comigo
a realização de mais esse sonho!*

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Sergio e Penha
e ao meu querido irmão Rodrigo,
por todo amor, carinho e admiração.
O esforço realmente valeu a pena!*

AGRADECIMENTOS

Ao Wilson, pela orientação, respeito e amizade nesses oito anos de convivência.

À todos os colegas do LQA e do GIA que passaram por aqui nesses anos todos de trabalho...e olha que teve gente viu...

Em especial as amigas, Cláudia, Nívea, Débora, Cris, Amanda, Glau e Lívia e, aos amigos Matheus, Alói, e Marco, pelo companheirismo nesses anos todos de convivência.

Aos professores do IQ, que durante os anos de graduação, mestrado e doutorado se dedicaram a me ensinar Química. Em especial a Susanne, Bel Jardim e Jarbas por todo apoio e amizade. Muito obrigada por tudo!

Ao pessoal da CPG, pela competência no trabalho burocrático, em especial a Bel pela amizade. E a todos os funcionários do IQ.

À Silvia, Anderson e Wilson pelas amostras de água tratada.

Às minhas grandes amigas Lara, Jana, Glaís, Gi, Elaine, Aline, Ju, Elaine, Mônica, Veri e Kátia que enchem a minha vida de alegria pela amizade de tantos anos.

E, sobretudo, aos meus pais, meu irmão, meu marido e minha filha, que tanto amo e, que sem eles nada disso teria sido possível.

Foram até agora, 8 anos de LQA. Aqui eu aprendi muito sobre química, sobre ética, sobre didática, conheci muita gente e fiz muitas amizades que eu vou levar comigo para a vida toda. Assisti muitas aulas e dei algumas também... participei de vários congressos e ajudei a organizar alguns. Me emocionei, chorei, fiquei nervosa, ansiosa, orgulhosa, e ri muito também. Hoje vejo que tudo valeu muito à pena!

É... eu realmente tenho muito que agradecer à Deus por tudo isso!

APOIO



CURRICULUM VITAE

1. Formação Acadêmica

PÓS GRADUAÇÃO:

Doutorado na área de Química Ambiental desenvolvido no Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da UNICAMP sob orientação do Prof. Dr. Wilson F. Jardim. Período: 2007 / 2011.

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

SUPERIOR: Bacharelado em Química pela UNICAMP. Período: 2001 / 2004.

MÉDIO: Escola Técnica Estadual Bento Quirino. Técnico em contabilidade. Campinas (SP). Período: 1996 / 1998.

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

2. Produção científica

2.1. Iniciação científica

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

2.2. Mestrado

“*Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da sub-bacia do rio Atibaia*”, desenvolvido no departamento de Química Analítica do IQ-UNICAMP sob a orientação do Prof. Dr. Wilson F. Jardim. Período: 2005 / 2007.

2.3. Publicações

2.3.1. Artigos

- “*An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water*”; Wilson F. Jardim, Cassiana C. Montagner, Igor C. Pescara, Gisela A. Umbuzeiro, Ana Marcela Bergamasco, Melanie Eldridge, Fernando F. Sodr e (2011) Separation and Purification Technology, *no prelo* desde julho/2011.
- “*Bioluminescent yeast estrogen assay (BLYES) as a sensitive tool to monitor surface and drinking water for estrogenicity*”; Ana Marcela Bergamasco, Melanie Eldridge, John Sanseverino, Fernando F. Sodr e, Cassiana C. Montagner, Igor C. Pescara, Wilson F. Jardim, Gisela A. Umbuzeiro (2011) Journal of Environmental Monitoring, v 13, p 3288.
- “*Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia River, São Paulo, (Brazil)*”; Cassiana C. Montagner e Wilson F. Jardim (2011) Journal of the Brazilian Chemical Society, v 22, n 11, p 1452.
- “*Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*”; Fernando F. Sodr e, Igor C. Pescara, Cassiana C. Montagner e Wilson F. Jardim (2010) Microchemical Journal, v 96, p 92.
- “*Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais na região de Campinas (SP)*”; Fernando F. Sodr e, Cassiana C. Montagner, Marco A. F. Locatelli e Wilson F. Jardim (2007) Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology (JBSE) v2, p187.

2.3.2. Capítulos de Livros

- “*Aplicación de la fotoc talisis heterogênea em la desinfección de aguas usadas para consumo doméstico em la comunidad de Riacho da serra em São José do Sabugi, PB, Brasil.*”, Wilson F. Jardim e Cassiana C. Montagner. Livro: Resultados finales del Proyecto OEA/AE141: investigación, desarrollo, validación y aplicación de tecnologías solares para la potabilizaci n de agua en zonas rurales aisladas de América Latina y el Caribe, nov/06, ISBN: 978-987-22574-4-6

2.3.3. Outros

- “*Origem e destino de interferentes endócrinos em águas naturais*”; Fernando F. Sodr e, Marco A. F. Locatelli, Cassiana C. Montagner e Wilson F. Jardim; Caderno Temático 06, disponível *on line* desde abril de 2007 no endereço: <http://lqa.iqm.unicamp.br>
- “*Aplicación da fotocátalise heterogênea na desinfección de água e ar*”; Cassiana C. Montagner, Matheus P. Paschoalino e Wilson F. Jardim; Caderno Temático 04, disponível *on line* desde fevereiro de 2005 no endereço: <http://lqa.iqm.unicamp.br>

2.4. Trabalhos científicos apresentados em congressos internacionais

- “*Endocrine disruptors in drinking waters in the city of Campinas, SP, Brazil*”; CC Montagner*, WF Jardim (2011); 3rd - EmCon, Copenhagen, Dinamarca. (oral)
- “*Evaluation of sixteen emerging contaminants in surface and drinking water in the State of São Paulo – Brazil*” IC Pescara*, CC Montagner, AM Bergamasco, M Eldridge, GA Umbuzeiro, WF Jardim (2011); 3rd EmCon, Copenhagen, Dinamarca. (oral)
- “*Endocrine disruptors in waters from urban areas in Brazil: the urgent need to improve sanitation*” GA Umbuzeiro*, CC Montagner, IC Pescara, AM Bergamasco, FF Sodr , M Eldridge, M Solano, JL Camargo, WF Jardim (2011); 15th International Symposium on Toxicity Assessment, Hong Kong, China. (oral)
- “*In vitro bioassays to monitor estrogenic activity of surface and drinking waters in Brazil*” AM Bergamasco*, M Eldridge, FF Sodr , CC Montagner, IC Pescara WF Jardim, GA Umbuzeiro (2011); SETAC Europe 21st Annual Meeting, Mil o, Itália. (painel ET07A-6)
- “*An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water*” WF Jardim*, CC Montagner, IC Pescara, GA Umbuzeiro, AM Bergamasco, M Eldridge, FF Sodr  (2010); The Sixth International Conference on Sustainable Water Environment, Newark, Delaware (USA). (oral)
- “*Hormones and bisphenol A in drinking waters from the State of São Paulo, Brazil*” CC Montagner*, FF Sodré, IC Pescara, WF Jardim (2010); PITTCON conference & Expo 2010, realizado em Orlando, Flórida (USA). (painel)
- “*Emerging compounds in raw and from the city of Campinas, Brazil*” FF Sodré, CC Montagner, MA Locatelli, WF Jardim* (2008); PITTCON conference & Expo 2008, New Orleans (USA). (painel)
- “*Endocrine disruptors in drinking water*” WF Jardim*, FF Sodré, CC Montagner (2008); V Congresso Iberoamericano de Física y Química Ambiental, Buenos Aires, Argentina. (conferência plenária)
- “*Aplic o da fotoc lise heterogênea com luz solar na desinfec o de águas naturais*” CC Montagner*, WF Jardim (2005); Simpósio Solar Safe Water, Puerto Iguazú, Misiones, Argentina. (painel)
- “*A remo o de carbono orgânico dissolvido e de microorganismos presentes em águas naturais usando fotoc lise heterogênea com luz solar*”, CC Montagner*, WF Jardim (2004); Encuentro sobre uso y resultados de la aplicación de las tecnologías DSAUI, RAOS y FH em zonas rurales de países de América Latina, Buenos Aires, Argentina. (painel)

2.5. Trabalhos científicos apresentados em congressos nacionais

- “Contaminantes emergentes em água potável e seus mananciais: investigação detalhada para a cidade de Campinas (SP)” CC Montagner*, WF Jardim (2011); 34º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis, SC. (oral)
- “Eficiência das Estações de Tratamento de Água (ETA) convencionais na remoção de estrógenos, cafeína e bisfenol A” CC Montagner*, WF Jardim (2010); Encontro Nacional de Química Ambiental, Águas de São Pedro, SP. (painel)
- “Assessing emerging contaminants in Brazilian surface waters using ESI-LC-MS/MS in triple quadrupole” CC Montagner*, IC Pescara, FF Sodré, WF Jardim (2009); III Congresso da BrMass, Campinas, SP. (painel)
- “Determinação de estrogênios e bisfenol A em águas superficiais por LC/MS-MS com ionização por eletrospray” FF Sodré*, CC Montagner, IC Pescara, WF Jardim (2009); XV Encontro Nacional de Química Analítica, Salvador, BA. (oral)
- “Determinação de hormônios, alquilfenóis e ftalatos em água potável” CC Montagner*, WF Jardim (2008); IV Encontro Nacional de Química Ambiental, Aracajú, SE. (oral)
- “Ocorrência de compostos interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos nas águas superficiais da bacia do rio Atibaia” CC Montagner*, WF Jardim (2007); 30º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, SP. (painel AB044)
- “Compostos orgânicos xenobióticos em água potável: um novo cenário envolvendo a situação dos sistemas de água e esgoto no Brasil” FF Sodré*, CC Montagner, G Ghiselle, WF Jardim (2007); 30º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, SP. (painel AB045)
- “Determinação de fármacos e de compostos interferentes endócrinos em águas superficiais da sub-bacia do rio Atibaia” CC Montagner*, MAF Locatelli, WF Jardim (2006); III Encontro Nacional de Química Ambiental, Cabo Frio, RJ. (painel)
- “Quantificação de deposição total de mercúrio em Campinas (SP) usando a técnica CVAFS” CC Montagner*, WF Jardim (2006); 29º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, SP. (painel AB032)
- “Atividade bactericida e algicida da fotocatalise heterogênea usando TiO₂ e luz solar” CC Montagner*, WF Jardim (2005); 28º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG. (painel AB154).

RESUMO

CONTAMINANTES EMERGENTES EM ÁGUA TRATADA E SEUS MANANCIAIS: SAZONALIDADE, REMOÇÃO E ATIVIDADE ESTROGÊNICA.

O objetivo deste trabalho foi avaliar, através de um perfil anual, a qualidade dos mananciais e da água tratada de Campinas (SP) em relação à presença de cafeína, estrona, 17β -estradiol, estriol, progesterona, testosterona, 17α -etinilestradiol, mestranol, levonorgestrel, dietilestilbestrol, triclosan, 4-n-octilfenol, 4-n-nonilfenol, bisfenol A, fenolftaleína e atrazina empregando extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS/MS), e verificar o potencial estrogênico das amostras usando o bioensaio *Bioluminesce Yeast Estrogen Screening* (BLYES). Os resultados mostraram a presença de seis dos 16 compostos investigados em pelo menos uma amostra de água tratada. A estrona foi detectada apenas uma vez. Concentrações de atrazina de até 687 ng L^{-1} foram determinadas nas amostras provenientes do rio Capivari, e nas amostras de água tratada provenientes do rio Atibaia as concentrações não passaram de 42 ng L^{-1} . A fenolftaleína foi determinada em apenas uma campanha em todas as amostras provenientes do rio Atibaia em concentrações de até 20 ng L^{-1} . As concentrações médias de bisfenol A e triclosan foram 7 e 17 ng L^{-1} , respectivamente. Nos mananciais foram determinados 13 dos 16 compostos investigados. Todas as amostras de água bruta e tratada apresentaram concentrações de cafeína que variaram significativamente entre os períodos de seca e cheia dos rios. As estações de tratamento de água de Campinas, operando no sistema convencional foram capazes de remover entre 30 e 99 % dos contaminantes investigados. No mais, 40 % das amostras de água tratada apresentaram atividade estrogênica positiva (entre $0,01$ e $1,33 \text{ ngE}_{2\text{equiv}} \text{ L}^{-1}$) e todas as amostras de água bruta apresentaram estrogenicidade entre $0,06$ e $6,54 \text{ ngE}_{2\text{equiv}} \text{ L}^{-1}$. Sendo que estas foram maiores nos períodos de estiagem.

Palavras-chave: contaminantes emergentes, compostos interferentes endócrinos, cafeína, água tratada, mananciais, Campinas (SP), SPE-LC-MS/MS, BLYES bioensaio.

ABSTRACT

EMERGING CONTAMINANTS IN SOURCE AND DRINKING WATERS: SEASONALITIE, REMOVAL AND ESTROGENIC ACTIVITY.

The purpose of this work was to evaluate an annual profile of both source of supply and drinking water quality in the city of Campinas (São Paulo State) in relation to the presence of caffeine, estrone, 17 β -estradiol, estriol, progesterone, testosterone, 17 α -ethynylestradiol, mestranol, levonorgestrel, diethylstilbestrol, triclosan, 4-n-octylphenol, 4-n-nonylphenol, bisphenol A, phenolphthalein and atrazine using Solid Phase Extraction (SPE) and Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry Detection (LC-MS/MS), and make sure the estrogenic potential of samples using Bioluminesce Yeast Estrogen Screening bioassay (BLYES). Results showed the presence of six of the 16 compounds investigated in least one sample of drinking water (estrone, triclosan, bisphenol A, phenolphthalein, atrazine and caffeine). Atrazine concentrations up to 687 ng L⁻¹ were found in drinking water samples from the Capivari River. In drinking water samples from the Atibaia River, the concentrations did not exceed 42 ng L⁻¹. Phenolphthalein was determined in only one campaign in both raw and treated water from the Atibaia River at concentrations around 20 ng L⁻¹. Average concentrations of bisphenol A and triclosan in drinking water samples were 7 and 17 ng L⁻¹, respectively. Thirteen of the 16 investigated compounds were determined in surface waters. All samples of raw and treated water showed concentrations of caffeine that varied significantly between dry and wet seasons. The conventional water treatment plants in Campinas were able to remove between 30 and 99 % of the investigated contaminants. The estrogenic activity was evaluated using BLYES bioassay, where 40% of drinking water samples showed positive estrogenic activity (between 0.01 and 1.33 ngE₂_{equiv} L⁻¹) and all samples of surface water presented estrogenic activity between 0.06 and 6.54 ngE₂_{equiv} L⁻¹. These values were higher in dry winter periods.

Keywords: emerging contaminants, endocrine disruptor compounds, caffeine, drinking waters, surface waters, Campinas (SP), SPE-LC-MS/MS, BLYES bioassay.

ÍNDICE

Lista de símbolos e abreviaturas	xxv
Lista de Tabelas	xxvii
Lista de Figuras	xxix
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
CONTAMINANTES EMERGENTES	1
DESTINO NO AMBIENTE	12
EFEITOS	31
CRITÉRIOS DE QUALIDADE DE ÁGUA	38
CAMPINAS (SP)	42
OBJETIVOS	49
CAPÍTULO 2: EXPERIMENTAL	51
REAGENTES E PADRÕES	52
AMOSTRAGEM	53
MÉTODO ANALÍTICO	59
PREPARO DE AMOSTRAS: SPE	60
QUANTIFICAÇÃO DOS ANALITOS: LC-MS/MS	65
ATIVIDADE ESTROGÊNICA: ENSAIO BLYES	67
CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÕES	73
MÉTODO PARA LC-MS/MS	74
CURVA ANALÍTICA	84
AMOSTRAGEM, PERFIL DIUTURNO E SEMANAL	88
PREPARO DE AMOSTRAS	91
ATIVIDADE ESTROGÊNICA DOS COMPOSTOS	94
CONTAMINANTES EMERGENTES NOS MANANCIAS	103
CONTAMINANTES EMERGENTES NA ÁGUA TRATADA	115
EFICIÊNCIA DAS ETA DE CAMPINAS	124
ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ÁGUA CONVENCIONAL	127
CONTAMINANTES EMERGENTES NA ÁGUA SUBTERRÂNEA	130
CONCLUSÕES	133
ANEXO 1:	
DETERMINAÇÃO DE INTERFERENTES ENDÓCRINOS POR HPLC-DAD-FL	137
ANEXO 2:	
RESULTADOS DO BIOENSAIO PARA ÁGUAS TRATADAS E SUPERFICIAIS	147
ANEXO 3:	
CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS NAS ÁGUAS TRATADAS E SUPERFICIAIS DE CAMPINAS (SP)	151
REFERÊNCIAS	155

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

4n-OP: 4-n-octilfenol

4n-NP: 4-n-nonilfenol

ATZ: atrazina

BLYES: *Bioluminesce Yeast Estrogen Screening*

BPA: bisfenol A

BPAD16: bisfenol A deuterado

CAS: Chemical Abstracts Service

CAF: cafeína

CRD: Centros Reservatórios e de Distribuição - SANASA

CE₅₀: Concentração da amostra que causa efeito agudo a 50 % dos organismos.

CETESB: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CG-MS: cromatógrafo à gás acoplado ao espectrômetro de massas

CONAMA: Conselho Nacional de Meio Ambiente

DAD: Detector de arranjo de diodos

DDT: dicloro-difenil-tricloroetano

DEE: dietilestilbestrol

E1: estrona

E2: 17 β -estradiol

E2D3: estradiol deuterado

E3: estriol

EC: energia de colisão

EE2: 17 α -etinilestradiol

ESI: *Electrospray ionization*

ETA : Estação de Tratamento de Água

ETE: Estação de Tratamento de Esgoto

FL: Detector de fluorescência

hER: *Human estrogen receptor*

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

IAP: Índice de Qualidade das Águas para Fins de Abastecimento Público

IAQ: Índice de Qualidade de Águas

IVA: Índice de Qualidade das Águas para Proteção da Vida Aquática
IBAMA: Instituto Brasileiro do meio Ambiente e dos Recursos Renováveis
 K_{ow} : Coeficiente de partição octanol/água
LC-MS/MS: *Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry Detection*
LD: Limite de detecção
LQ: Limite de quantificação
LQA: Laboratório de Química Ambiental
MEE: mestranol
MRM: *Multiple Reaction Monitoring*
m/z: razão massa/carga
NGT: levonorgestrel
HLB: *Hydrophilic-lipophilic-balanced*
OMS: Organização Mundial da Saúde
Phph: fenolftaleína
 pK_a : constante de dissociação ácida
PROG: progesterona
SANASA: Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A
SEMAE: Serviço Municipal de Água e Esgoto
SPE: *Solid Phase Extraction*
TCS: triclosan
TEQ: *Toxic Equivalent Coefficient*
TTN: testosterona
UASB: *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*
USEPA: United States Environmental Protection Agency
USFDA: *U.S. Food and Drug Administration*
UV: tratamento com ultravioleta ou detector por ultravioleta
UV/H₂O₂: tratamento com ultravioleta e peróxido de hidrogênio
 ϕ : constante de solubilidade em água
 $\lambda_{m\acute{a}x}$: comprimento de onda máximo
YES: *Yeast Estrogen Screening*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Estrutura e propriedades físico-químicas dos 16 compostos estudados.	14
Tabela 2:	Concentrações dos contaminantes abordados neste trabalho determinados em mananciais de diferentes países.	20
Tabela 3:	Concentrações dos contaminantes abordados neste trabalho detectados em água tratada de diferentes países.	26
Tabela 4:	Descrição das etapas realizadas nas estações de tratamento de água no município de Campinas, SP.	46
Tabela 5:	Compostos investigados e dados sobre os padrões utilizados.	52
Tabela 6:	Locais de amostragem de água tratada no município de Campinas.	53
Tabela 7:	Resumo do ensaio de otimização do preparo de amostras.	61
Tabela 8:	Compostos empregados no preparo de 1 L do meio mínimo (YMM) e de 500 mL de solução de vitamina para o bioensaio BLYES.	68
Tabela 9:	Íons precursores, polaridade da fonte de ionização e valor do fragmentor para os 16 compostos investigados neste trabalho.	79
Tabela 10:	Faixa linear, limites de detecção e quantificação e linearidade para a curva das amostras branco fortificadas; LQ para a curva preparada com os padrões no solvente e coeficiente de correlação entre as duas curvas obtidos para a determinação dos 16 compostos por LC-MS/MS.	85
Tabela 11:	Porcentagem de recuperação média e estimativa do desvio padrão para as amostras fortificadas coletadas nas 13 campanhas amostrais (n = 13)	86
Tabela 12:	Concentração e estimativa do desvio padrão dos 7 contaminantes investigados determinados nos ensaios de perfil diuturno e semanal no rio Atibaia.	89
Tabela 13:	Porcentagem de recuperação e estimativa do desvio padrão dos 16 compostos em amostras fortificadas (10 ng L ⁻¹) extraídos com e sem a etapa prévia de filtração em membrana de acetato de celulose 0,45 µm. (n = 3)	93
Tabela 14:	Potência relativa dos compostos em termos de E2.	96

Tabela 15:	Atividade estrogênica dos padrões mistos em termos de $\text{ngE}_{2\text{equiv}} \text{L}^{-1}$ obtida pelo ensaio BLYES e a atividade estrogênica calculada com base nas concentrações dos compostos.	99
Tabela 16:	Atividade estrogênica dos padrões individuais e mistos extraídos por SPE de 1L de água ultrapura, atividade estrogênica esperada; concentração, estimativa do desvio padrão (s) e porcentagem de recuperação dos compostos.	99
Tabela 17:	Resposta obtida por BLYES para as amostras de águas superficiais analisadas neste trabalho (rio Atibaia e rio Capivari).	113
Tabela 18:	Resposta obtida por BLYES para as amostras de águas tratadas dos diferentes bairros de Campinas.	123
Tabela 19:	Concentração dos compostos detectados nas amostras de água bruta e tratada nas diferentes ETA de Campinas, resposta esperada e resposta observada obtida por BLYES.	125
Tabela 20:	Concentrações dos compostos detectados no rio Corumbataí e nas diferentes etapas do tratamento da ETA Capim Fino.	127
Tabela 21:	Resposta esperada e resposta observada obtida por BLYES para as amostras coletadas na ETA Capim Fino.	127
Tabela 22:	Resposta observada por BLYES e as concentrações para os 2 dos 16 compostos detectados nas amostras de água subterrânea.	131
Tabela A1:	Locais de amostragem de água tratada no município de Campinas.	139
Tabela A2:	Limites de detecção e quantificação dos 15 compostos para amostras de água tratada, e a porcentagem de recuperação para amostras fortificadas contendo de 1,0 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$.	142
Tabela A3:	Concentração dos 5 compostos determinados nas 6 amostras de água tratada da 1ª campanha amostral realizada em 2007 durante um período de estiagem.	143
Tabela A4:	Concentração dos 4 compostos determinados nas 10 amostras de água tratada da 2ª campanha amostral realizada em 2008 em um período de alta pluviosidade.	143
Tabela A5:	Limites de detecção e quantificação dos 15 compostos analisados, e concentração dos contaminantes nos rios Atibaia e Capivari durante o período de cheia.	145

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Excreção estimada de estrógenos naturais (E1 + E2 + E3) e EE2 do total de estrógenos excretados pela população holandesa.	6
Figura 2:	Metabolismo de transformação de EE2 no organismo e formas de excreção no ambiente.	6
Figura 3:	Origem e destino de estrogênios no ambiente.	16
Figura 4:	Estrogenicidade relativa de alguns interferentes endócrinos obtida por ensaios de proliferação com células MCF7 (E-screen).	35
Figura 5:	Número de habitantes na cidade de Campinas segundo os Censos realizados em 1970, 1980, 1991, 2000 e 2010.	42
Figura 6:	Resumo do sistema convencional de tratamento de água.	45
Figura 7:	Mapa do sistema produtor e distribuidor de água da Campinas.	47
Figura 8:	Mapa de Campinas indicando os Centros Reservatórios e de Distribuição e os locais de amostragem definidos para este trabalho.	54
Figura 9:	Imagem aérea do rio Atibaia ao lado da Rodovia D. Pedro, próximo à estação de captação de água do município de Campinas.	55
Figura 10:	Precipitação diária, temperaturas máximas e mínimas entre abril de 2010 e abril de 2011 e datas das campanhas amostrais.	56
Figura 11:	Sistema para extração em fase sólida.	62
Figura 12:	Fotografias do sistema de extração.	64
Figura 13:	Mapa da microplaca indicando a distribuição dos controles, amostras e padrão de E2 no ensaio BLYES.	69
Figura 14:	Fluxograma das etapas seguidas na tomada de decisão para determinar se compostos ou amostras ambientais são estrogênicos, tóxicos, estrogênicos e tóxicos, ou ainda, não estrogênicos e não tóxicos.	71
Figura 15:	Cromatogramas obtidos para o bisfenol A no modo SCAN empregando-se ionização por electrospray nos modos positivo e negativo.	75

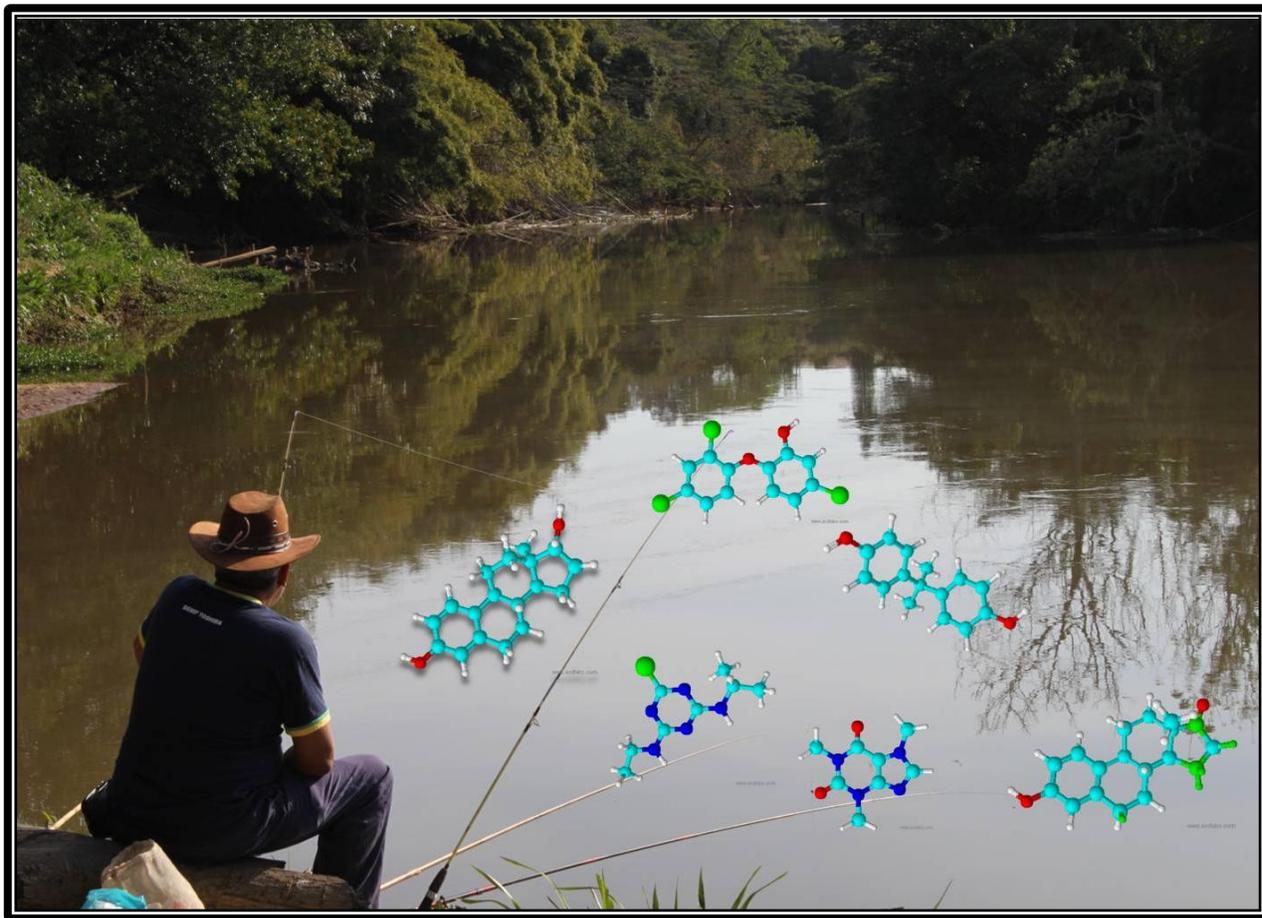
Figura 16:	Ilustração de um espectrômetro de massas com triplo quadrupolo e o desenvolvimento de um método no modo MRM.	77
Figura 17:	Espectros de massa obtidos para a estrona a partir da aplicação de diferentes energias de colisão sobre íon precursor.	78
Figura 18:	Cromatograma típico no modo TIC da determinação dos 16 compostos investigados em uma solução padrão em metanol (massa de 1000 pg na coluna), e os cromatogramas individuais obtidos por MRM para cada um dos compostos.	80
Figura 19:	Cromatogramas referente à determinação de triclosan por LC-ESI-MS/MS em padrões no solvente, padrões extraídos, amostra contendo TCS, amostra sem TCS.	83
Figura 20:	Cromatogramas referente à determinação de EE2 por LC-ESI-MS/MS em padrões no solvente, padrões extraídos, amostra fortificada, amostra sem EE2 e branco extraído.	83
Figura 21:	Concentrações dos sete compostos determinados pelos perfis diuturno e semanal realizados no rio Atibaia ao lado da estação de captação de água da SANASA em setembro de 2010.	90
Figura 22:	Concentrações de cafeína para a mesma amostra de água tratada determinadas com 3 diferentes alíquotas (1L, 2L e 4L). À esquerda, as amostras foram extraídas sem a etapa de filtração e; à direita, as amostras foram extraídas após a etapa de filtração em membrana (0,45 µm).	92
Figura 23:	Curva dose-resposta de 17β-estradiol (intensidade de bioluminescência versus concentração molar) disponibilizada pela CETESB, obtida para o ensaio BLYES (atividade estrogênica) e BLYR (toxicidade).	95
Figura 24:	Estrogenicidade relativa dos compostos abordados neste trabalho obtida por ensaio BLYES.	97
Figura 25:	Atividade estrogênica utilizando o ensaio BLYES em função das concentrações dos padrões extraídos para a curva analítica.	98
Figura 26:	Atividade estrogênica observada no ensaio BLYES para as amostras de água bruta de Campinas (rios Atibaia e Capivari).	100
Figura 27:	Atividade estrogênica das amostras de água tratada de Campinas, apresentada como resposta observada no bioensaio BLYES.	101

- Figura 28:** Correlação entre a resposta observada no bioensaio BLYES e a resposta esperada calculada com base nas análises químicas. 102
- Figura 29:** Concentração em escala logarítmica dos compostos determinados nos mananciais que abastecem a cidade de Campinas (rios Atibaia e Capivari) e a frequência de detecção dos compostos para as 39 amostras analisadas em 13 campanhas amostrais entre 2010 e 2011. 104
- Figura 30:** Concentrações de cafeína ao lado da estação de captação de água no rio Atibaia determinada nas 13 campanhas amostrais realizadas entre abril de 2010 e abril de 2011. 105
- Figura 31:** Concentrações de atrazina no rio Capivari entre 2010 e 2011. 108
- Figura 32:** Concentração em escala logarítmica dos contaminantes por classes, determinadas nos locais de captação de água da SANASA nos dois mananciais que abastecem Campinas, rio Atibaia (ATB) e rio Capivari (CAP). 109
- Figura 33:** Concentrações em escala logarítmica dos hormônios naturais, xenoestrogênios e cafeína determinadas em dois pontos no rio Atibaia, um à montante da captação e do aporte do ribeirão Pinheiros, usado no monitoramento da CETESB (ATB2065) e o outro ao lado da estação de captação de água da SANASA (ATB captação). 111
- Figura 34:** Estrogenicidade das amostras coletadas nos rios Atibaia e Capivari entre abril de 2010 e abril de 2011 nos três pontos amostrais deste trabalho. 112
- Figura 35:** Correlação entre a concentração de cafeína e a resposta observada no bioensaio BLYES para as amostras dos mananciais. 114
- Figura 36:** Concentração em escala logarítmica dos 6 compostos determinados na água tratada da cidade de Campinas (SP) e a frequência de detecção dos compostos para as 103 amostras analisadas em 13 campanhas amostrais entre 2010 e 2011. 116
- Figura 37:** Concentrações de bisfenol A e triclosan determinadas nos mananciais e na água tratada da cidade de Campinas. 118
- Figura 38:** Concentração de atrazina determinada nos mananciais e na água tratada da cidade de Campinas. 119

- Figura 39:** Concentrações de cafeína, determinadas nas 13 campanhas amostrais, no rio Atibaia e na água tratada coletada no Centro da cidade (P1) que recebe água proveniente das ETA 1 e 2. 121
- Figura 40:** Concentração de cafeína determinada nos mananciais e na água tratada da cidade de Campinas. 121
- Figura 41:** Concentrações de 5 contaminantes determinados na água tratada de Campinas (estrona, bisfenol A, triclosan, atrazina e cafeína) comparada com a de outros países de acordo com os dados reportados na Tabela 3. 122
- Figura 42:** Porcentagem de remoção de cafeína pelas diferentes estações de tratamento de água de Campinas. 126
- Figura 43:** Foto da ETA Capim Fino em Piracicaba, na primeira etapa do tratamento, onde a água bruta recebe cloro e o agente coagulante antes de chegar aos floculadores. 128
- Figura 44:** Concentrações dos seis contaminantes determinados em cada etapa do tratamento convencional da planta da ETA Capim Fino (SEMAE Piracicaba). 129
- Figura A1:** Esquema do método analítico empregado para determinação de contaminantes emergentes em amostras de água bruta e tratada usando SPE- HPLC-DAD-FL. 140
- Figura A2:** Cromatograma típico da separação dos quinze compostos analisados por HPLC-DAD. 141
- Figura A3:** Cromatograma típico da separação dos seis compostos analisados por HPLC-FL. 141

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

CONTAMINANTES EMERGENTES



Cassiana C.M. Raimundo

Rio Atibaia, junho 2011.

No Brasil, a fragilidade das políticas públicas e a precariedade dos serviços de saneamento, somadas ao crescimento populacional desordenado nas grandes cidades têm sido considerados os principais responsáveis pela diminuição da qualidade dos nossos recursos hídricos. Além disso, a escassez na alocação de recursos financeiros e a inexistência de um planejamento baseado em critérios toxicológicos e ambientais conduziram a um quadro onde o lançamento de esgoto doméstico não tratado, em conjunto com cargas industriais remanescentes, vem causando sérios impactos aos sistemas de águas superficiais.

A produção e o uso crescente de compostos químicos aliados à ineficiência dos sistemas de coleta e tratamento de esgoto e ao lançamento inadequado de efluentes industriais têm levado ao aparecimento dos chamados contaminantes emergentes no ambiente.

Os contaminantes emergentes são compostos que têm sido detectados nos diferentes compartimentos ambientais, tanto os de origem antrópica como aqueles de ocorrência natural, que podem apresentar algum risco ao ecossistema e que não estão incluídos nos programas de monitoramento de rotina, ou seja, ainda não são legislados. Estes são candidatos a uma futura regulamentação dependendo dos resultados obtidos em estudos de ecotoxicidade, efeitos à saúde humana e animal, potencial de bioacumulação, transporte e destino no ambiente, além da concentração e quantidade em que são lançados no meio (Petrovic *et al.*, 2006).

Mais especificamente, pode se considerar dois grandes grupos de substâncias, as novas, dentre as milhares que são produzidas anualmente e que estão entrando no mercado, sobre as quais se irão conhecer os destinos e os riscos ambientais e à saúde humana daqui a algumas décadas, e as substâncias não tão recentes, já amplamente consumidas e que, nos dias de hoje, têm preocupado pesquisadores do mundo todo quanto a sua presença no ambiente devido a suspeita de efeitos prejudiciais causados à saúde humana e a biota oriundos da exposição crônica.

Diversos grupos de substâncias têm sido considerados contaminantes emergentes, incluindo, novos agrotóxicos, drogas ilícitas, fármacos, produtos de higiene pessoal, protetores solares, estrogênios, alquilfenóis e seus derivados, alguns subprodutos provenientes de processos de desinfecção de água, retardantes de chama bromados, compostos perfluorados, siloxanos, benzotriazóis, ácidos naftênicos, percloratos, líquidos iônicos, dioxinas, o antimônio, dentre os adoçantes a sucralose, além dos nanomateriais e alguns microorganismos e toxinas de algas (Richardson e Ternes, 2011).

Dentre os contaminantes emergentes, alguns compostos são ainda classificados pelos seus potenciais ou capacidades de alterarem as funções do sistema endócrino e,

conseqüentemente, causar efeitos adversos em um organismo saudável ou em seus descendentes (IPCS, 2006). São os chamados interferentes endócrinos definidos pela Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) como “*um agente exógeno que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação dos hormônios naturais no corpo que são responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento*” (USEPA, 1997).

Os interferentes endócrinos podem pertencer a diferentes classes, incluindo os estrogênios naturais e sintéticos, os fitoestrogenios, os alquilfenóis, os retardantes de chama bromados, o bisfenol A, além de outras substâncias já bastante estudadas como os ésteres ftálicos usados como plastificantes, os agrotóxicos, alguns hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, as bifenilas policloradas, os ácidos naftênicos, algumas dioxinas e furanos (Richardson e Ternes, 2011; Liu *et al.*, 2010; Ghiselli e Jardim, 2007).

As diversas agências ambientais e organizações não-governamentais de todo o mundo classificam os interferentes endócrinos em três classes principais: os estrogênios naturais, os estrogênios sintéticos e os xenoestrogênios. Os estrogênios sintéticos apresentam maior capacidade de interferir no sistema endócrino humano em comparação aos demais tipos de estrogênios, enquanto que os xenoestrogênios são menos potentes, porém mais facilmente encontrados no ambiente.

Os estrogênios naturais fazem parte de um grupo de vários hormônios lipossolúveis produzidos principalmente nos ovários, mas também em quantidades consideráveis na placenta, e em menores quantidades nos testículos e no córtex adrenal. Outros tecidos, como o fígado ou o tecido adiposo, também podem produzir estrogênios (Rang *et al.*, 1997). O estradiol (E2), a estrona (E1) e o estriol (E3) são os três principais estrogênios endógenos. No fígado o estradiol é convertido em estrona, podendo este ser convertido em estriol. O estradiol é o estrogênio mais produzido pelo ovário e o mais potente. É doze vezes mais ativo que a estrona e oitenta vezes mais do que o estriol (Lark, 1999).

Os estrogênios naturais são conhecidos como hormônios femininos, pois determinam as características femininas e controlam os ciclos reprodutivos da mulher, além disso, influenciam no crescimento, desenvolvimento e comportamento, atuam nos sistemas imunológico e cardiovascular e exercem um papel importante no desenvolvimento da pele, ossos, fígado e cérebro (Ferreira e Rocha, 2004).

Outros dois hormônios menos abordados pela comunidade científica, mas importantes do ponto de vista ambiental que foram abordados neste trabalho são a progesterona (PROG) e a testosterona (TTN).

A progesterona é um esteróide feminino produzido pelo corpo lúteo a partir da puberdade e pela placenta durante a gravidez; é fundamental nos processos de menstruação, fecundação, transporte e implantação do óvulo fertilizado, manutenção da gravidez e lactação. A concentração em que é produzida pelo organismo varia com a idade e o período menstrual da mulher.

A testosterona é o hormônio esteróide masculino produzido pelos testículos e em pequena quantidade pelas glândulas supra-renais, tanto nos homens quanto nas mulheres que também a produzem em baixas concentrações nos ovários. No entanto, o organismo de um adulto do sexo masculino produz cerca de vinte a trinta vezes mais a quantidade de testosterona que o organismo de um adulto do sexo feminino. É, portanto, responsável pelo desenvolvimento e manutenção das características masculinas e funções sexuais normais do homem.

Os estrogênios sintéticos, encontrados em produtos farmacêuticos, são esteróides que tiveram suas estruturas moleculares alteradas. Os principais usos estão relacionados aos contraceptivos, terapias de reposição hormonal e tratamento de neoplasias. São compostos sintetizados para agirem diretamente no sistema endócrino, por isso possuem alto potencial estrogênico.

De acordo com dados obtidos pelos Censos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a taxa de fecundidade entre os brasileiros diminuiu consideravelmente após a implantação de uma política pública voltada a disseminação

de contraceptivos orais e ao incentivo de um planejamento familiar. A taxa de fecundidade total que era de 6,2 filhos por mulher em 1950 e, de 5,8 em 1970, diminuiu para 4,2 em 1980 quando os contraceptivos orais estavam se consolidando. Em 1990 essa taxa foi igual a 3, em 1996, igual a 2,5, em 2005, igual a 2,3 e em 2010 igual a 1,86 filho por mulher. O dado mais recente é semelhante ao de países desenvolvidos e abaixo do considerado ideal para a taxa de reposição populacional, que é de 2,1 filhos por mulher, ou seja, duas crianças substituem os pais e a fração 0,1 é necessária para compensar os indivíduos que morrem antes de atingir a idade reprodutiva.

Os principais estrogênios sintéticos abordados neste trabalho foram: 17 α -etinilestradiol (EE2) e mestranol (MEE) que são estrógenos derivados do E2, o levonorgestrel (NGT) que é derivado da progesterona, ambos utilizados como contraceptivos, e o dietilstilbestrol (DES). Este último foi usado durante anos em mulheres grávidas para evitar aborto, mas observaram-se sérios problemas de saúde durante a idade de puberdade nas filhas das mulheres que consumiram DES durante a gestação. Atualmente é usado apenas no tratamento do câncer de próstata e do câncer de mama em mulheres na idade da menopausa.

Estrogênios naturais e sintéticos são excretados, através da urina, como conjugados solúveis em água e, em menor proporção, por meio das fezes. Sob condições naturais, estes metabólitos podem ser rapidamente hidrolisados retornando a sua forma original. Vários organismos excretam quantidades diferentes de hormônios dependendo da idade, do estado de saúde, da dieta ou do estado de gestação (Johnson *et al.*, 2000).

Wise *et al.* (2011) descreveram sobre a contribuição dos contraceptivos orais na estrogenicidade da água tratada servida à população e apresentaram alguns dados sobre a contribuição estimada de estrógenos excretados pela população holandesa (Figura 1). A porcentagem de excreção atribuída aos contraceptivos foi de apenas 1 % do total. Os resultados mostraram que mulheres grávidas excretam quantidades maiores de estrógenos (44 %), seguido pelas mulheres não grávidas (36 %) e os homens (12 %). Crianças, jovens e idosos contribuem muito pouco com a excreção de E1, E2 e E3.

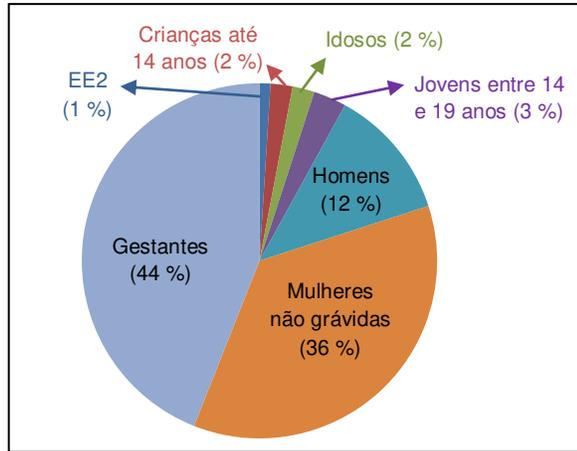


Figura 1: Excreção estimada de estrógenos naturais (E1 + E2 + E3) e EE2 do total de estrógenos excretados pela população holandesa (adaptado de Wise *et al.*, 2011).

O EE2 é o contraceptivo mais administrado no mundo e há grande preocupação com a presença dele no ambiente, a qual esta relacionada com o aporte de esgoto bruto, de efluentes industriais e descarte inadequado de medicamentos. Eventos de feminização de peixes foram atribuídos à exposição crônica desses animais à efluente de estações de tratamento de esgoto contendo EE2. As pílulas comercializadas atualmente contêm entre 20 e 50 µg de EE2, que são ingeridos em doses diárias. Destas, entre 20 e 48 % são metabolizadas no organismo e o restante é eliminado na sua forma original ou em conjugados sulfatos ou glucoronídeos. A forma de conjugado EE2-sulfato não é ativa, porém conjugados glucoronídeos geralmente voltam à forma livre em ambientes naturais (Figura 2).

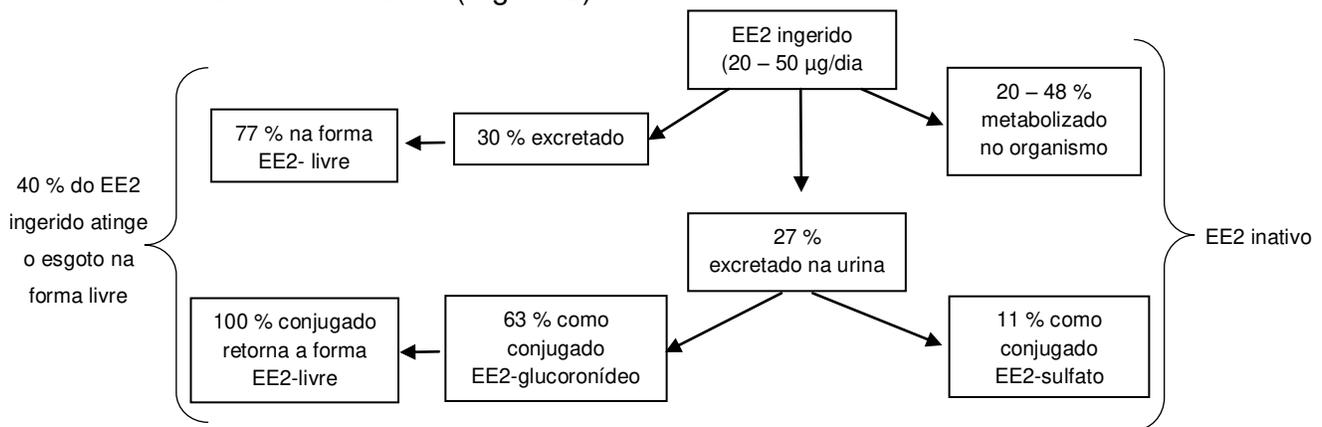


Figura 2: Metabolismo de transformação de EE2 no organismo e formas de excreção no ambiente (adaptado de Wise *et al.*, 2011).

O termo “xenoestrogênios” é aplicado livremente a uma série de substâncias químicas produzidas pelo homem que confundem os receptores celulares dos estrogênios no organismo, interferindo nas mensagens bioquímicas naturais. Podem ou não ser compostos do tipo esteroidais, tendo a habilidade de mimetizar ou bloquear a atividade dos hormônios endógenos, bem como alterar a forma como os hormônios e seus receptores protéicos atuam, são produzidos e/ou metabolizados (Ghiselli e Jardim, 2007). Substâncias orgânicas tais como o bisfenol A (BPA), os alquilfenóis, o triclosan (TCS), a atrazina (ATZ) e a fenoftaleína (Phph) foram os xenoestrogênios abordados neste trabalho.

O bisfenol A (BPA) é um monômero usado como intermediário na produção de policarbonatos plásticos e resinas epóxi. As propriedades específicas dos policarbonatos de plástico como leveza, transparência e alta resistência e das resinas epóxi como durabilidade, resistência química e boa aderência, atribuídas pelo uso de BPA como aditivo proporcionaram a sua utilização em uma variedade de produtos de uso doméstico e industrial (Klecka *et al.*, 2009). Além disso, o BPA também é empregado como revestimento em embalagens plásticas ou metálicas de produtos alimentícios formando uma barreira protetora entre o material e o produto, proporcionando uma melhora na conservação de bebidas e alimentos. No entanto, pode migrar da embalagem contaminando o alimento (Schechter *et al.*, 2010; Vandenberg *et al.*, 2007).

O lançamento de bisfenol A no ambiente se deve principalmente ao aporte direto de efluentes. Pequenas quantidades lançadas são oriundas de efluentes de estações de tratamento de águas residuárias que são capazes de remover entre 90 e 98 % de BPA (Nakada *et al.*, 2006; Drewes *et al.*, 2005). O compartimento aquático tem sido identificado como o principal compartimento em que o BPA pode ser encontrado. O log do coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{ow}$) é 3,32, porém, uma fração apreciável de bisfenol A permanece na fase dissolvida (Klecka *et al.*, 2009).

Os surfactantes são uma classe de compostos químicos sintetizados para ter propriedades de limpeza ou solubilização. São moléculas que consistem de um grupo polar, que pode ser carregado (aniônicos ou catiônicos) ou sem cargas (não-iônicos)

como os alquilfenóis, os quais são bastante solúveis em água, e um grupo apolar composto por uma cauda de hidrocarbonetos insolúveis, o que confere à molécula propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas. São compostos amplamente utilizados em detergentes de limpeza doméstica, produtos de higiene pessoal, têxteis, tintas, polímeros, agrotóxicos, produtos farmacêuticos, indústrias de mineração, de recuperação de petróleo, celulose e papel. Os alquilfenóis são reconhecidamente considerados interferentes endócrinos e, diversos estudos têm relatado a presença e o destino deles no ambiente (Loos *et al.*, 2010; Benotti *et al.*, 2009; Musolff *et al.*, 2009; Jonkers *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2009; Baugros *et al.*, 2008; Stackelberg *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2006). Neste trabalho foram investigados o 4-n-octilfenol (4n-OP) e o 4-n-nonilfenol (4n-NP).

O triclosan (TCS) é um composto orgânico clorado que tem sido amplamente utilizado como um agente antimicrobiano, pois apresenta um amplo espectro de atividade bacteriostática contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, fungos e leveduras, mesmo em níveis de 0,1 - 0,3 % (m/m) (Levy *et al.*, 1999). Tem sido amplamente utilizado por cerca de 30 anos em uma variedade de produtos de higiene pessoal como xampu, sabonete, creme dental, cosméticos; em produtos de limpeza doméstica, em têxteis e plásticos, tais como roupas esportivas, calçados, tapetes e utensílios culinários devido as suas propriedades desinfetantes.

O triclosan é um contaminante estável e relativamente solúvel em água, porém uma das grandes preocupações relacionadas com a presença deste contaminante nos corpos d'água está na sua capacidade de absorver radiação solar, sofrer fotodegradação e gerar subprodutos clorados e dioxinas. Além disso, nas estações de tratamento de água e esgoto, o uso de cloro livre como agente desinfetante pode desencadear a degradação do triclosan e formação de vários derivados de dioxinas. Alguns pesquisadores relataram que a formação de subprodutos é uma reação rápida que pode ocorrer mesmo com o cloro residual que permanece nas tubulações de água. As dioxinas são comprovadamente interferentes endócrinos e a sua toxicidade aumenta com o aumento número de cloros substituídos (Buth *et al.*, 2009; Aranami e Readmen, 2007; Latch *et al.*, 2005; Mezcua *et al.*, 2004; McAvoy *et al.*, 2002; Tixier *et al.*, 2002).

A fenolftaleína (Phph) é conhecidamente um indicador de pH que se apresenta como um sólido em pó branco. É solúvel em água e em etanol. Devido a sua estabilidade, foi usada neste trabalho primeiramente como padrão interno. No entanto, foi detectada em amostras de água superficiais e a partir de então, passou a ser monitorada durante todo o estudo (ISCID, 2011). A fenolftaleína é também utilizada como laxante, porém no Brasil, o seu uso foi proibido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária por suspeita de ser cancerígeno. Os medicamentos que a continham como laxante eram o Lacto-Purga e o Almeida Prado nº 46 (dito homeopático) que, agora, não mais a contém (ANVISA, 2002). Não há relatos da presença deste composto no ambiente e, este pode estar relacionado ao descarte de efluentes industriais não tratados nos rios.

A atrazina é um dos herbicidas mais consumidos no Brasil (IBAMA, 2010). Usada no combate a plantas infestantes que competem por água e nutrientes com a planta cultivada é aplicada em inúmeras culturas, inclusive a da cana-de-açúcar, além de rodovias e linha férreas. Vários processos físicos, químicos e biológicos determinam o comportamento de um agrotóxico após sua aplicação. Processos de retenção, transformação e transporte ditam o destino deles no ambiente. Nos corpos d'água, os agrotóxicos podem sofrer hidrólise, fotólise, degradação biológica, bioacumulação ou biomagnificação. A atrazina é lentamente degradada por processos químicos ou biológicos, sendo bastante persistente nos corpos d'água. A presença deste contaminante em águas superficiais está diretamente relacionada à lixiviação de terras agrícolas e, portanto, pode ser sazonal. Em locais onde há escoamento direto, concentrações mais elevadas são encontradas até dois meses após a aplicação, porém concentrações baixas podem ser detectadas durante todo o ano, pois a atrazina apresenta tempo de meia-vida de aproximadamente seis meses.

A principal via de exposição humana a atrazina é a ingestão de água tratada, uma vez que a exposição por alimentos não é significativa (ATSDR, 2008), e as estações de tratamento de água não são capazes de remover este contaminante com eficiência (Benotti *et al.*, 2009; Verliefde *et al.*, 2007; Quintana *et al.*, 2001). Considerada um interferente endócrino muito ativo, mesmo em baixas concentrações (Mnif *et al.*, 2011),

a atrazina foi responsável pela feminização de anfíbios e completa castração de rãs africanas (*Xenopus laevis*) expostas em concentrações de $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ durante todo o período larval e 3 anos após a metamorfose (Hayes *et al.*, 2010).

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina), pertence ao grupo de compostos químicos chamados metilxantinas, presentes em cerca de 60 espécies de plantas no mundo. Produtos alimentícios como café, chás, cola e chocolate contém aproximadamente 100, 50, 40 e 10 mg de cafeína por porção, respectivamente (Buerge *et al.*, 2003). Também é encontrada no guaraná, no tabaco, em alguns condimentos além de medicamentos do tipo analgésico, antigripais e inibidores de apetite. As xantinas são substâncias capazes de estimular o sistema nervoso, produzindo um estado de alerta de curta duração (Gardinali e Zhao, 2002).

A absorção da cafeína no organismo é muito rápida, assim como a distribuição, passando rapidamente para o sistema nervoso central. Toda a ação da cafeína no corpo depende da forma de preparo do produto, da quantidade utilizada e das condições do organismo que a consome, podendo o efeito variar de indivíduo para indivíduo. O corpo humano não necessita de cafeína, embora o seu consumo moderado não esteja associado a nenhum risco à saúde, exceto em algumas situações especiais, como a gestação e a hipertensão, por exemplo. Trata-se de um dos produtos mais consumidos no mundo e, a presença deste composto nos corpos d'água é, sobretudo de origem antrópica. Estudos têm mostrado que entre 3 e 10 % da cafeína ingerida não é absorvida pelo organismo e é excretada na urina (Gardinali e Zhao, 2002).

Em países onde há tratamento de esgoto adequado, a cafeína tem sido usada como traçador de contaminação por esgoto doméstico em situações onde há vazamentos na rede coletora capazes de atingir outros cursos d'água. É considerado um marcador químico sensível e específico que pode ser detectado rapidamente, pois se apresenta em altas concentrações no esgoto, é estável e bastante solúvel em água, principais motivos pelos quais a cafeína tem substituído outros marcadores biológicos como o *E. Coli*, por exemplo (Froehner *et al.*, 2010; Young *et al.*, 2008; Gonçalves,

2008; Ferreira, 2005; Glassmeyer *et al.*, 2005; Buerge *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2002; Gardinali e Zhao, 2002; Píocos e de la Cruz, 2000).

No Brasil, a presença de cafeína em águas naturais é notoriamente esperada tendo em vista a situação de saneamento básico precária, principalmente das grandes cidades que tiveram um rápido crescimento populacional e não apresentaram um sistema de esgotamento sanitário adequado para receber e tratar grandes volumes de esgoto que, portanto, são lançados nos corpos d'água. O Censo 2010 do IBGE indicou que apenas 32,9 % da população brasileira possuem rede coletora de esgoto, e apenas parte deste esgoto coletado recebe algum tipo de tratamento antes de serem lançados nos corpos d'água.

Embora a cafeína não seja considerada uma substância suspeita de causar alteração no sistema endócrino, e não se conheça efeitos causados à biota oriundos da exposição a este contaminante, neste trabalho a determinação de cafeína foi usada como indicador da qualidade do manancial relacionado ao aporte de esgoto doméstico.

DESTINO NO AMBIENTE

Os destinos dos contaminantes emergentes no ambiente estão relacionados às propriedades físico-químicas como lipofilicidade e acidez de cada composto. A Tabela 1 apresenta os 16 contaminantes estudados neste trabalho e algumas de suas propriedades físico-químicas.

O coeficiente de partição octanol-água é usado para determinar a sorção efetiva e a afinidade das substâncias pela matéria orgânica. São verificados dois mecanismos de sorção: a absorção que trata de interações hidrofóbicas caracterizadas pelo valor de $\log K_{ow}$; e a adsorção que está relacionada com interações eletrostática e a tendência da substância de se ionizar ou dissociar no meio aquoso, a qual é caracterizada pela sua constante de dissociação ácida, pK_a . De acordo com essas propriedades, os contaminantes podem ser divididos em três grandes grupos: os lipofílicos, com alto valor de $\log K_{ow}$; os neutros ou não-iônicos; e os compostos ácidos, que apresentam hidrofílicidade e são iônicos.

Os hormônios naturais e sintéticos, bem como os xenoestrogênios apresentam natureza lipofílica. A cafeína é um composto básico com $pK_a > 10$ e $\log K_{ow}$ menor que 0,1, que apresenta alta solubilidade em água. As condições do meio tais como, temperatura, pH, salinidade, existência de substâncias húmicas ou material particulado, influenciam significativamente na solubilidade e no destino desses compostos, facilitando ou dificultando sua degradação no meio natural.

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

Lai *et al.* (2000) investigaram a adsorção de estrógenos em sedimentos e relataram que os estrogênios sintéticos, com valores elevados $\log K_{ow}$, foram removidos

mais facilmente da fase água quando comparados aos estrogênios naturais, além disso, a sorção dos estrogênios para sedimentos foi diretamente relacionada com os teores de carbono orgânico total do meio.

Fick *et al.* (2010) quantificaram concentrações de levonorgestrel entre 8,5 e 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ no plasma sanguíneo de peixes expostos à efluentes de ETE na Suécia. Essas concentrações excedem a dose terapêutica humana, e evidencia a tendência de bioacumulação desses contaminantes devido as suas características de lipofilicidade.

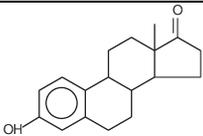
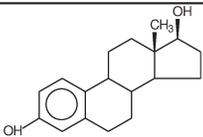
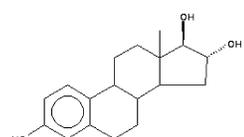
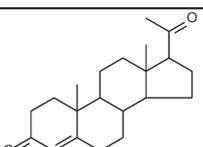
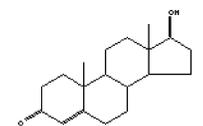
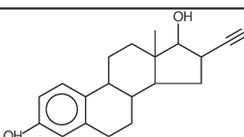
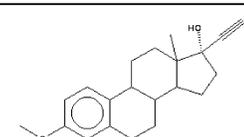
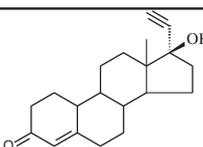
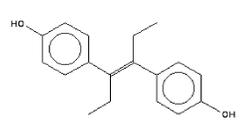
Os alquilfenóis são compostos que possuem baixa solubilidade em água, baixa pressão de vapor ($2,9 \times 10^{-6}$ atm a 25 °C para o 4n-NP) e $\log K_{ow} \sim 4$, portanto estão presentes em todas as matrizes, mas muito pouco no ar (Muller e Schlatter, 1998).

Em Taiwan, foram determinados alquilfenóis em concentrações entre 61 e 370 ng L^{-1} em matrizes aquáticas, 27 e 190 ng g^{-1} em sedimentos e 20 e 5190 ng g^{-1} na biota. As concentrações variaram significativamente com a sazonalidade sendo os maiores valores obtidos no inverno (Chen *et al.*, 2006).

Os alquilfenóis são facilmente biodegradados em estações de tratamento de esgoto e metabólitos tóxicos como o p-octilfenol e p-nonilfenol etoxilados são formados, os quais apresentam potencial estrogênico. O produto da degradação tem a hidrofobicidade aumentada comparada aos precursores, onde valores de $\log K_{ow}$ entre 3,9 e 6,0 são encontrados. Devido a esse aumento no coeficiente de partição octanol-água os metabólitos apresentam uma tendência à bioacumulação nos organismos. Algas, peixes, patos, mexilhão e caranguejo, todos bioacumulam nonilfenol e derivados (Lintelmamm *et al.*, 2003).

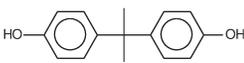
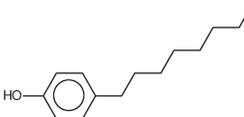
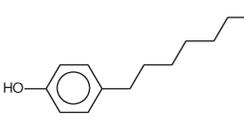
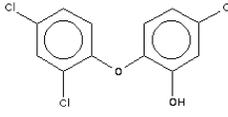
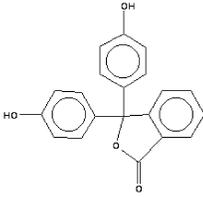
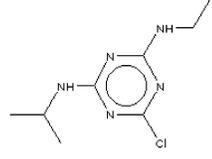
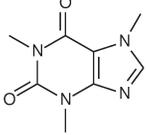
Em geral compostos com alta massa molecular e alto $\log K_{ow}$ (> 5) são facilmente adsorvidos aos sedimentos e podem ser removidos por processos de coagulação. Por outro lado, os compostos com baixo valor de $\log K_{ow}$ ($< 2,5$) têm baixa tendência a se adsorverem e, portanto, ficam mais disponíveis nos corpos d'água (Pal *et al.*, 2010).

Tabela 1: Estrutura e propriedades físico-químicas dos 16 compostos estudados.

Compostos	Estrutura	Fórmula	M (g mol ⁻¹)	pK _a	Log K _{ow}	φ _{sat} à 25° C (mg L ⁻¹)	Uso
Hormônios naturais							
Estrona (E1)		C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270,4	10,3	3,13	13	Hormônio esteróide feminino
17β-Estradiol (E2)		C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272,4	10,4 - 10,7	3,1 - 4,01	13	Hormônio esteróide feminino
Estriol (E3)		C ₁₈ H ₂₄ O ₃	288,4	10,4	2,45 - 2,6	13 - 32	Hormônio esteróide feminino
Progesterona (PROG)		C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314,5	-	3,87	5,6 - 8,8	Hormônio esteróide feminino
Testosterona (TTN)		C ₁₉ H ₂₆ O ₂	288,4	17,4	3,32	-	Hormônio esteróide masculino
Hormônios sintéticos							
17α-etinilestradiol (EE2)		C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296,4	10,5	2,9 - 3,67	4,8	Estrogênio sintético
Mestranol (MEE)		C ₂₁ H ₂₆ O ₂	310,4	-	4,1 - 4,8	0,3	Estrogênio sintético
Levonorgestrel (NGT)		C ₂₁ H ₂₈ O ₂	312,5	-	-	2,1	Estrogênio sintético
Dietilstilbestrol (DEE)		C ₁₈ H ₂₀ O ₂	268,4	9,73	5,07	12	Estrogênio sintético

continua

continuação

Compostos	Estrutura	Fórmula	M (g mol ⁻¹)	pK _a	Log K _{ow}	φ _{sat} à 25°C (mg L ⁻¹)	Uso
Xenoestrogênios							
Bisfenol A (BPA)		C ₁₅ H ₁₆ O ₂	228,3	9,6 - 11,3	3,32	120 - 300	plastificante
4-n-Octilfenol (4n-OP)		C ₁₄ H ₂₂ O	206,3	10,38	4,02 - 4,22	12,6	surfactante
4-n-Nonilfenol (4n-NP)		C ₁₅ H ₂₄ O	220,4	10,25	4,48	4,9 - 7,0	surfactante
Triclosan (TCS)		C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂	289,5	7,8	4,76	10	agente antimicrobiano
Fenofaleína (Phph)		C ₂₀ H ₁₄ O ₄	318,3	9,4	-	-	Indicador de pH
Atrazina (ATZ)		C ₈ H ₁₄ ClN ₅	215,1	4,14 - 10,7	2,61	33	herbicida
Cafeína (CAF)		C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194,2	10,1	0,01	21.700	estimulante

Fontes: NIST National Institute of Standards and Technology; Munif *et al.*, 2011; Montagner e Jardim, 2011; Zhao *et al.*, 2010; Rodil *et al.*, 2009; Baugros *et al.*, 2008; Verliefde *et al.*, 2007; Stackelberg *et al.*, 2007; Bodzek e Dudziak, 2006; Campbell *et al.*, 2006; Westerhoff *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2000.

Inúmeras atividades contribuem para o aporte de substâncias químicas no ambiente. Entretanto, o descarte de esgoto bruto e de efluentes de estações de tratamento de esgotos vem sendo consideradas as principais vias de aporte dos contaminantes emergentes para sistemas aquáticos. Na Figura 3 estão mostradas as vias de transporte desses compostos no ambiente tendo os estrogênicos como exemplo.

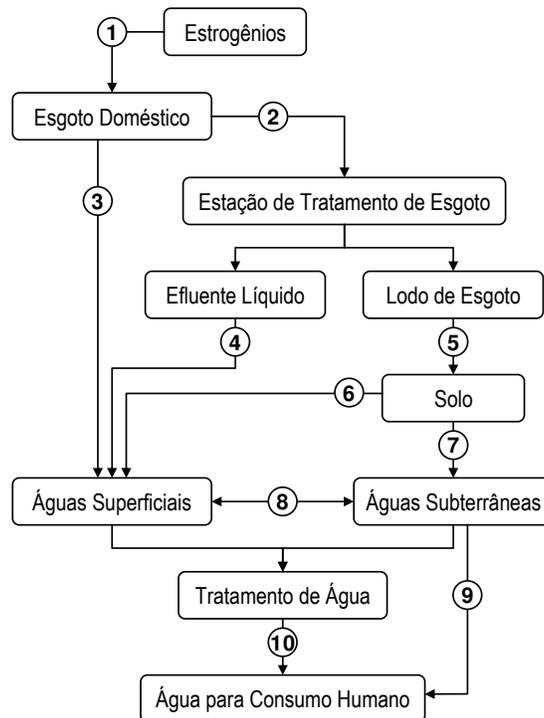


Figura 3: Origem e destino de estrogênios no ambiente. Adaptado de Lintelmann *et al.* (2003) e Campell *et al.* (2006).

A rota ① representa o enriquecimento do esgoto bruto com estrogênios a partir da excreção fecal e/ou urinária por seres vivos, além da contribuição do descarte de fármacos nos sistemas de captação de esgotos. Os serviços de esgotamento sanitário são representados pelas rotas ② e ③, sendo que a primeira corresponde à canalização do esgoto até as estações de tratamento de esgoto (ETE), e a segunda, ao serviço de afastamento do esgoto bruto da população. O descarte clandestino do esgoto também é contemplado na rota ③.

Na maioria das estações de tratamento convencionais, os principais mecanismos de remoção de compostos orgânicos envolvem (i) remoção de sólidos grosseiros, (ii) adsorção em sólidos suspensos, sedimentação ou coagulação, (iii) a biodegradação

aeróbica (lodo ativado ou filtro biológico) ou anaeróbica (UASB), (iv) a degradação química por processos de hidrólise ou nitrificação e (v) a desinfecção. Entretanto, muitos compostos orgânicos apresentam características físico-químicas que favorecem a sua permanência no efluente final, sem que haja remoção significativa dos compostos. As ETE mais modernas são eficientes para a descontaminação microbiológica e remoção de quantidades elevadas de nutrientes, os maiores responsáveis pelos processos de eutrofização de um corpo d'água.

A quantidade dos compostos interferentes endócrinos no ambiente está diretamente relacionada com a eficiência dos processos de tratamento de efluentes e esgotos, pelo menos em países onde as questões envolvendo a coleta e o tratamento de esgotos já foram equacionadas (Fogazio *et al.*, 2008; Kuster *et al.*, 2008; Baugros *et al.*, 2008; Nakada *et al.*, 2006; Drewes *et al.*, 2005; Rodgers-Gray *et al.*, 2000). A remoção destes compostos do esgoto bruto depende tanto dos processos empregados nas estações de tratamento, quanto das características inerentes a cada composto.

O nonilfenol, por exemplo, possui propriedades hidrofóbicas e é frequentemente detectado em lodo de esgoto, sedimentos de rios e biota. Em uma ETE é parcialmente degradado e derivados etoxilados tóxicos e persistentes são formados. No entanto, os alquilfenóis são facilmente degradados do lodo de esgoto por tratamentos aeróbicos, enquanto que tratamentos abióticos e anaeróbicos não os removem com eficiência (Hernandez-Raquet *et al.*, 2007).

Nakada *et al.* (2006) avaliaram a remoção de fármacos e interferentes endócrinos em cinco plantas de tratamento de esgoto do Japão durante aproximadamente um ano. Todas as ETE empregavam tratamento primário e secundário com lodo ativado. No entanto, a eficiência de remoção variou significativamente para cada composto. Para o 4n-NP foi cerca de 70 %, para o 4n-OP variou entre 30 e 60 %, para o TCS, determinado em maiores concentrações, variou entre 50 e 90 %, para o BPA, foi de 90 % e para os estrogênios, E1, E2 e E3 variou entre 80 e 99 %. Suzuki e Maruyama (2006) também verificaram que E1 e E2 foram facilmente removidos da fase líquida quando em contato com sistemas de lodo ativado.

A natureza hidrofóbica de alguns contaminantes favorece a ocorrência de reações de adsorção destes compostos no material particulado em suspensão. Assim, em estações de tratamento de água ou esgoto, por exemplo, é esperado que técnicas de separação mecânica, como a sedimentação, promovam uma remoção significativa de vários compostos orgânicos, além do enriquecimento do lodo de esgoto com estas substâncias. Porém, muitos contaminantes emergentes ainda estão presentes nos efluentes finais que são lançados nos corpos d'água devido a sistemas de tratamento inadequados. Consequentemente, alguns deles acabam sendo encontrados na água tratada distribuída a população a qual é oriunda de mananciais já comprometidos.

Diante desta preocupação, diversos trabalhos avaliam tratamentos complementares para minimizar o descarte de compostos interferentes endócrinos nos corpos d'água. Os processos oxidativos avançados como ozonização, microfiltração, osmose reversa, fotocatalise homogênea e heterogênea, oxidação eletroquímica e o uso do reagente de Fenton têm se mostrado eficientes na remoção desses contaminantes (Pereira *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2011; Miranda-Garcia *et al.*, 2011; Sui *et al.*, 2010; Klammer *et al.*, 2010; Baig *et al.*, 2008; Esplugas *et al.*, 2007).

Na China, diferentes processos de tratamento foram avaliados na remoção de contaminantes emergentes, principalmente fármacos e cafeína. O tratamento primário não foi capaz de remover os compostos. Os diferentes tratamentos secundários apresentaram eficiência de remoção que variaram entre 12 e 99 %, e as maiores contribuições foram atribuídas a ozonização e a osmose reversa implantadas como tratamentos terciários nas ETE (Sui *et al.*, 2010).

No Brasil pouco se conhece sobre a eficiência das nossas ETE. Em 1997, Ternes *et al.* (1999) avaliaram a eficiência de remoção de três estrógenos (E1, E2 e EE2) na ETE do município de Penha, no Estado do Rio de Janeiro. O tratamento empregado foi uma clarificação preliminar, seguida por um tanque aerador ou filtro biológico e uma clarificação final. No esgoto bruto os estrógenos foram detectados com concentração média de 30 ng L⁻¹. A eficiência de remoção desses compostos variou entre 64 e 99 % e o melhor tratamento foi atribuído ao sistema de lodo ativado.

O destino e os efeitos de contaminantes emergentes em águas brasileiras ainda tem sido pouco discutido na literatura. Entretanto, tem-se que a principal via de aporte deles em águas superficiais não está relacionada à contribuição dos efluentes de ETE, mas sim ao aporte de esgoto bruto, representado pela rota ③, uma vez que aproximadamente 67 % dos domicílios brasileiros não possuem rede coletora de esgoto e, apenas de 33 % dos municípios tem acesso a esgoto tratado. Muitos municípios, apesar de coletar, descartam o esgoto bruto diretamente nos rios, mesmo aqueles que são utilizados como fonte de água para abastecimento público da região (IBGE, 2010).

Nas ETE, portanto, são as características físico-químicas dos compostos que determinam a partição deles entre as fases líquida e sólida. O efluente líquido é descartado em sistemas de águas naturais (rota ④) enquanto que o material sólido pode ser utilizado para fertilização e/ou condicionamento de solos agricultáveis (rota ⑤). Estrogênios presentes no lodo de esgoto aplicado ao solo podem surgir em águas naturais por meio do escoamento superficial (rota ⑥) ou da lixiviação (rota ⑦). A lixiviação de solos agrícolas também é a principal fonte de contaminação de águas superficiais por agrotóxicos.

A preocupação com relação à presença dos contaminantes emergentes em águas brasileiras surge em função de dois aspectos distintos: (i) a exposição da biota e dos seres humanos frente a esses compostos, seja via recreacional ou por meio da ingestão e/ou absorção dérmica e (ii) a possibilidade de contaminação de mananciais de água bruta possibilitando, conseqüentemente, a transferência destas substâncias para as estações de tratamento de água (ETA) e para a água destinada ao consumo humano. A Tabela 2 resume as concentrações dos contaminantes estudados neste trabalho determinadas em mananciais de diversos países e do Brasil, e revela um cenário nacional preocupante em vistas a alguns destes compostos.

Tabela 2: Concentrações (ng L⁻¹) dos contaminantes abordados neste trabalho determinados em mananciais de diferentes países.

Compostos	Concentração média (ng L⁻¹)	Concentração máxima ou faixa de concentração (ng L⁻¹)*	País (Cidade)	Referência
estrona	0,3 0,4	2	Itália	(Loos <i>et al.</i> , 2010)
		(0,2 – 2)	Itália	(Loos <i>et al.</i> , 2007)
		3,4	Holanda	(Verliefde <i>et al.</i> , 2007)
		21,7	Bélgica	(Verliefde <i>et al.</i> , 2007)
		0,9	EUA	(Benotti <i>et al.</i> , 2009)
		2,0	EUA	(Snyder, 2008)
		600	Brasil (Jaboticabal)	(Lopes <i>et al.</i> , 2010)
		(0,7 – 75)	China	(Zhao <i>et al.</i> , 2009)
17β-estradiol	17	0,9	Itália	(Loos <i>et al.</i> , 2007)
		1	Holanda	(Verliefde <i>et al.</i> , 2007)
		2,3	Bélgica	(Verliefde <i>et al.</i> , 2007)
		17	EUA	(Benotti <i>et al.</i> , 2009)
		(106 – 6.806)	Brasil (Campinas)	(Montagner e Jardim, 2011)
		(8,6 – 25,8)	Brasil (Jaboticabal)	(Lopes <i>et al.</i> , 2010)
		(1,5 – 36,8)	Brasil (Belo Horizonte)	(Moreira <i>et al.</i> , 2009)
		(< 1 – 7,5)	China	(Zhao <i>et al.</i> , 2009)
testosterona	1,1	1,2	EUA	(Benotti <i>et al.</i> , 2009)
progesterona	2,2	3,1	EUA	(Benotti <i>et al.</i> , 2009)
		195	Brasil (Campinas)	(Montagner e Jardim, 2011)
17α-etinilestradiol	1,4	0,4	Holanda	(Verliefde <i>et al.</i> , 2007)
		1,4	EUA	(Benotti <i>et al.</i> , 2009)
		(3 – 54)	Brasil (Belo Horizonte)	(Moreira <i>et al.</i> , 2009)
levonorgestrel		663	Brasil (Campinas)	(Montagner e Jardim, 2011)
bisfenol A	5	68	Itália	(Loos <i>et al.</i> , 2010)
		(0,9 – 61)	Itália	(Loos <i>et al.</i> , 2007)
		(106 – 880)	Portugal	(Ribeiro <i>et al.</i> , 2009)
	9,4	(2 – 46)	Suíça	(Jonkers <i>et al.</i> , 2009)
		(136 – 156)	França	(Baugros <i>et al.</i> , 2008)
	5319	Alemanha	(Musolff <i>et al.</i> , 2009)	
	57	1.924	Alemanha	(Quednow e Puttmann, 2008)
		580	Bélgica	(Verliefde <i>et al.</i> , 2007)
	6,1	22.000	Holanda	(Verliefde <i>et al.</i> , 2007)
		14	EUA	(Benotti <i>et al.</i> , 2009)
		360	EUA	(Stackelberg <i>et al.</i> , 2007)
	1.000	1.900	EUA	(Fogazio <i>et al.</i> , 2008)
		87	Canadá	(Kleywegt <i>et al.</i> , 2011)
	2,1	(0,6 – 18,8)	Canadá	(Chen <i>et al.</i> , 2006 b)
		(204 – 13.016)	Brasil (Campinas)	(Montagner e Jardim, 2011)
(2,2 – 1.030)		China	(Zhao <i>et al.</i> , 2009)	

continua

continuação

Compostos	Concentração média (ng L⁻¹)	Concentração máxima ou faixa de concentração (ng L⁻¹)*	País (Cidade)	Referência
octilfenol	2,4	(< 1,2 – 6,9) (1 – 2.470)	Suíça	(Jonkers <i>et al.</i> , 2009)
			China	(Zhao <i>et al.</i> , 2009)
nonilfenol	64 387 100 89	240 (< 29 – 195) 1.500 130 141 1.400 (37 – 313) (44 – 1.918)	Itália	(Loos <i>et al.</i> , 2010)
			Suíça	(Jonkers <i>et al.</i> , 2009)
			Alemanha	(Musolff <i>et al.</i> , 2009)
			Espanha	(Petrovic <i>et al.</i> , 2003)
			EUA	(Benotti <i>et al.</i> , 2009)
			EUA	(Snyder, 2008)
			EUA	(Stackelberg <i>et al.</i> , 2007)
			Canadá Brasil (Belo Horizonte)	(Chen <i>et al.</i> , 2006 b) (Moreira <i>et al.</i> , 2009)
triclosan	3,0 3 734	15 8,8 6,4 (2,1 – 9,8) (0,6 – 347)	Itália	(Loos <i>et al.</i> , 2007)
			EUA	(Snyder, 2008)
			EUA	(Benotti <i>et al.</i> , 2009)
			EUA	(Wang <i>et al.</i> , 2011)
			EUA	(Loraine e Pettigrove, 2006)
			China	(Zhao <i>et al.</i> , 2009)
atrazina	2 32 44	4 (0,3 – 3,2) 400 (13.000) (2 – 48) (25 – 29) 870 1.011	Itália	(Loos <i>et al.</i> , 2010)
			Itália	(Loos <i>et al.</i> , 2007)
			Holanda	(Verliefde <i>et al.</i> , 2007)
			Bélgica	(Verliefde <i>et al.</i> , 2007)
			Canadá	(Garcia-Ac <i>et al.</i> , 2009)
			Espanha	(Quintana <i>et al.</i> , 2001)
			EUA	(Benotti <i>et al.</i> , 2009)
			EUA	(Snyder, 2008)
cafeína	137 143 1.926 14 30	1.467 (0,6 – 1.056) (13 – 107) (12,2 – 415) 2.991 (1,6 – 224,8) 270 (18 – 176) 190 (8,4 – 160) (174 – 127.092) (1.410 – 753.500) (160 – 47.500)	Itália	(Loos <i>et al.</i> , 2010)
			Itália	(Loos <i>et al.</i> , 2007)
			Alemanha	(Musolff <i>et al.</i> , 2009)
			França	(Togola e Budzinski, 2008)
			Espanha	(Fernández <i>et al.</i> , 2010)
			Espanha	(Huerta-Fontela <i>et al.</i> , 2007)
			EUA	(Wang <i>et al.</i> , 2011)
			EUA	(Fogazio <i>et al.</i> , 2008)
			EUA	(Conley <i>et al.</i> , 2008)
			EUA	(Stackelberg <i>et al.</i> , 2007)
			Canadá	(Chen <i>et al.</i> , 2006 b)
Brasil (Campinas)	(Montagner e Jardim, 2011)			
Brasil (Curitiba)	(Frohener <i>et al.</i> , 2010)			
Brasil (Teresópolis)	(Gonçalves, 2008)			

*Apenas as concentrações acima dos limites de quantificação foram consideradas.

Além dos trabalhos citados na Tabela 2, outros dois trabalhos abordam os resultados de vários estudos obtidos para bisfenol A e triclosan em águas superficiais da Grã Bretanha, Europa e América do Norte. Kasprzyk-Holder *et al.* (2008) reportaram a presença de BPA e TCS em águas superficiais na região de toda a Grã Bretanha. Os valores obtidos variaram entre os limites de quantificação ($\sim 5 \text{ ng L}^{-1}$) e 95 ng L^{-1} para o triclosan e 68 ng L^{-1} para o bisfenol A. Klecka *et al.* (2009) avaliaram a exposição por BPA em sistemas de águas superficiais da América do Norte e da Europa. Diversos trabalhos descritos na literatura em que as concentrações de BPA foram reportadas entre 1997 e 2007 foram compilados neste estudo. Concentrações medianas de 81 e 10 ng L^{-1} foram obtidas para amostras de águas superficiais da América do Norte e Europa, respectivamente. Além disso, foram reportados valores medianos de BPA em sedimentos de $0,6 \text{ ng g}^{-1}$ de peso seco para a América do Norte e, de 16 ng g^{-1} de peso seco para Europa, demonstrando a tendência deste contaminante em permanecer também na fase sólida.

A rota ⑧, mostrada na Figura 3, representa a interface existente entre os sistemas aquáticos superficiais e subterrâneos. A água subterrânea pode ser bombeada e utilizada para fins de consumo (rota ⑨) ou submetida a tratamento. Águas superficiais são captadas e canalizadas para estações de tratamento de águas.

O tratamento convencional de água utiliza processos físico-químicos para a potabilização, dentre os quais as unidades de clarificação (floculadores, decantadores e filtros), de desinfecção (cloradores e aminoadores) e de polimento (correção do pH e fluoretação). Assim como nas ETE, os processos convencionais de tratamento nas ETA não são eficientes para a eliminação de inúmeros desses contaminantes, devido principalmente a natureza polar de muitos deles (Wang *et al.*, 2011; Stackelberg *et al.*, 2007; Bodzek e Dudziak, 2006). Alguns trabalhos evidenciam que a remoção de interferentes endócrinos nas ETA também depende tanto das características intrínsecas de cada composto, quanto dos métodos de tratamento (Snyder, 2008; Westerhoff *et al.*, 2005).

Westerhoff *et al.* (2005) demonstraram que métodos convencionais de tratamento promovem a remoção de menos de 25 % da concentração da maioria dos interferentes

endócrinos e, a presença de uma etapa de cloração, muito comum para desinfecção de águas no Brasil, promove uma redução de 20 a 90 % nos níveis de concentração, dependendo das características de cada composto.

A etapa de pré cloração foi também tida como suficiente para remover estrógenos em uma ETA da Espanha que capta água do rio Llobregat e abastece cerca de um milhão de habitantes. As concentrações máximas de E1, E3 e EE2 detectadas no manancial foram de 1, 72 e 3,4 ng L⁻¹, respectivamente e, após a etapa de pré-cloração, as concentrações ficaram menores que o limite de quantificação do método que foi de 0,2 ng L⁻¹ para E1 e EE2 e de 4,7 ng L⁻¹ para o E3 (Huerta-Fontela *et al.*, 2011). Além disso, o uso do cloro livre foi considerado mais eficiente na remoção de contaminantes orgânicos quando comparado a cloraminação (Snyder, 2008).

Huber *et al.* (2005) avaliaram o uso de outro oxidante, o dióxido de cloro (ClO₂) no tratamento da água para a degradação de diferentes classes de contaminantes emergentes. A concentração do oxidante do meio, a qualidade do manancial e as características dos compostos influenciaram na eficiência de remoção, no entanto, o ClO₂ foi considerado eficiente na remoção de estrógenos, sulfonamidas e antibióticos macrolídeos.

Processos terciários como ozonização, adsorção em carvão ativado, osmose reversa, filtração em membranas, processos oxidativos avançados como UV, UV/H₂O₂ e fotocatalise heterogênea têm sido aplicados em ETA como métodos complementares de remoção de contaminantes em inúmeros países (Rossner *et al.*, 2009; Broséus *et al.*, 2009; Baig *et al.*, 2008; Ikehata *et al.*, 2008; Snyder, 2008; Snyder *et al.*, 2007; Verliefde *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Bodzek e Dudziak, 2006; Chen *et al.*, 2006b; Yeo e Kang, 2006; Westerhoff *et al.*, 2005; Zhang e Zhou, 2005).

A ozonização tem sido uma das técnicas mais empregadas em diversas ETA devido ao seu alto potencial de oxidação que tem se mostrado eficiente na desinfecção, remoção da cor, controle de sabor e odor, decréscimo na formação de sub-produtos de processos de desinfecção, aumento da biodegradabilidade e também para a degradação de contaminantes orgânicos.

O ozônio reage com os contaminantes orgânicos tanto pela reação direta com o ozônio molecular como pela reação indireta com os radicais livres (radical hidroxila OH^\bullet , por exemplo) formados pela decomposição do ozônio. No entanto a taxa de formação do OH^\bullet depende da matriz, especialmente do pH alcalino, do tipo e da quantidade de matéria orgânica. O ozônio molecular reage seletivamente com ligações insaturadas, anéis aromáticos e grupos amino, enquanto que as reações com os radicais hidroxilas são mais rápidas e não seletivas. A eficiência de remoção depende, portanto das constantes de reação do contaminante com o ozônio e com os radicais hidroxilas (Broséus *et al.*, 2009; Ning *et al.*, 2007; Barron *et al.*, 2006).

Para estrógenos e cafeína a ozonização com doses de ozônio tipicamente empregadas em ETA ($\sim 2 \text{ mg min L}^{-1}$), promoveu uma remoção de cerca de 80 % destes contaminantes da água (Broséus *et al.*, 2009).

Snyder (2008) comparou a eficiência de remoção de alguns contaminantes emergentes, incluindo os estrógenos e a atrazina, nas ETA usando cloro ($3,5 \text{ mg L}^{-1}$), UV (40 mJ cm^{-2}) e ozônio ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$) e obteve que a ozonização foi o tratamento mais efetivo, a qual promoveu uma remoção superior a 70 % para a maioria dos contaminantes estudados.

O carvão ativado, ambos na forma em pó ou granulado são efetivos para a adsorção de contaminantes, sendo que o tipo de adsorvente, o tempo de contato, a dose ou regeneração e as características do manancial tais como pH, salinidade, e quantidade de matéria orgânica, são parâmetros importantes que influenciam na eficácia do tratamento (Rossner *et al.*, 2009; Fukuhara *et al.*, 2006; Snyder, 2007; Zhang e Zhou, 2005).

Dentre as membranas de filtração, o tratamento com osmose reversa e nanofiltração são considerados mais eficientes que aqueles empregando ultrafiltração e microfiltração (Snyder, 2008). Cada tipo de tratamento possui suas vantagens e desvantagens que devem ser consideradas pelas ETA no momento de se implementar um tratamento terciário na planta.

Chen *et al.* (2006) verificaram que a fotólise empregando UV não foi eficiente na remoção de BPA; porém o uso de UV/H₂O₂ apresentou uma eficiência significativa na degradação do BPA e seus produtos de degradação que foram avaliados por métodos de bioensaios. Outro estudo semelhante realizado pelo mesmo grupo usando E2 e EE2 relatou uma redução de 90 % na atividade estrogênica de amostras naturais usando UV/H₂O₂ (Rosenfeldt *et al.*, 2007).

Yeo e Kang (2006) avaliaram o tratamento da água lixiviada de um tanque de resina epóxi na remoção de bisfenol A usando TiO₂ no processo de fotocatalise heterogênea. A concentração inicial de BPA medida foi de 7,8 µg L⁻¹, a qual provocou uma diminuição na taxa de sobrevivência em *zebrafish* exposta a essa matriz. Porém, após 48 horas de reação fotocatalítica, o BPA foi completamente decomposto e nenhum efeito tóxico sobre as taxas de nascimento ou morfogênese do *zebrafish* foram observados. Zhang *et al.* (2007) também relataram remoção superior a 97 % de E1 e E2 usando reatores de TiO₂ em processos de fotocatalise heterogênea aplicados em amostras de águas naturais.

Finalmente, a rota ⑩ representa a distribuição de água para consumo humano por meio de redes municipais de distribuição ou caminhões-pipa.

A presença desses contaminantes ainda não legislados na água para consumo humano tem sido pouco abordada na literatura. Devido à importância sob o ponto de vista toxicológico é de extrema importância elucidar suas ocorrências nessas amostras. A Tabela 3 apresenta um resumo dos trabalhos de países como Alemanha, Espanha, Holanda, França, Itália, Estados Unidos, Canadá, China e Brasil, que reportaram concentrações de alguns dos contaminantes abordados neste trabalho em água tratada. Observa-se que as concentrações variaram significativamente e se mostraram relacionadas diretamente com a eficiência das ETA e a qualidade do manancial em cada país.

Tabela 3: Concentrações (ng L⁻¹) dos contaminantes abordados neste trabalho detectados em água tratada de diferentes países.

<i>Compostos</i>	<i>Concentração média (ng L⁻¹)</i>	<i>Concentração máxima ou faixa de concentração (ng L⁻¹)*</i>	<i>País</i>	<i>Referência</i>	
estrona	0,4	0,2 - 0,6 < 0,4	Alemanha	(Kuch e Ballschmiter, 2001)	
			Holanda	(Verliefde <i>et al.</i> , 2007)	
17β-estradiol	0,7	0,2 - 2,1 < 0,4 6,8	Alemanha	(Kuch e Ballschmiter, 2001)	
			Holanda	(Verliefde <i>et al.</i> , 2007)	
			Brasil	(Lopes <i>et al.</i> , 2010)	
testosterona		2,1 – 26,4	França	(Vulliet <i>et al.</i> , 2011)	
17α-etinilestradiol	0,35	0,15 - 0,5	Alemanha	(Kuch e Ballschmiter, 2001)	
progesterona		1,6 – 3,0	França	(Vulliet <i>et al.</i> , 2011)	
	0,57	0,57	EUA	(Benotti <i>et al.</i> , 2009)	
levonorgestrel		2,0 - 10	França	(Vulliet <i>et al.</i> , 2011)	
bisfenol A	5		Espanha	(Rodrigues-Mozaz <i>et al.</i> , 2004)	
	7		Espanha	(Rodrigues-Mozaz <i>et al.</i> , 2005)	
	1,1	0,5 - 2,0 129 - 136	Alemanha	(Kuch e Ballschmiter, 2001)	
			França	(Baugros <i>et al.</i> , 2008)	
		< 10	Holanda	(Verliefde <i>et al.</i> , 2007)	
	99**	2,3 – 317**	China	(Li <i>et al.</i> , 2010)	
	25	25	EUA	(Benotti <i>et al.</i> , 2009)	
		220	EUA	(Stackelberg <i>et al.</i> , 2007)	
	0,14	99 0,45 – 0,76	Canadá	(Kleywegt <i>et al.</i> , 2011)	
			Canadá	(Chen <i>et al.</i> , 2006)	
octilfenol	2	0,2 - 4,9	Alemanha	(Kuch e Ballschmiter, 2001)	
nonilfenol		92	Espanha	(Petrovic <i>et al.</i> , 2003)	
	8	2,5 - 16 10 -2.700	Alemanha	(Kuch e Ballschmiter, 2001)	
			China	(Shao <i>et al.</i> , 2005)	
	502**	196 – 1.073**	China	(Li <i>et al.</i> , 2010)	
	97**	110**	EUA	(Benotti <i>et al.</i> , 2009)	
		1100	EUA	(Stackelberg <i>et al.</i> , 2007)	
	84	104 67 - 72	EUA	(Snyder, 2008)	
			Canadá	(Chen <i>et al.</i> , 2006)	
triclosan	9,7**	< 0,5 - 14,5**	China	(Li <i>et al.</i> , 2010)	
	734		EUA	(Loraine e Pettigrove, 2006)	
	1,2		EUA	(Benotti <i>et al.</i> , 2009)	
	1,1		1,2	EUA	(Snyder, 2008)
			2,2 – 7,3	EUA	(Wang <i>et al.</i> , 2011)
atrazina		25 - 62	Espanha	(Quintana <i>et al.</i> , 2001)	
		1,0 - 18	Espanha	(Rodrigues-Mozaz <i>et al.</i> , 2004)	
	5,3	3,0 - 16 30	Itália	(Loos <i>et al.</i> , 2007)	
			Holanda	(Verliefde <i>et al.</i> , 2007)	
		15 – 28**	Canadá	(Garcia-Ac <i>et al.</i> , 2009)	
	50**	930**	EUA	(Benotti <i>et al.</i> , 2009)	
	26	990	EUA	(Benotti <i>et al.</i> , 2009)	
cafeína	23,7	10,5 - 53	Itália	(Loos <i>et al.</i> , 2007)	
		22,9	França	(Togola e Budzinski, 2008)	
		60	EUA	(Stackelberg <i>et al.</i> , 2007)	
		1,2 – 180,8	EUA	(Wang <i>et al.</i> , 2011)	
		6,8 - 108	Canadá	(Chen <i>et al.</i> , 2006)	

* Apenas as concentrações acima dos limites de quantificação foram consideradas.

** Concentrações determinadas em água de torneira. As demais foram obtidas em ETA.

Para os hormônios, as concentrações reportadas em águas tratadas variaram entre 0,2 e 26 ng L⁻¹. Para a cafeína as concentrações variaram entre 1,2 e 109 ng L⁻¹. No entanto, trabalhos de diversos países apontaram concentrações bastante distintas de nonilfenol (2,5 e 2.700 ng L⁻¹), atrazina (1 e 990 ng L⁻¹), triclosan (1,2 e 734 ng L⁻¹) e bisfenol A (0,14 e 317 ng L⁻¹). Por outro lado, nenhum trabalho descrito na literatura reportou estriol, dietiestilbestrol, mestranol e fenolftaleína em amostras de água tratada.

Kuster *et al.* (2008) determinaram 21 contaminantes emergentes na bacia do rio Llobregat, localizado no nordeste da Catalunha, na Espanha. Trata-se de uma região densamente habitada e o efluente de esgoto gerado é lançado no próprio manancial que é utilizado para abastecimento público. Oito dos dezesseis contaminantes estudados neste trabalho foram investigados tanto na água bruta quanto tratada, E1, E2, E3, PROG, EE2, NGT, DES e TCS. Nenhum deles foi detectado na água distribuída à população em concentrações maiores que o limite de detecção do método aplicado que foi menor que 1 ng L⁻¹ para os hormônios e igual a 30 ng L⁻¹ para o triclosan. No manancial foram detectados triclosan (~ 48 ng L⁻¹), estriol (~ 11 ng L⁻¹), estrona e progesterona em concentrações próximas a 1 ng L⁻¹.

Em 2000, amostras de água tratada e mananciais de água superficial e subterrânea da região metropolitana de Barcelona foram analisadas quanto à presença de 22 agrotóxicos. As concentrações de atrazina na água tratada variaram entre 25 e 62 ng L⁻¹. Em amostras de água subterrânea as concentrações variaram entre 25 e 59 ng L⁻¹ e nos mananciais de água superficial foram de aproximadamente 25 ng L⁻¹ (Quintana *et al.*, 2001). Também em Barcelona, foram detectadas concentrações de nonilfenol de 1.500 ng L⁻¹ no manancial e de 92 ng L⁻¹ na água tratada (Petrovic *et al.*, 2003).

Verliefde *et al.* (2007) relataram os valores máximos detectados em mananciais e na água tratada da Holanda para um grupo de contaminantes considerados prioritários. Dentre eles, estrona, 17β-estradiol, EE2, bisfenol A e atrazina. Para os hormônios as concentrações em água tratada foram menores que o limite de detecção (0,4 ng L⁻¹), assim como o BPA não foi detectado em concentrações maiores que 10 ng L⁻¹. A atrazina, por sua vez, teve um valor máximo quantificado na água tratada de 30 ng L⁻¹.

Todos esses compostos foram detectados no manancial pelo menos uma vez. Para os hormônios, as concentrações máximas variaram entre 0,4 e 3,4 ng L⁻¹, para o BPA foi de 22.000 ng L⁻¹ e para a atrazina de 400 ng L⁻¹.

Vulliet *et al.* (2011) avaliaram oito diferentes ETA da França entre 2007 e 2008 e detectaram concentrações de progesterona, testosterona e levonorgestrel após o tratamento em concentrações entre 2 e 26,4 ng L⁻¹. Na região francesa de Rhône Alpes, Baugros *et al.* (2008) determinaram bisfenol A nos mananciais e na água tratada em concentrações entre 129 e 156 ng L⁻¹, indicando a baixa eficiência de remoção pela ETA.

Togola e Budzinski (2008) determinaram cafeína entre outros contaminantes em um corpo d'água localizado na França que recebe um grande volume de efluente doméstico. As concentrações de cafeína determinadas na água superficial variaram entre 13 e 107 ng L⁻¹ e a concentração máxima na água tratada foi de 22,9 ng L⁻¹ em 2004.

Loos *et al.* (2007) avaliaram a contaminação das águas superficiais ao redor do Lago Maggiore que abastecem cidades ao norte da Itália, bem como a água tratada proveniente dessas fontes. Foram determinadas concentrações médias de cafeína e atrazina de 23,7 e 5,3 ng L⁻¹, respectivamente.

Wang *et al.* (2011) avaliaram 31 diferentes ETA da região do Missouri nos EUA, a qual é abastecida com água proveniente de reservatórios, subterrânea, mas principalmente dos rios Missouri e Mississippi. Foram investigados cafeína, triclosan, E1, E2, E3 e EE2. Os hormônios não foram detectados em nenhuma amostra em concentrações acima de 1 ng L⁻¹. A cafeína foi detectada em todas as amostras em concentrações que variaram entre 1,2 e 225 ng L⁻¹ nos mananciais e, 1,2 e 181 ng L⁻¹ na água tratada. O triclosan foi detectado em algumas amostras tanto de água bruta quanto tratada entre 2 e 10 ng L⁻¹.

Em outro trabalho, 19 estados americanos tiveram suas ETA avaliadas juntamente com a água que chegava às residências. Nove dos 16 compostos abordados neste trabalho estavam incluídos na lista dos contaminantes estudados. Nonilfenol e atrazina foram detectados em amostras de água de torneira em concentrações médias de 97 e 50 ng L⁻¹, respectivamente. A progesterona, o bisfenol A e o triclosan foram detectados em apenas uma amostra após o tratamento da ETA, mas não foram detectados na água de torneira. Embora o E1, E2, EE2 e TTN tivessem sido detectados em alguns mananciais, estes foram removidos durante os processos de tratamento de água (Benotti *et al.*, 2009).

Snyder (2008) também mostra um estudo da eficiência de remoção de contaminantes emergentes em diferentes ETA dos EUA que empregam UV, ozônio ou cloro livre no tratamento. A eficiência de remoção variou com o tipo de tratamento, mas foram detectados atrazina, triclosan e nonilfenol tanto na água bruta quanto tratada. A estrona foi detectada no manancial em concentrações máximas de 2 ng L⁻¹, mas não foi detectada após nenhum dos tratamentos. Neste trabalho também foram investigados E2, EE2 e TTN, os quais não foram detectados em nenhuma amostra.

Stackelberg *et al.* (2007) avaliaram, durante julho e agosto de 2003, a eficiência de uma ETA localizada numa região densamente povoada dos EUA, que capta água de um manancial onde são lançados efluentes de aproximadamente 50 ETE da região. Foram investigados 113 contaminantes emergentes, incluindo o triclosan, que não foi detectado em nenhuma amostra, a cafeína, o BPA e o nonilfenol. Os três últimos foram determinados em concentrações que variaram entre 190 e 1.400 ng L⁻¹ na água bruta e, 60 e 110 ng L⁻¹ na água tratada. Este cenário de uma região urbana com alta densidade populacional é semelhante ao encontrado na região de Campinas (SP). Porém, no Brasil, o aporte de esgoto bruto é o que mais contribui para a degradação dos recursos hídricos. Isto pode ser destacado pelas concentrações de cafeína encontradas no Brasil, que são cerca de 1000 vezes maiores que aquelas relatadas nos EUA (Montagner e Jardim, 2011; Frohener *et al.*, 2010; Gonçalves, 2008).

Loraine e Pettigrove (2006) determinaram concentrações de 734 ng L⁻¹ de triclosan na água tratada provenientes da Bacia do Rio São Joaquim, na Califórnia.

Na cidade de Ontário, no Canadá, 17 ETA foram avaliadas em 2006 quanto à remoção de 48 contaminantes emergentes incluindo bisfenol A e os hormônios E1, E2, E3, EE2 e progesterona. A água distribuída à população era proveniente tanto de rios, lagos e águas subterrâneas. Os tratamentos empregados eram basicamente cloro e fluoretação e, em algumas plantas se usava pré-oxidação com UV. No estudo foram analisadas aproximadamente 120 amostras, e o bisfenol A foi o terceiro composto mais freqüentemente detectado tanto na água bruta (22 %) quanto tratada (12 %). As concentrações variaram entre 0,14 e 99 ng L⁻¹, e, nenhum hormônio foi detectado nas amostras (Kleywegt *et al.*, 2011).

Garcia-Ac *et al.* (2009) desenvolveram um método automatizado para a determinação de 14 contaminantes emergentes em amostras de água superficial e tratada da região de Montreal, no Canadá. Foram determinadas concentrações de atrazina entre 15 e 28 ng L⁻¹ na água da torneira e 2 e 48 ng L⁻¹ em três diferentes rios da região.

Chen *et al.* (2006) avaliaram estações de tratamento de água e de esgoto de Calgary, no Canadá, entre 2002 e 2004, com limites de detecção de poucos nanogramas por litro. Dentre os contaminantes investigados, determinou-se cafeína, bisfenol A e nonilfenol tanto no manancial, quanto na água tratada em concentrações que variaram entre 1 e 313 ng L⁻¹.

E finalmente, na China, especificamente em Guangzhou, foram analisadas amostras de água de torneira de diferentes regiões da cidade que receberam água proveniente de seis ETA. Neste estudo foram determinados BPA (entre 2 e 317 ng L⁻¹), nonilfenol (entre 196 e 1073 ng L⁻¹) e triclosan (entre < 0,5 e 14,5 ng L⁻¹) em todas as amostras coletadas no mês de junho de 2007. A eficiência de remoção destes compostos variou significativamente entre as ETA, principalmente, para o bisfenol A e o nonilfenol (Li *et al.*, 2010).

EFEITOS

A preocupação com a presença de compostos xenoestrogênios no ambiente teve seus primeiros relatos no final dos anos 30 quando Dodds e Lawson reportaram sobre a atividade estrogênica do bisfenol A, e outros pesquisadores começaram a discutir a possibilidade de alguns compostos terem a habilidade de minimizar a ação dos hormônios endógenos (Dodds e Lawson, 1936; Schueler, 1946; Sluczewski e Roth, 1948).

Em 1965, Stumm-Zollinger e Fair publicaram o primeiro artigo indicando que os estrógenos não são completamente eliminados pelas ETE (Stumm-Zollinger e Fair, 1965). Em 1970, Tabak e Bunch investigaram o destino dos esteróides durante o tratamento de esgoto e afirmaram sobre a importância de se conhecer melhor a degradação deles nas ETE e no ambiente, uma vez que estes compostos são fisiologicamente ativos mesmo em baixas concentrações (Tabak e Bunch, 1970).

Com relação aos agrotóxicos, o livro da Rachel Carson “*Primavera silenciosa*” publicado em 1962, comprovava de inúmeras formas os efeitos nocivos à saúde humana e animal, provocados pela exposição ao DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), que inclusive poderia atingir outras gerações devido ao seu potencial de bioacumulação. Isso porque nos anos 60, com a Revolução Verde houve um grande incentivo a produção agrícola e com isso houve uma disseminação grande do uso de agrotóxicos que eram desenvolvidos e comercializados com poucas restrições de regulamentação.

Apesar destes primeiros relatos, a questão da presença dos interferentes endócrinos no ambiente não ganhou importância significativa até a década de 90, quando a ocorrência de hormônios naturais e sintéticos em ETE foi relacionada com o impacto na reprodução de peixes expostos aos efluentes de estações de tratamento de esgoto (Purdom *et al.*, 1994; Desbrow *et al.*, 1998; Routledge *et al.*, 1998).

Depois disso, muitos estudos focaram na ocorrência destes contaminantes nas ETE e nos corpos d’água em níveis de sub $\mu\text{g L}^{-1}$ (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Ternes

et al., 1999; Daughton e Ternes, 1999; Kolpin *et al.*, 2002) e, paralelamente, estudos *in vitro* e *in vivo* começaram a ser reportados sobre os possíveis mecanismos de ação de compostos xenoestrogênios no organismo de mamíferos (Wester e Canton, 1986; Daston *et al.*, 1997; Harrison *et al.*, 1997; Lintelmann *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2006; Shanle e Xu, 2011).

Um dos exemplos mais conhecidos é o caso envolvendo a contaminação de crocodilos no lago Apopka (Flórida/EUA), na década de 1980. Na ocasião, alguns pesquisadores notaram que a população desses animais estava diminuindo ano a ano. Estudos subseqüentes demonstraram que a exposição contínua de alguns agrotóxicos, mesmo em concentrações baixas, sobre os ovos da espécie interferiu no desenvolvimento do sistema reprodutor dos animais, tornando-os inférteis (Sumpter e Johnson, 2005).

Uma evidência dos possíveis efeitos provocados pela exposição humana aos interferentes endócrinos foi observada entre os anos 50 e 70 com mulheres grávidas que tomaram dietilstilbestrol, que é um estrogênio sintético prescrito para evitar aborto espontâneo e promover o crescimento do feto. A maioria das filhas dessas mulheres nasceu estéril e algumas desenvolveram um tipo raro de câncer vaginal. Nos filhos, provocou anormalidade nos órgãos sexuais, baixa contagem de espermatozóides e tendência a desenvolverem câncer nos testículos.

Apesar disso, os efeitos sobre a saúde humana associados aos interferentes endócrinos ainda não são definitivamente comprovados; porém outras evidências sugerem que a antecipação na idade da menarca (Herman-Giddens, 2007; Tanner, 1973), a deterioração da qualidade do sêmen (Weber *et al.*, 2002; Harrison *et al.*, 1997; Toppari *et al.*, 1996; Sharpe e Skakkebaek, 1993) e o aumento da incidência de câncer de mama (Wolff *et al.*, 1993) podem estar associadas à exposição de seres humanos em desenvolvimento frente a esses compostos. Um trabalho mais recente mostra que a exposição pré-natal aos interferentes endócrinos pode potencializar o desenvolvimento precoce do cérebro (Miodovnik *et al.*, 2011). Outro trabalho discute ainda o mecanismo de transporte de compostos interferentes endócrinos, como o bisfenol A, pela placenta

e aponta efeitos negativos no desenvolvimento neurológico dos bebês (Wan *et al.*, 2010).

Mnif *et al.* (2011) listam alguns efeitos provocados pela exposição à atrazina como inibição androgênica, disfunções no hipotálamo e produção de prolactina, indução da produção de estrógenos, danos nas glândulas adrenais e redução do metabolismo de hormônios esteróides.

Outros estudos mostram que a exposição de diferentes organismos frente aos interferentes endócrinos leva à ocorrência de efeitos como a feminização de peixes (Milla *et al.*, 2011; Filby *et al.*, 2010; Brian *et al.*, 2007; Kidd *et al.*, 2007; Salo *et al.*, 2007; Diniz *et al.*, 2005; Pait e Nelson, 2003; Christiansen *et al.*, 2000), alterações no desenvolvimento de moluscos e anfíbios (Hayes *et al.*, 2010; Matthiessen, 2008; Oehlmann *et al.*, 2007; Park e Kidd, 2005; Oehlmann *et al.*, 2000), disfunções no metabolismo da testosterona em *Daphnias* (Oberdörster *et al.*, 1998; Parks e LeBlanc, 1996) e desenvolvimento anormal de órgãos em diferentes organismos aquáticos (Hayes *et al.*, 2010; Diniz *et al.*, 2005; Wollenberger 2005; Pickering e Sumpter, 2003).

Com o passar dos anos, as ferramentas analíticas foram se aperfeiçoando e, limites de detecção cada vez menores foram sendo obtidos. Diversos trabalhos relatavam sobre métodos empregando CG-MS (Ribeiro *et al.*, 2009; Baugros *et al.*, 2008; Nakada *et al.*, 2006), HPLC-UV (Montagner e Jardim, 2011; Froehner *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2009; Sodr e *et al.*, 2007; Lopez de Alda e Barcel o, 2000), HPLC-FL (Montagner e Jardim, 2011; Lopes *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2007 Sodr e *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2006; Snyder *et al.*, 1999), mais recentemente o CG-MS/MS (Westerhoff *et al.*, 2005; Fromme *et al.*, 2002) e o LC-MS/MS (Huerta-Fontela *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Jardim *et al.*, 2011; Richardson, 2009; Rodil *et al.*, 2009; Baugros *et al.*, 2008; Yamamoto *et al.*, 2006; Westerhoff *et al.*, 2005) para a determina o dos contaminantes emergentes. Atualmente as técnicas analíticas dispõem de excelente detectabilidade (sub ng L⁻¹) e precisão necessárias para o monitoramento de traços, o que viabilizou inúmeros estudos envolvendo o transporte e destino desses contaminantes no ambiente.

Concomitantemente com a otimização das técnicas analíticas, foram sendo desenvolvidos e aprimorados diferentes bioensaios como ferramentas capazes de fornecer informações sobre os efeitos estrogênicos, de sinergismo ou influências antiestrogênicas relacionadas à presença de inúmeros contaminantes em uma amostra complexa. Diferentes mecanismos de detecção incluindo proliferação de células, ligação do ligante, indução de vitelogenina, indução de luciferase e interação antígeno-anticorpo foram desenvolvidos a fim de se conhecer os reais efeitos da presença dos compostos interferentes endócrinos no ambiente (Campbell *et al.*, 2006).

A proliferação de células estima o crescimento e reprodução em diferentes amostras expostas aos estrógenos. Na ligação um ligante específico é usado para que os estrógenos possam ser quantificados. A vitelogenina é uma proteína do fígado de peixe fêmea produzida em resposta aos estrógenos que pode ser extraída do plasma e medida. A produção de vitelogenina em peixes machos é um indicativo de interferência endócrina. A indução de luciferase usa estrogênios receptores e elementos de resposta para produzir a proteína que pode ser quantificada por luminescência após o rompimento da célula e a adição de luciferina. Interações antígeno-anticorpo são imunossaios baseados na ligação não covalente entre antígeno e anticorpo (Campbell *et al.*, 2006).

Na Figura 4 é mostrada a estrogenicidade relativa obtida em um bioensaio de proliferação de células MCF7 (E-screen), responsável pelo desenvolvimento de câncer de mama, de algumas substâncias químicas pertencentes a diferentes classes de estrogênios. O aumento na proliferação de células é provocado pela presença de estrógenos. Pode-se observar que o 17α -etinilestradiol e o dietilstilbestrol apresentaram maior estrogenicidade, quando comparados aos hormônios naturais 17β -estradiol, estriol e estrona, o que indica a alta capacidade que esses compostos possuem de agir no sistema endócrino humano. A estrogenicidade dos xenoestrogênios foi cerca de quatro ordens de magnitude menor comparado aos hormônios naturais. No entanto, a concentração e a persistência dessas substâncias no ambiente é relativamente maior que os estrogênios naturais.

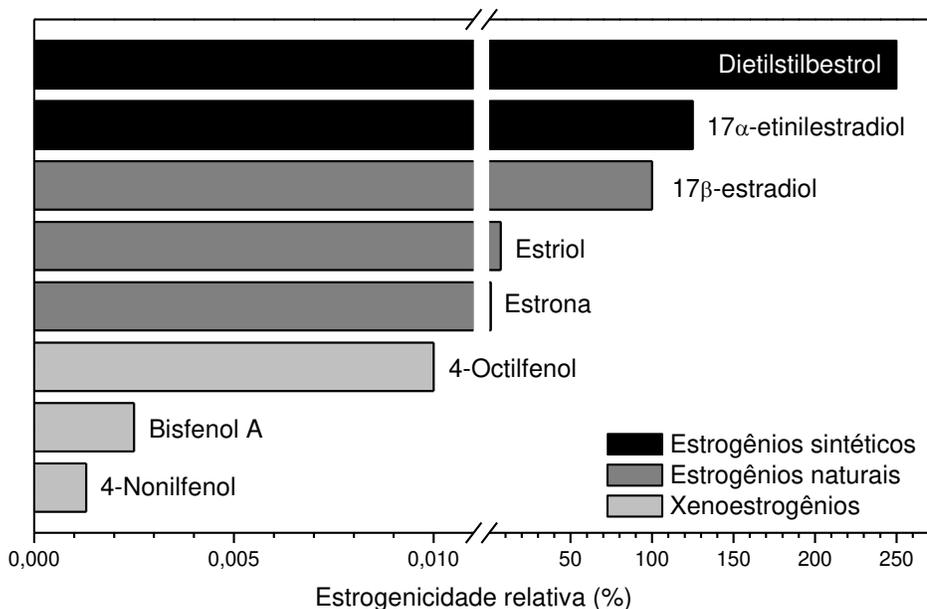


Figura 4: Estrogenicidade relativa de alguns interferentes endócrinos obtida por ensaios de proliferação com células MCF7 (E-screen) (adaptado de Gutendorf e Westendorf, 2001 e Auriol *et al.*, 2006).

A determinação de níveis de vitelogenina no plasma sanguíneo de um organismo é um dos marcadores bastante usado para a determinação da atividade estrogênica de uma substância. A vitelogenina é uma proteína que desempenha um importante papel no sistema reprodutivo de vertebrados ovíparos fêmeas. É sintetizada no fígado, regulado por estrogênio e transportada através do sangue para os ovários, onde são incorporadas no desenvolvimento dos óvulos. De um modo geral, o gene da vitelogenina também está presente em organismos machos, mas sob condições normais não é expressivo, possivelmente pela baixa concentração de estrogênio no sangue. O aumento de vitelogenina no plasma de um organismo é considerado uma evidência da exposição a substâncias com atividade estrogênica. Tem sido observado que alguns organismos aquáticos respondem com o aumento na síntese de vitelogenina como resposta à exposição a determinadas concentrações de estrogênios.

Um experimento com tartarugas da espécie *Chrysemys picta*, mostrou que as tartarugas fêmeas expostas a estrogênios são afetadas com altos níveis de vitelogenina no plasma, que alteraram o sistema reprodutivo desses animais por meio de alterações nos ovos. Estudos mostraram que vários xenoestrogênios tais como bisfenol A e os alquilfenóis, possuem a capacidade de estimular a produção de vitelogenina,

principalmente em peixes, onde esse tipo de ensaio é comumente realizado (Bila e Dezotti, 2003).

Em 1986, Wester e Canton demonstraram que a feminização de peixes ocorreu devido à ação de alguns compostos orgânicos presentes na água, como por exemplo, o β -hexaclorociclohexano, por meio da indução à produção de vitelogenina em peixes machos.

Filby *et al.* (2010) avaliaram o emprego de tratamentos complementares em ETE na redução dos efeitos de feminização de peixes expostos aos efluentes das ETE. Todos os três tratamentos estudados (ozônio, carvão ativo granular e dióxido de cloro) promoveram a redução da atividade estrogênica, porém com diferentes eficácias (entre 70 e 100 %). Além disso, observou-se uma inibição na produção de vitelogenina de peixes expostos aos efluentes tratados com carvão ativo granular e o dióxido de cloro.

Dentre os bioensaios, um ensaio baseado nas interações antígeno-anticorpo, denominado YES (*Yeast Estrogen Screen*) desenvolvido por Routledge e Sumpter em 1996 vem sendo largamente utilizado para a avaliação da atividade estrogênica de amostras ambientais tais como efluentes de ETE (Shappell *et al.*, 2007; Salste *et al.*, 2007; Layton *et al.*, 2000), águas superficiais (Murk *et al.*, 2002; Pawlowski *et al.*, 2003), águas estuarinas (Thomas *et al.*, 2002), água tratada (Jardim *et al.*, 2011) bem como para avaliar a eficiência de diferentes tipos de tratamento de efluentes (Caliman e Gavrilesco, 2009; Rosenfeldt *et al.*, 2007).

No YES a atividade estrogênica de compostos químicos é medida utilizando uma linhagem de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) que contém um gene de estrógeno humano (hER), capaz de responder a agentes estrogênicos, medida através da atividade da beta-galactosidade. O gene repórter do sistema quando entra em contato com compostos estrogênicos desencadeiam uma série de reações resultando na variação da intensidade da resposta colorimétrica.

Diferentes linhagens de leveduras foram desenvolvidas por diversos pesquisadores (Schultis e Metzger, 2004; Aerni *et al.*, 2004; Leskinen *et al.*, 2003;

Legler *et al.*, 2002; Gaido *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2000; Arnold *et al.*, 1996; Routledge e Sumpter, 1996).

Em 2003, Leskinen *et al.* desenvolveram uma nova linhagem de *Saccharomyces* que responde ao agente estrogênico emitindo luz. As células de *Saccharomyces cerevisiae* naturalmente não possuem receptores para estrogênios ou androgênios. As linhagens utilizadas no ensaio foram então desenvolvidas a partir da inserção do gene para expressão do receptor de estrogênio humano. Neste sistema, o hER produzido liga-se aos elementos de resposta do estrogênio, que foram inseridos em forte promotor num plasmídeo. Este promotor controla a expressão do gene de vagalume *ffluc*, que codifica a produção da enzima luciferase. A levedura é capaz de emitir luz quando entra em contato com alguma substância que se liga ao hER, ativando o promotor e estimulando a síntese de luciferase (que metaboliza o substrato luciferina, produzindo luz).

Em 2005, Sanseverino *et al.* desenvolveram outra linhagem luminescente de *Saccharomyces cerevisiae* chamada *Bioluminescent Yeast Estrogen Screen* (BLYES). Essa linhagem foi construída a partir da mesma linhagem de Routledge e Sumpter (1996), apenas com outro sistema repórter. O sistema repórter foi construído em um plasmídeo contendo todo o aparato do gene *lux*, obtido de bactéria luminescente. Esta diferença é importante, pois dispensa a adição do substrato luciferina, um reagente de alto custo. Este ensaio se mostrou muito sensível, uma vez que a emissão de luz poderia ser detectada com facilidade e quantificada em poucas horas fornecendo limites de quantificação em níveis de pg L⁻¹.

Bergamasco (2010) comparou os bioensaios usando as linhagens desenvolvidas por Leskinen e Sanseverino e verificou que o protocolo descrito por Sanseverino *et al.* (2009) se mostrou mais sensível e mais simples, uma vez que não haveria necessidade de adicionar reagentes para promover a emissão de luz. Esse protocolo foi aplicado em diversos estudos, inclusive neste trabalho, interessados na determinação da atividade estrogênica de substâncias químicas e amostras complexas. (Jardim *et al.*, 2011; Alvarez *et al.*, 2009; Sanseverino *et al.*, 2009; Sanseverino *et al.*, 2005).

CRITÉRIOS DE QUALIDADE DE ÁGUA

Aproximadamente 15 anos se passaram desde que os compostos considerados contaminantes emergentes começaram a ser identificados em diferentes mananciais do mundo todo. As ferramentas analíticas se aprimoraram, métodos validados foram se consolidando, concentrações cada vez menores foram sendo obtidas e alguns países começaram a identificar esses contaminantes inclusive na água tratada. Além disso, diversos estudos indicaram os potenciais tóxicos ou de interferência endócrina dessas substâncias. O cenário atual dispõe de ferramentas adequadas e um banco de dados de comprova a ocorrência e os efeitos dos contaminantes no ambiente, no entanto, poucos passaram a ser regulamentados.

A determinação dos critérios de qualidade de água não é trivial. Estes são estabelecidos para cada substância de acordo com a probabilidade de ocorrência em determinada região ou país e a possibilidade de provocar efeitos aos seres vivos expostos a elas. As concentrações limites são determinadas a partir de dados de toxicidade, exposição e riscos que são estabelecidos para cada classe de contaminante em particular. Diferentes critérios são empregados por diversas agências reguladoras.

A USEPA disponibilizou em 2009 uma lista de novos contaminantes candidatos a futura regulamentação (*CCL-3: Contaminant Candidate List-3*). A *CCL-3* é formada por 104 compostos e 12 contaminantes microbiológicos não regulamentados nos termos da lei americana para águas tratadas (*Safe Drinking Water Act - SDWA*) para os quais são conhecidas a ocorrência ou a possibilidade de ocorrência em sistemas de água tratada e possíveis efeitos à saúde pública e, que poderão ser considerados em futuras regulamentações. Na *CCL-3* estão incluídos dentre outros hormônios, a estrona, 17β -estradiol, estriol, 17α -etinilestradiol e o mestranol, além de produtos farmacêuticos e industriais, agrotóxicos e produtos de degradação (USEPA, 2009).

Além da *CCL-3*, a USEPA aprovou em fevereiro de 2011 o projeto de lei para o monitoramento de contaminantes não regulamentados (*Unregulated Contaminants*

Monitoring Rule – UCMR-3). A *UCMR-3* é uma versão atualizada das anteriores *UCMR-1* (1999) e *UCMR-2* (2007), que lista 30 contaminantes prioritários, juntamente com métodos validados, que deverão ser monitorados entre 2013 e 2015 por todos os sistemas públicos de água que atendem mais de 10.000 pessoas e, outros, definidos por amostragem, que atendem um número menor de americanos. Dentre os contaminantes, 24 estão na *CCL-3* e incluem a estrona, o 17β -estradiol e o 17α -etinilestradiol. Além desses, a testosterona, outro hormônio abordado neste trabalho, também foi incluído na *UCMR-3*, que usará os dados obtidos para subsidiar futuras regulamentações (USEPA, 2011).

A União Européia também apresenta uma lista de 33 substâncias consideradas prioritárias pela Comissão sobre normas de qualidade ambiental (*Directive on Priority Substances - Directive 2008/105/EC*). Dentro desta, 11 foram identificadas como substâncias perigosas prioritárias e inclui o nonilfenol. Estas substâncias serão sujeitas a cessação ou eliminação progressiva nas descargas, emissões e perdas dentro de um período que não deverá exceder 20 anos. Outras 14 substâncias foram identificadas como estando sujeitas a exame para identificação como possível "substância perigosa prioritária" e estão incluídos, o octilfenol e a atrazina.

A atrazina é um herbicida já regulamentado em diversos países, inclusive no Brasil, devido ao seu potencial tóxico, no entanto os critérios estabelecidos, entre 2 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para água para consumo humano, por exemplo, não abordam os possíveis efeitos estrogênicos, provocados em concentrações de poucos nanogramas por litro aos seres vivos expostos cronicamente a este contaminante.

A Portaria 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde estabelece os parâmetros nacionais de potabilidade e a Resolução CONAMA nº 396/2008 estabelece os parâmetros para águas subterrâneas no Brasil. Para a atrazina, o limite legislado é de 2 $\mu\text{g L}^{-1}$, que é semelhante ao determinado para águas tratadas da Nova Zelândia (NZMH, 2008) e aos valores orientadores da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2008). Nos Estados Unidos o valor para o padrão de potabilidade é de 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (USEPA, 2009), o mesmo adotado pela FDA para água engarrafada (ATSDR, 2008). No Canadá os valor orientador é de 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (HC, 2008).

Diversos países como França, Suécia, Dinamarca, Finlândia, Noruega, Alemanha, Áustria e Itália, proibiram o uso de atrazina após ter sido incluída na lista de contaminantes perigosos prioritários da Comunidade Européia e ter sido detectada na água tratada em níveis superiores a $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Além disso, a União Européia adota um valor orientador de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ para um agrotóxico individual e $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para a somatória dos agrotóxicos na água para consumo humano (EC, 1998).

No Canadá a concentração máxima aceitável de atrazina e seus produtos de degradação na água tratada é de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$. Para a proteção da vida aquática é de $1,8 \mu\text{g L}^{-1}$, $5 \mu\text{g L}^{-1}$ para água de dessedentação de animais e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para a água de irrigação (CCME, 2008).

As empresas concessionárias de água devem atender às exigências vigentes para garantir a qualidade da água distribuída à população. Para isso, processos de tratamento são adequados de acordo com o estágio de degradação do manancial, considerando inclusive os períodos de estiagem em que há diminuição da vazão e conseqüentemente, da qualidade das águas dos rios que recebem alta carga de esgoto bruto durante todo o ano. Porém no Brasil, tanto as ETE quanto as ETA operam com tratamento convencional o que não é suficiente para a remoção de diversos contaminantes orgânicos, que por sua vez, podem estar presentes inclusive na água tratada oriunda de mananciais bastante comprometidos.

Atualmente, no Brasil, a Portaria MS 518/04 esta sendo revisada. A preocupação com a presença de fármacos, drogas ilícitas e compostos interferentes endócrinos na água distribuída à população desencadeou uma série de debates e discussões incluindo diversos pesquisadores, concessionárias de água, associações e órgãos do governo, como a CETESB, por exemplo, o que resultou em uma Proposta apresentada pela Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental (ABES) para a inclusão de novos contaminantes não legislados na Portaria.

Como ainda não existem dados toxicológicos suficientes para a derivação de padrões de potabilidade, esta proposta sugere a intensificação de ações no sentido de prevenção da contaminação por esses compostos, e ainda, sugere que análises de

caféina e bisfenol A sejam incluídas como exigência no Plano de Segurança da Água, especialmente em regiões mais populosas. Neste trabalho, a cafeína está sendo usada como um indicador de contaminação por esgoto doméstico, uma vez que a determinação deste contaminante é simples e de custo acessível, podendo ser implantada nas análises de rotina. A proposta sugere um monitoramento na água bruta que deverá ser realizado pelas concessionárias de água a fim de se conhecer o nível de contaminação dos mananciais em níveis de ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados, portanto, deverão ser remetidos aos órgãos ambientais responsáveis (Saúde e Meio Ambiente) para discussão de ações de prevenção cabíveis para a intensificação de ações de controle das fontes de água tratada. A proposta estabelece ainda, o prazo de dois anos para que os produtores de água promovam as adequações necessárias para tal monitoramento (ABES, 2010). Esse é, portanto, o primeiro passo a ser tomado no sentido de incluir novos contaminantes nas legislações de qualidade de água brasileira.

CAMPINAS (SP)

Campinas possui área territorial de 796 km² e é o terceiro município mais populoso do Estado de São Paulo, com 1.080.999 habitantes, dos quais 98,2 % vivem na área urbana cuja extensão é de 389 km² o que representa densidade populacional superior a 2.000 hab/km², segundo o Censo 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Além disso, os Censos anteriores apontam que a população quase triplicou em 40 anos (Figura 5) e, assim como a maior parte do país, o crescimento desordenado da população, aliado à falta de planejamento, resultou numa grande desigualdade social, com várias áreas demarcadas por focos de pobreza. Apesar disso, o seu Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) é de 0,852, considerado como elevado em relação ao país, sendo o sétimo maior do Estado de São Paulo (IBGE, 2010).

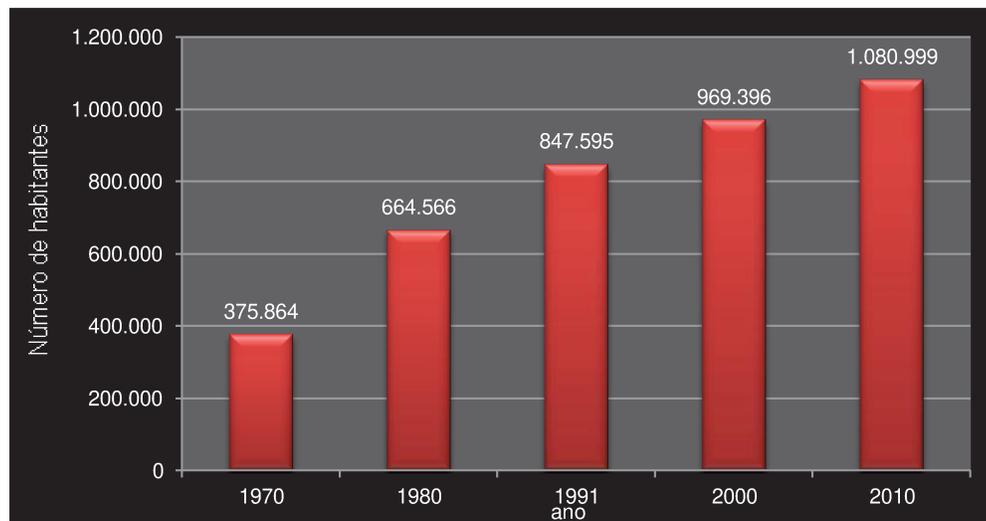


Figura 5: Número de habitantes na cidade de Campinas segundo os Censos realizados em 1970, 1980, 1991, 2000 e 2010 (fonte: IBGE).

Campinas foi emancipada em 1774. Entre o final do século XVIII e o começo do século XX, a cidade teve o café e a cana-de-açúcar como importantes atividades econômicas. Porém, desde a década de 1930, a indústria e o comércio são as principais fontes de renda, sendo considerada um pólo industrial regional. Atualmente é a décima cidade mais rica do Brasil, responsável por pelo menos 15 % de toda a

produção científica nacional, sendo o terceiro maior pólo de pesquisa e desenvolvimento brasileiro.

Em Campinas, a SANASA (Sociedade de Abastecimento de Água e Saneamento S/A) é a empresa responsável pela coleta e tratamento de esgoto, bem como pela captação, o tratamento e a distribuição de água para a população.

De acordo com dados oficiais, a SANASA atende atualmente 88 % da população urbana com coleta e afastamento de esgoto sanitário, e possui capacidade instalada de tratamento de 80 % dos despejos. Apesar disso, uma grande carga dos esgotos domésticos, mesmo aqueles coletados e afastados pela rede pública são lançados em córregos e ribeirões que atravessam a área urbana, comprometendo os demais usos da água disponíveis para a população assentada à jusante, e a qualidade dos mananciais da região (SANASA, 2011).

A água distribuída à população campineira é proveniente de dois mananciais, rios Atibaia e Capivari. O Atibaia é um rio de média vazão anual (cerca de $12 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) formado pela confluência dos rios Atibainha e Cachoeira entre os municípios Atibaia e Bom Jesus dos Perdões, atravessa as cidades de Atibaia e Itatiba antes de chegar à Campinas, depois passa por Paulínia, e em Americana forma o rio Piracicaba a partir de sua confluência com o rio Jaguari, totalizando 165 km de extensão.

O Capivari é um rio com 212 km, de baixa vazão anual (cerca de $1,2 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$), tem sua nascente na cidade de Louveira, atravessa a cidade de Campinas depois se desenvolve pelos municípios de Monte Mor, Capivari, Rafard e Mombuca, percorrendo cerca de 180 km dentro do Estado de São Paulo, e deságua na margem direita do rio Tietê, assim como os rios Piracicaba e Jundiáí.

O Relatório de Qualidade de Águas Superficiais do Estado de São Paulo, publicado anualmente pela CETESB, deriva alguns índices para classificar um corpo hídrico de acordo com os seus múltiplos usos. Para o cálculo do Índice de Qualidade de Águas (IQA), são consideradas variáveis de qualidade que indicam o lançamento de efluentes domésticos para o corpo d'água, fornecendo uma visão geral sobre as

condições de qualidade das águas superficiais. O Índice de Qualidade das Águas para Fins de Abastecimento Público (IAP) avalia, além das variáveis consideradas no IQA, as substâncias tóxicas e as variáveis que afetam a qualidade organoléptica da água, advindas, principalmente, de fontes difusas. E o Índice de Qualidade das Águas para Proteção da Vida Aquática (IVA), inclui variáveis essenciais para a vida aquática como o estado trófico, oxigênio dissolvido, pH e toxicidade (CETESB, 2009).

Os índices publicados pela CETESB para o rio Atibaia, próximo à captação da SANASA (ATIB02065), e para o rio Capivari, no ponto localizado na ETA Capivari (CPIV02130) indicaram uma piora na qualidade dos mananciais no período de cheia dos rios. O IQA médio em 2009 foi considerado regular para ambos mananciais, porém nos meses de abril e novembro, o rio Capivari apresentou IQA péssimo. A média anual para o IAP foi considerada regular para o rio Atibaia e ruim para o rio Capivari, nos pontos de captação de água da cidade de Campinas. Quanto ao IVA para o rio Atibaia, a média anual foi considerada boa, porém em janeiro e julho foi classificado como péssimo. Já a média anual do IVA para o rio Capivari foi considerada regular com variações durante o ano entre bom e péssimo.

A SANASA capta 95 % da água usada para abastecimento da cidade de Campinas do rio Atibaia, e esta é tratada em quatro estações de tratamento, a saber, ETA 1 e 2 localizadas no bairro Swift e ETA 3 e 4 localizadas em Sousas. A ETA Capivari, localizada junto à rodovia dos Bandeirantes, capta água direto do rio Capivari e é responsável pelo abastecimento dos bairros da região sul do município, o que representa cerca de 5 % do total. Além disso, alguns bairros, cerca de < 0,1 % da população, são abastecidos com água subterrânea. Nesses bairros, algumas residências são servidas com água coletada e clorada pela SANASA e, outros utilizam poços domésticos (SANASA, 2011).

Os processos de tratamento de água em Campinas são do tipo convencional clássicos (Figura 6) para todas as ETA, com exceção da ETA 4 e ETA Capivari, que adotam um tipo de tratamento que a SANASA denomina de diferenciado avançado. A Tabela 4 apresenta detalhes de cada uma das etapas dos tratamentos realizados em cada estação.

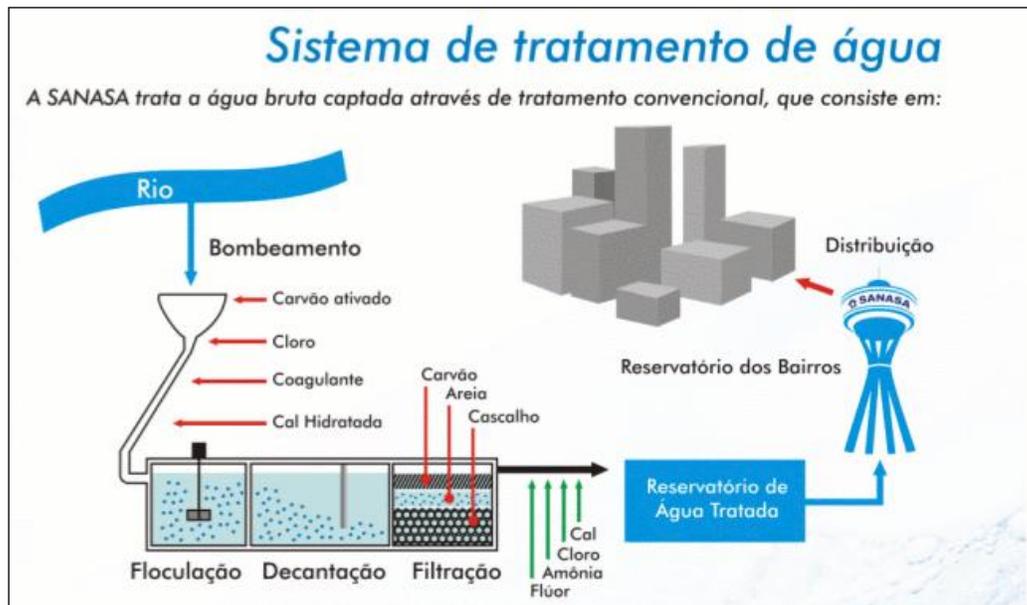


Figura 6: Resumo do sistema convencional de tratamento de água. A água bruta é bombeada do manancial, passa por um filtro de carvão ativado, recebe cloro e depois o coagulante. Existem diferentes sistemas de flocculação e decantação. Depois de decantada a água passa por um filtro, tem o pH ajustado, recebe flúor e cloro e é direcionada aos centros reservatórios e de distribuição de onde é distribuída a população (SANASA, 2011).

As empresas concessionárias de água devem atender às exigências vigentes na Portaria MS 518/2004, que estabelece os parâmetros nacionais de potabilidade para garantir a qualidade da água distribuída à população. Para isso, otimizam os processos de tratamento de acordo com o estágio de degradação do manancial de onde a água bruta é captada, considerando inclusive os períodos de estiagem onde há diminuição da vazão e da qualidade das águas dos rios que recebem alta carga de esgoto bruto.

A Figura 7 apresenta o mapa do sistema produtor e distribuidor de água de Campinas disponibilizado pela SANASA. Os centros reservatórios e de distribuição (CRD) estão representados pelos círculos fechados, a região em verde é abastecida por água tratada nas ETA 1 e 2, a região em azul, por água tratada nas ETA 3 e 4 e a região em vermelho, por água tratada na ETA Capivari.

Tabela 4: Descrição das etapas realizadas nas estações de tratamento de água no município de Campinas, SP (SANASA, 2011).

Estação	Manancial	Processo de tratamento	Capacidade operacional (L/s)	Adsorção	Coagulação	Floculação	Decantação	Filtração	Tanque de contato
ETA 1	Rio Atibaia	Convencional clássico	520	Aplicação de carvão ativado em pó (para a remoção de sabor e odor) em canais de chegada de água bruta para adsorção de matéria orgânica.	Adição do coagulante sulfato férrico sem dispositivo que produza mistura.	Hidráulica, com fluxo horizontal em canal de chicanas oblíquas verticais.	Efetuada em decantadores de fluxo horizontal para a sedimentação da água floculada, com remoção manual de lodo.	As ETA 1 e 2 empregam juntas 13 filtros rápidos de taxa constante por gravidade, leito simples de areia e lavagem com água.	Usado para dispersão e contato da amônia, cloro (para desinfecção), flúor (medida profilática para a redução de cáries na população) e cal (para a correção do pH).
ETA 2	Rio Atibaia	Convencional clássico	650	Pré-cloração para ajudar na redução da matéria orgânica e redução dos metais.	Adição do coagulante cloreto férrico misturado hidraulicamente.	Mecânica através de agitadores de paletas de eixo horizontal.	Efetuada em decantadores de fluxo horizontal com remoção mecânica de lodo.	As ETA 3 e 4 empregam juntas 17 filtros rápidos por gravidade do tipo taxa constante, com leito duplo de areia e antracito e lavagem com água e ar.	
ETA 3	Rio Atibaia	Convencional parcialmente avançado	1100		Adição do coagulante cloreto férrico feita rapidamente através do misturador vertical em canal fechado.				
ETA 4	Rio Atibaia	Convencional parcialmente avançado	1900						
ETA Capivari	Rio Capivari	Diferenciado	360	Adsorção com atividade biológica com aplicação de carvão ativado em pó e aeração forçada de superfície para aumentar o O ₂ dissolvido. Pré-cloração para ajudar na redução da matéria orgânica e redução dos metais.	Adição do coagulante policloreto de alumínio realizado em um canal de alta turbulência para mistura rápida.	Mecânica através de agitadores de paletas de eixo vertical.	Decantação acelerada através de placas planas, inclinadas de 60 graus com a horizontal. O lodo é drenado por sistemas de coleta de fundo fixo.	Emprega 8 filtros rápidos por gravidade do tipo taxa declinante, com vertedor geral de filtrado, de meio poroso duplo de areia e antracito, autolavável.	

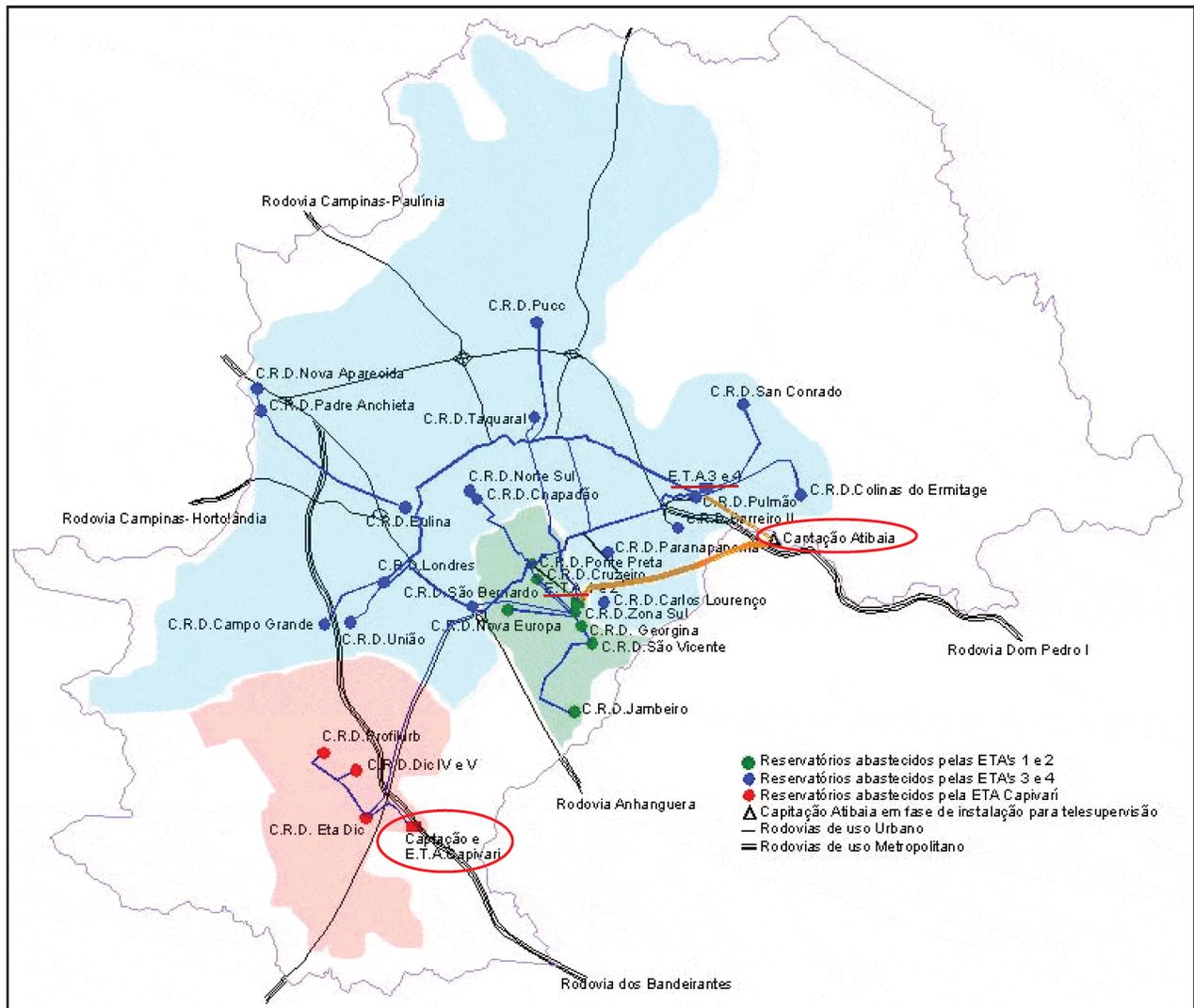


Figura 7: Mapa do sistema produtor e distribuidor de água da Campinas (SANASA, 2011). Em destaque os locais de captação de água bruta nos rios Atibaia e Capivari. Em verde estão apresentados os 7 reservatórios abastecidos pelas ETA 1 e 2, que atendem a região central; em azul estão os 17 reservatórios abastecidos pelas ETA 3 e 4, ambos com água provenientes do rio Atibaia. Em vermelho, aparecem os 3 reservatórios abastecidos pela ETA Capivari.

OBJETIVOS



Bairro Mansões Santo Antônio, Campinas (SP), um dos pontos amostrais do trabalho.

O objetivo principal do trabalho é obter uma avaliação detalhada da qualidade da água distribuída à população de Campinas (SP) no que se referem estrogênios naturais e sintéticos e alguns xenoestrogênios.

Para tal, alguns objetivos específicos são:

- Selecionar os contaminantes a serem investigados usando a cafeína como um traçador antrópico, bem como estabelecer os locais de coleta nos diferentes bairros da cidade, de modo a contemplar as diferentes regiões de Campinas;
- Estabelecer e validar um procedimento analítico para a determinação destes contaminantes nos níveis de ng L^{-1} para água tratada e superficial, empregando extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com triplo-quadrupolo (LC-MS/MS);
- Avaliar a qualidade dos mananciais que abastecem o município (rios Atibaia e Capivari) juntamente com a água tratada distribuída à população obtendo um perfil anual de contaminação, de onde será possível inferir sobre a influência do estágio de degradação do manancial na qualidade água que é servida à população;
- Avaliar a atividade estrogênica das amostras usando o bioensaio BLYES (*Bioluminesce Yeast Estrogen Screen*) a fim de se estimar os riscos associados à ingestão de água tratada pelos seres humanos, e;
- Finalmente, verificar a eficiência das estações de tratamento de água.

CAPÍTULO 2: EXPERIMENTAL

Cassiana C.M. Raimundo



Instituto de Química – UNICAMP, julho / 2011.

O trabalho foi desenvolvido na cidade de Campinas (SP) onde foram estudadas as condições de saneamento básico do município e o sistema de abastecimento de água para determinação dos pontos amostrais. Um protocolo de amostragem foi então estabelecido e um método para extração e de determinação dos analitos foi otimizado a partir de dados descritos na literatura empregando SPE e LC-MS/MS. A determinação da atividade estrogênica foi realizada na CETESB (como parte do Projeto Temático FAPESP 07/58449-2) empregando o bioensaio BLYES proposto por Sanseverino (2005). O estágio de contaminação dos mananciais e a qualidade da água distribuída a população, com relação à presença de 15 compostos interferentes endócrinos e cafeína, foram então avaliados em detalhes pelo período de um ano.

No entanto, em uma primeira etapa do trabalho, foi desenvolvido um método para a determinação de 15 compostos, sendo os estrogênios naturais e sintéticos, surfactantes, bisfenol A e ftalatos empregando SPE e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detectores de arranjo de diodos e fluorescência (HPLC-DAD-FL). O método foi empregado em duas campanhas realizadas em 2007 e 2008 em caráter exploratório, quando depois foi substituído pelo LC-MS/MS, o qual proporcionou maior detectabilidade à quantificação de analitos em concentrações de sub-ng L⁻¹. A descrição do método empregando HPLC-DAD-FL e os resultados das primeiras campanhas amostrais estão descritos no ANEXO 1.

REAGENTES E PADRÕES

Foram selecionados 16 compostos para serem investigados neste trabalho, a saber, estrona, 17 β -estradiol, estriol, progesterona, testosterona, 17 α -etinilestradiol, mestranol, levonorgestrel, dietilestilbestrol, 4-n-octilfenol, 4-n-nonilfenol, bisfenol A, triclosan, fenolftaleína, atrazina e a cafeína. Este último foi usado como traçador de contaminação por esgoto doméstico tendo em vista o aporte direto nos mananciais.

A Tabela 5 lista os compostos investigados e algumas informações sobre os padrões utilizados. Todos os reagentes empregados durante o tratamento das amostras apresentaram elevado grau de pureza. O metanol e a acetonitrila utilizados na etapa de extração, preparação dos extratos e injeção foram de grau nanograde ou pesticida (Mallinckrodt e/ou J.T. Baker).

Tabela 5: Compostos investigados e dados sobre os padrões utilizados.

Compostos	Fórmula	Massa Molar (g mol⁻¹)	Número CAS^a	Fornecedor	Pureza (%)
Estrona	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	270,16	53-16-7	Aldrich	99+
17 β -estradiol	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	272,18	50-28-2	Aldrich	97
Estriol	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	288,17	50-27-1	Fluka	97+
Progesterona	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314,47	57-83-0	Aldrich	98
Testosterona	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	288,42	58-22-0	Sigma	99,5
17 α -etinilestradiol	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	296,18	57-63-6	Aldrich	98
Mestranol	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	310,44	72-33-3	Aldrich	-
Levonorgestrel	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	312,5	797-63-7	Sigma	99+
Dietilestilbestrol	C ₁₈ H ₂₀ O ₂	268,36	56-53-1	Sigma	99
Triclosan	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂	289,54	3380-34-5	Sigma	99+
Fenolftaleína	C ₂₀ H ₁₄ O ₄	318,32	77-09-8	Riedel-deHaen	98+
4-n-octilfenol	C ₁₄ H ₂₂ O	206,17	1806-26-4	Supelco	99+
4-n-nonilfenol	C ₁₅ H ₂₄ O	220,18	104-40-5	Supelco	99+
Bisfenol A	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	228,12	80-05-7	Aldrich	97
Atrazina	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	215,68	1912-24-9	Sigma	99+
Cafeína	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194,19	58-08-2	Aldrich	99
Estradiol-D3	C ₁₈ H ₂₁ D ₃ O ₂	275	79037-37-9	Supelco	99
Bisfenol A-D16	C ₁₅ D ₁₆ O ₂	244	96210-87-6	Supelco	99,9

^a CAS: Chemical Abstracts Service

AMOSTRAGEM

Cassiana C. M. Raimundo



Pontos amostrais de água tratada em Campinas.

Esta parte descreve a amostragem de água bruta (rio Atibaia e rio Capivari) e tratada, além de água subterrânea (bairro Recanto dos Dourados), bem como em estações de tratamento de água.

A água tratada foi amostrada em 8 bairros distribuídos em diferentes pontos da cidade e provenientes de todas as ETA. A Tabela 6 apresenta os bairros e a localização dos pontos de coleta. As amostras coletadas em domicílios foram retiradas diretamente da tubulação de entrada e, portanto, não tiveram contato com as caixas d'água reservatório residenciais. Na Figura 8 foram reproduzidos os CRD da Figura 7 e estão inseridos os 8 pontos de coleta de água tratada estudados neste trabalho.

Tabela 6: Locais de amostragem de água tratada no município de Campinas.

Pontos amostrais	bairro	Local	Latitude	Longitude	CRD proveniente
P1	Centro	Largo do Pará	22°54'35.25"S	47° 3'23.71"O	ETA 1 e 2
P2	Jardim Nova Europa	Residência	22°56'21.33"S	47° 2'56.52"O	(rio Atibaia)
P3	Mansões Sto Antônio	Residência	22°52'37.78"S	47° 3'30.73"O	
P4	Jardim Bela Vista	Posto de Saúde	22°53'20.36"S	47° 7'18.78"O	ETA 3 e 4
P5	Sousas	Cemitério	22°53'17.26"S	46°57'43.87"O	(rio Atibaia)
P6	Barão Geraldo	Residência	22°47'44.54"S	47° 4'33.47"O	
P7	Recanto do sol II	Residência	22°57'51.01"S	47° 8'14.62"O	ETA Capivari
P8	DIC IV	Bosque	22°58'53.62"S	47° 7'5.70"O	(rio Capivari)

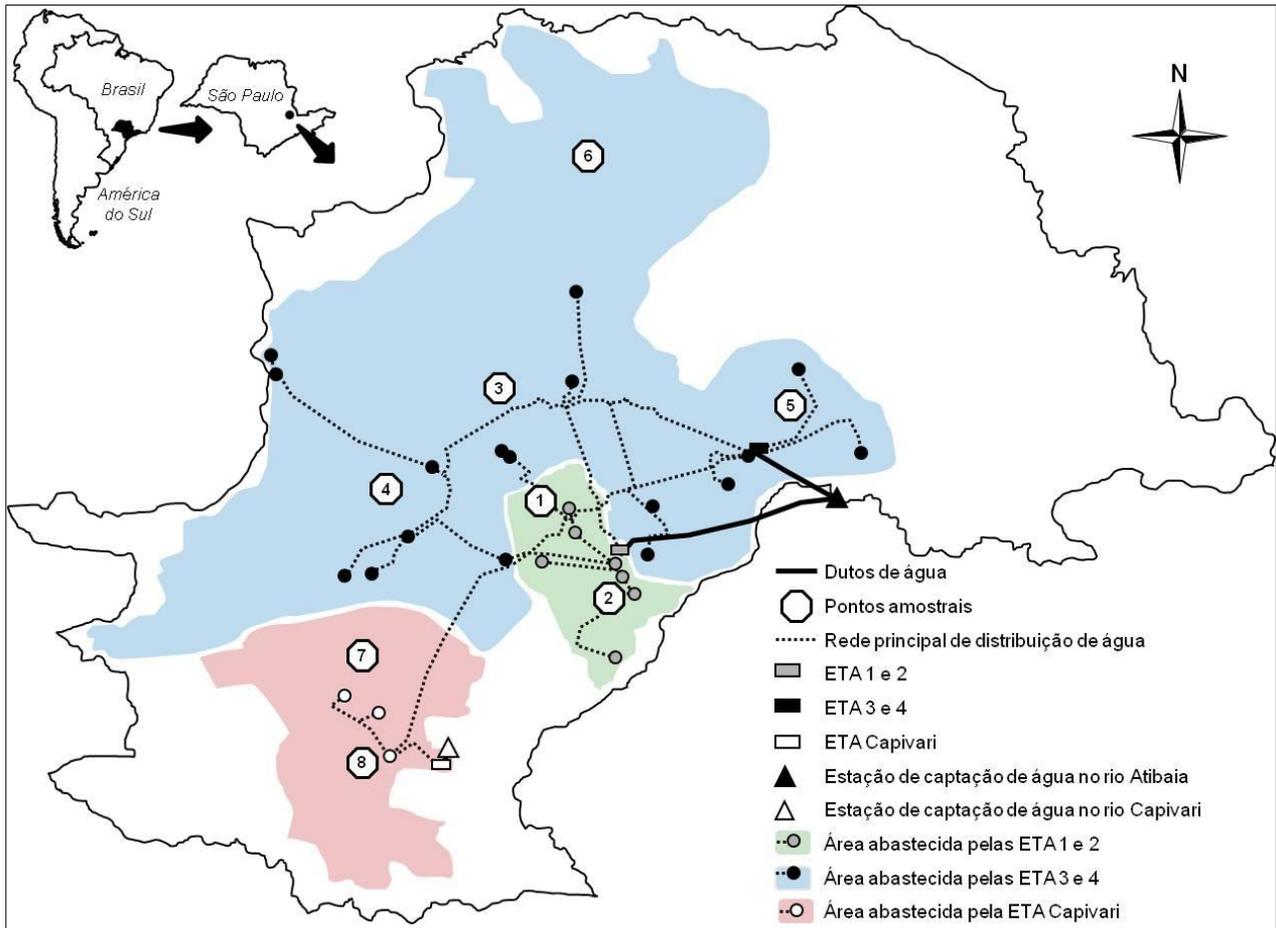


Figura 8: Mapa de Campinas indicando os Centros Reservatórios e de Distribuição (círculos) e os locais de amostragem definidos para este trabalho. Em verde a região abastecida pelas ETA 1 e 2; em azul, a região abastecida pelas ETA 3 e 4 e; em vermelho a região abastecida pela ETA Capivari. Os números indicam os pontos amostrais: P1 no Centro e P2 no Jardim Nova Europa são abastecidos pelas ETA 1 e 2; P3 Mansões Santo Antônio, P4 no Jardim Bela Vista, P5 em Sousas e P6 em Barão Geraldo são abastecidos pelas ETA 3 e 4 e; P7 no Recanto do Sol e P8 no DIC IV são abastecidos pela ETA Capivari.

A água bruta foi coletada ao lado das estações de captação de água dos rios Atibaia e Capivari. Em particular, para o rio Atibaia, outro ponto amostral foi estabelecido à montante da captação, distante cerca de 1,6 km, sob a ponte na divisa das cidades de Campinas e Valinhos. Este local é amostrado pela CETESB (ATIB02065) que infere sobre a qualidade da água para fins de abastecimento público.

Esta amostra, porém, não contempla o aporte do ribeirão Pinheiros que ocorre à jusante do ponto estabelecido pela CETESB e à montante (~ 1 km) da captação da SANASA. O objetivo foi avaliar a influência do ribeirão Pinheiros, que recebe alta carga de esgoto das cidades de Campinas, Valinhos e Vinhedo, na contaminação do rio Atibaia por compostos interferentes endócrinos e cafeína. Na Figura 9 é mostrada uma imagem de satélite da região próxima a estação de captação de água no rio Atibaia.



Figura 9: Imagem de satélite do rio Atibaia ao lado da Rodovia D. Pedro, próximo à estação de captação de água do município de Campinas. Da direita para a esquerda estão: o ponto de coleta da CETESB, sob a ponte da divisa entre Campinas e Valinhos (ATIB2065), o aporte do ribeirão Pinheiros e à jusante, a captação da SANASA.

Foram realizadas treze campanhas amostrais de água bruta e tratada entre abril de 2010 e abril de 2011 que, resultaram na análise de um perfil sazonal de contaminação. A Figura 10 apresenta a precipitação úmida diária entre abril de 2010 e abril de 2011, as temperaturas mínimas e máximas e as datas das amostragens (AGRITEMPO, 2011). Além disso, na Figura 10 também está destacado o período em que foi realizado o perfil diuturno e semanal no rio Atibaia e a datas dos dois ensaios realizados na estação de tratamento de água.

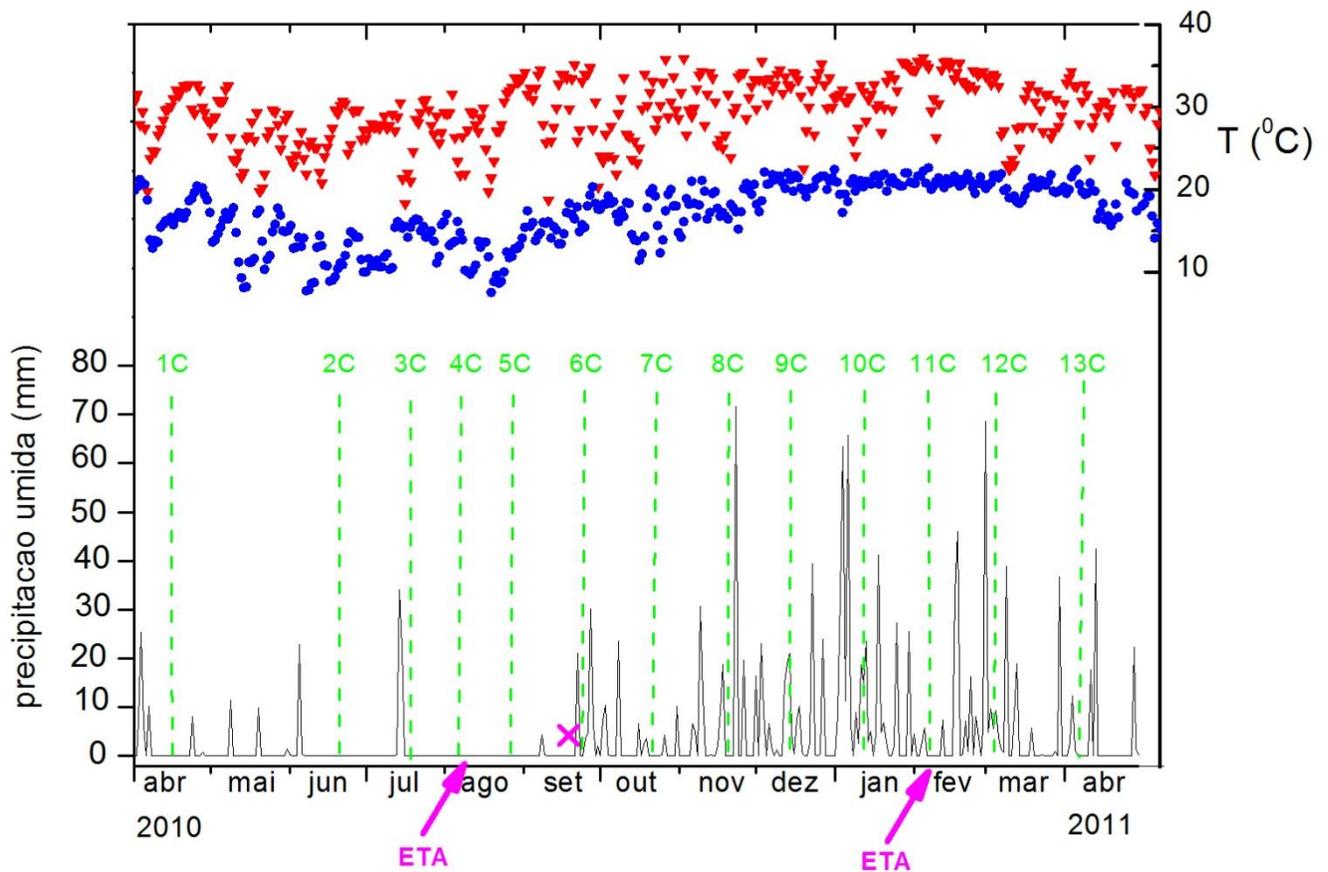


Figura 10: Precipitação diária (preto), temperaturas máximas (vermelho) e mínimas (azul) entre abril de 2010 e abril de 2011. As datas das 13 campanhas amostrais estão em verde, o (x) representa o período em que foram realizados os perfis diurno e semanal no rio Atibaia; a seta em rosa indica a época em que os ensaios foram realizados na estação de tratamento de água.

Um perfil diurno foi realizado entre os dias 12 e 13 de setembro de 2010 (domingo e segunda-feira). No ensaio, foram coletadas 7 amostras do rio Atibaia (ao lado da estação de captação de água da SANASA) com intervalo de 4 horas entre cada coleta. O ensaio teve início às 13 h do domingo e término às 13 h da segunda-feira. Em seguida foi iniciada amostragem para um perfil semanal com coletas diárias, todas no mesmo horário (9 h) entre terça-feira (14/09) e segunda-feira (20/09).

Foram realizados dois ensaios na ETA Capim Fino administrada pelo Serviço Municipal de Água e Esgoto (SEMAE) de Piracicaba. A concessionária concedeu a entrada da equipe na ETA o que proporcionou coletar em todas as etapas do tratamento. A ETA Capim Fino emprega o sistema convencional de tratamento semelhante aos empregados nas ETA de Campinas. O rio Corumbataí, manancial que abastece a ETA Capim Fino se enquadra na classe 2 do CONAMA 357 (SEMAE, 2011) assim como o rio Atibaia em Campinas. O rio Capivari, no entanto, é classificado como classe 3, pois recebe alta carga de efluentes industriais e esgotos domésticos.

O ensaio teve como objetivo conhecer com maiores detalhes a eficiência de uma ETA convencional considerando cada etapa do tratamento em dois cenários distintos, um de estiagem e outro de cheia dos rios. Foram coletadas as seguintes amostras em cada ensaio: (1) água bruta, rio Corumbataí, (2) coagulada, após receber cloro e o agente coagulante cloreto férrico (0,38 %), (3) floculada, coletada imediatamente antes da entrada no decantador, (4) decantada, coletada na saída do decantador, (5) filtrada, coletada na saída dos filtros e (5) tratada, após receber cloro e flúor, coletada na entrada da rede de distribuição. Todas as coletas foram realizadas respeitando o tempo de residência de cada etapa do tratamento.

Além disso, em junho de 2011 foram coletadas amostras de água bruta e tratada nas 5 diferentes estações de tratamento de água de Campinas. O objetivo foi avaliar a eficiência de remoção dos contaminantes em cada planta. Amostras dos rios Atibaia e Capivari, foram coletadas nas ETA 3 e 4, e ETA Capivari, respectivamente. Nas ETA 1 e 2 foi possível coletar água tratada da saída de cada uma das plantas, além da mistura delas que sai para a rede de distribuição. Nas ETA 3 e 4 a amostra coletada foi referente a mistura das águas tratadas nas duas plantas. Embora o período tenha sido de estiagem, choveu ~14 mm na noite anterior à coleta, e os mananciais apresentaram um grande volume de material particulado em suspensão.

Este trabalho também abordou, de maneira mais simples, a água consumida por uma pequena parte população oriunda de aquíferos subterrâneos. Algumas coletas ao longo do ano foram realizadas em uma residência no bairro Recanto dos Dourados em Campinas. No local, a água é coletada de um poço de aproximadamente 7 metros de

profundidade e consumida pelos moradores sem nenhum tipo de tratamento. Essa é uma prática comum entre as pessoas que ainda não aderiram ao sistema de distribuição de água oferecido pela SANASA.

Nesta região, a SANASA capta água de poços profundos, adiciona cloro e abastece o reservatório local e as caixas d'água residenciais. Em junho de 2011 foram coletadas amostras de água subterrânea de um dos poços da SANASA, com e sem a adição de cloro, além da amostra do poço residencial no bairro Recanto dos Dourados. O objetivo foi verificar se havia diferenças significativas entre as amostras e inferir sobre a qualidade dos poços daquela região.

Todas as amostras foram coletadas em frascos de vidro âmbar de 1L de capacidade. Antes da coleta, todos os frascos foram ambientados com a própria água a ser coletada. Após a coleta, os frascos contendo as amostras foram selados com papel alumínio, tampados e acondicionados em caixa de isopor para transporte. Durante todo o período de amostragem foram utilizadas luvas nitrílicas limpas para evitar a contaminação das amostras. No laboratório as amostras foram preservadas a 4 °C, em refrigerador, sem adição de conservantes até a realização dos procedimentos de extração dos compostos-alvos que não demorou mais que 24 horas do momento da amostragem.

MÉTODO ANALÍTICO

Devido aos baixos níveis dos compostos-alvos freqüentemente encontrados em matrizes ambientais, alguns procedimentos foram adotados para reduzir a contaminação originada durante as etapas de amostragem, preservação e tratamento da amostra. Desta forma, foram empregados procedimentos fundamentados no uso de técnicas limpas em todas as etapas envolvidas na realização deste trabalho. Os materiais e a vidraria foram lavados com água corrente, detergente e escova. Em seguida, foram enxaguados com água tratada, destilada e água ultrapura (Milli-Q, Millipore), e finalmente submetidos à limpeza final com álcool e acetona. A vidraria não-volumétrica, tais como frascos de coleta, entre outros, foram transferidas para secagem em mufla a 400 °C por 4 h como forma de eliminar resíduos orgânicos. Toda a vidraria volumétrica foi deixada por, 48 h em solução de Extran 10 % (v:v). Durante todo o processo de limpeza, a vidraria foi colocada sobre folhas de papel alumínio.

Após a coleta os analitos foram extraídos de 1L de amostra por SPE, e os extratos foram analisados química e biologicamente. Após a eluição dos analitos da fase extratora, o solvente foi seco em nitrogênio, o resíduo foi ressuspense em uma solução de composição semelhante à fase móvel inicial: H₂O:MeOH 70:30 (v/v) e o extrato foi analisado por LC-MS/MS. Após a análise química, o mesmo extrato foi seco novamente, o resíduo ressuspense em solução de DMSO 1 % e o extrato foi analisado por BLYES. Entre um procedimento e outro, os extratos foram mantidos sob refrigeração ($T \leq 4^{\circ} \text{C}$).

Em algumas campanhas, os compostos deuterados, estradiol-D3 e o bisfenol A-D16, foram utilizados como padrão interno. Estes foram adicionados no extrato da amostra em concentrações equivalentes a 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, o que gerou um sinal semelhante aos padrões de concentrações de 10 ng L^{-1} nas amostras. No entanto, o uso de compostos deuterados como padrão interno não pode ser realizado em todas as campanhas, pois a adição dos compostos deuterados apesar de melhorar as análises químicas, comprometia as análises biológicas mascarando os resultados obtidos.

PREPARO DE AMOSTRAS: EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

Todos os compostos foram extraídos das amostras empregando-se a técnica de extração em fase-sólida. Antes da extração, amostras de água bruta foram filtradas em membranas de microfibras de vidro (Millipore) e em seguida em membranas de acetato de celulose de 0,45 µm de porosidade (Sartorius) para separar a fração operacionalmente definida como dissolvida. Após a filtração, foi extraído 1 L de amostra de água superficial. As amostras de água subterrânea foram extraídas sem a etapa prévia de filtração.

Para as águas tratadas, dois parâmetros do preparo de amostras foram avaliados com detalhes: (i) volume de amostra extraída (1L, 2L ou 4L) e; (ii) necessidade de filtração das amostras em membranas de acetato de celulose de 0,45 µm de porosidade.

Em estudos preliminares, 4 L de amostra de água tratada foram extraída sem a etapa prévia de filtração (Jardim *et al.*, 2011). No entanto, o tempo de extração de aproximadamente 24 horas foi considerado longo e, em alguns casos houve a saturação do cartucho OASIS. A vantagem de se usar um volume grande de amostra está na obtenção de um extrato mais concentrado dos analitos de interesse o que favorece uma diminuição nos limites de quantificação (LQ) do método. Por outro lado, o conhecimento da capacidade dos cartuchos evita perdas por meio da saturação da fase extratora.

A fim de otimizar esta etapa do tratamento da amostra, três volumes de carga foram avaliados (1, 2 e 4 L) bem como, a necessidade de filtração. Para isso, foram coletados 16 L de amostra de água tratada (P3, Mansões Santo Antônio) que foram separadas em quatro alíquotas de 1 L, duas de 2 L e duas alíquotas de 4 L. Para cada volume foi feita a extração com e sem a etapa de filtração. Em volumes de 1 L foi feito também uma amostra com adição dos 16 compostos na concentração de 10 ng L⁻¹ (amostras fortificadas), sendo uma filtrada e a outra não. A Tabela 7 resume o procedimento desse ensaio.

Tabela 7: Resumo do ensaio de otimização do preparo de amostras. Volumes de amostras em dois diferentes tipos de pré tratamento: com e sem a etapa de filtração.

<i>Etapas do tratamento da amostra antes da extração por SPE</i>	
<i>Filtração em membrana</i>	<i>Sem etapa de filtração</i>
4 litros	4 litros
2 litros	2 litros
1 litro	1 litro
1 litro + <i>fortificação</i>	1 litro + <i>fortificação</i>

A extração foi realizada a vácuo empregando-se cartuchos Oasis HLB (*Hydrophilic-lipophilic-balance*) (Waters) contendo 500 mg de fase sólida condicionados com 5 mL de acetonitrila, 5 mL de metanol e 5 mL de água ultrapura.

A escolha deste cartucho se deu devido a sua capacidade de reter compostos lipofílicos e hidrofílicos simultaneamente. Este sorvente é um copolímero com tamanho de poro de 80 Å e tamanho de partícula de 30 µm contendo dois compostos, um polímero lipofílico, de divinilbenzeno, e um polímero hidrofílico, de n-vinilpirrolidina. O monômero lipofílico promove um mecanismo tipo fase reversa para a retenção dos analitos por meio de interações hidrofóbicas, enquanto que o polímero hidrofílico trás propriedades umectantes a fase extratora proporcionando a retenção de compostos polares por interações fortes como as ligações de hidrogênio.

A extração dos analitos foi feita utilizando um sistema *in line* similar ao adotado pela *American Society for Testing and Materials Standards* (ASTM, 2006), desenvolvido no LQA por Sodré *et al.* (2010), para processar volumes elevados de amostra de maneira rápida, contínua e sem riscos de contaminação. Para isso, no sistema foi utilizado apenas tarugos de politetrafluoretileno (Teflon) e conexões de latão e aço inox.

Na Figura 11 é mostrado um esquema representativo do sistema de extração utilizado neste trabalho. As peças de PTFE contém conexões para a afixação dos cartuchos de extração e furos para a passagem de hastes de fixação. Os conjuntos foram montados com o auxílio de hastes, porcas e arruelas. Na extremidade de cada conjunto existem orifícios para o encaixe de roscas NPT (“National Pipe Thread”, norma americana para tubos e conexões rosqueáveis). Nestes orifícios são encaixados adaptadores de latão para afixar o conjunto de extração em linha ao restante do sistema de extração.

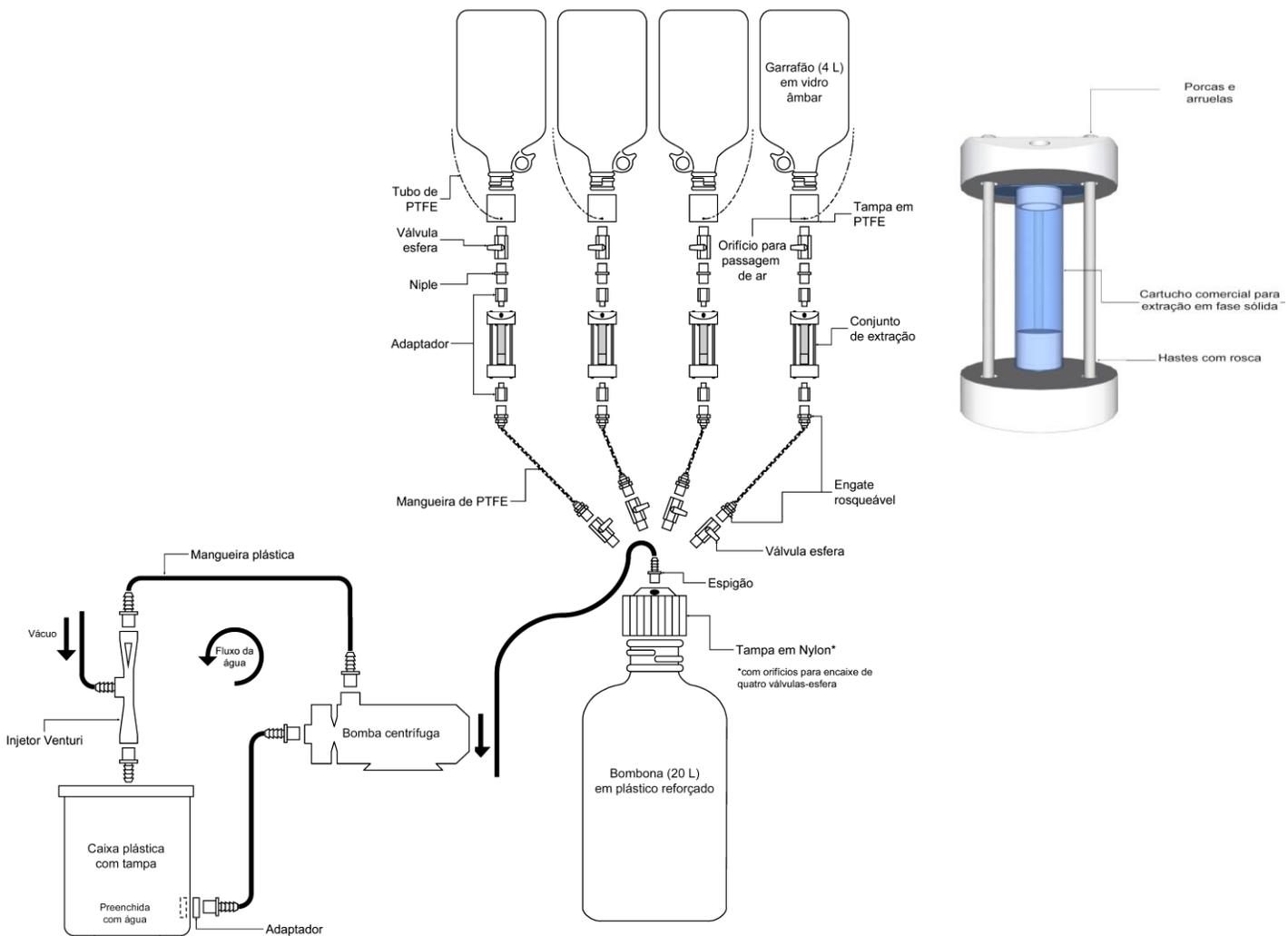


Figura 11: Sistema para extração em fase sólida. À esquerda em detalhes, o sistema de vácuo e, à direita, detalhes da afixação dos cartuchos (Sodré *et al.*, 2010).

A extração foi realizada por meio da passagem da amostra pelo cartucho em um sistema fechado e sob vácuo. O vácuo foi criado com o auxílio de uma bomba centrífuga de ½ CV que bombeia água para o interior de um injetor Venturi. A água empregada para a criação do vácuo foi acondicionada em uma caixa plástica de 18 L de capacidade onde foi recirculada. A parte central do injetor Venturi, mostrado na Figura 11, foi ligado a uma bombona de plástico reforçado para vácuo (Nalgene) com capacidade para armazenar até 20 L de água. A tampa da bombona foi confeccionada em Nylon e possui orifícios para conectar até quatro conjuntos individuais de extração formados por uma série de peças e conexões que interligam um garrafão, contendo a amostra, ao conjunto SPE e à bombona de vácuo. A Figura 12 mostra as fotos do sistema de extração em operação.

Após a extração, a eluição dos compostos foi feita a 5 mL min^{-1} em um *manifold* à vácuo de 12 portas (PrepSep - Fisher Scientific) por meio da adição de 5 mL de metanol e 5 mL de acetonitrila em cada cartucho de extração. Cada eluato foi recolhido em tubo de ensaio com tampa de PTFE. O volume de cada extrato foi reduzido sob fluxo brando de N_2 (White Martins) até cerca de 1 mL. O material restante foi transferido, quantitativamente, para frasco de 2 mL de capacidade munido de tampa com septo (Agilent). O eluato restante foi seco sob N_2 e o volume final foi ajustado para 400 μL por meio da adição da solução de composição semelhante a fase móvel inicial: $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 70:30 (v/v) contendo 0,01 % de NH_4^+ , promovendo assim, uma concentração de 2.500 vezes dos analitos no extrato. Os extratos foram protegidos com papel alumínio, identificados e acondicionados em geladeira ($< 4 \text{ }^\circ\text{C}$) até a análise, que não demorou mais que uma semana depois da extração. Período em que não foi verificado alterações nos extratos das amostras.

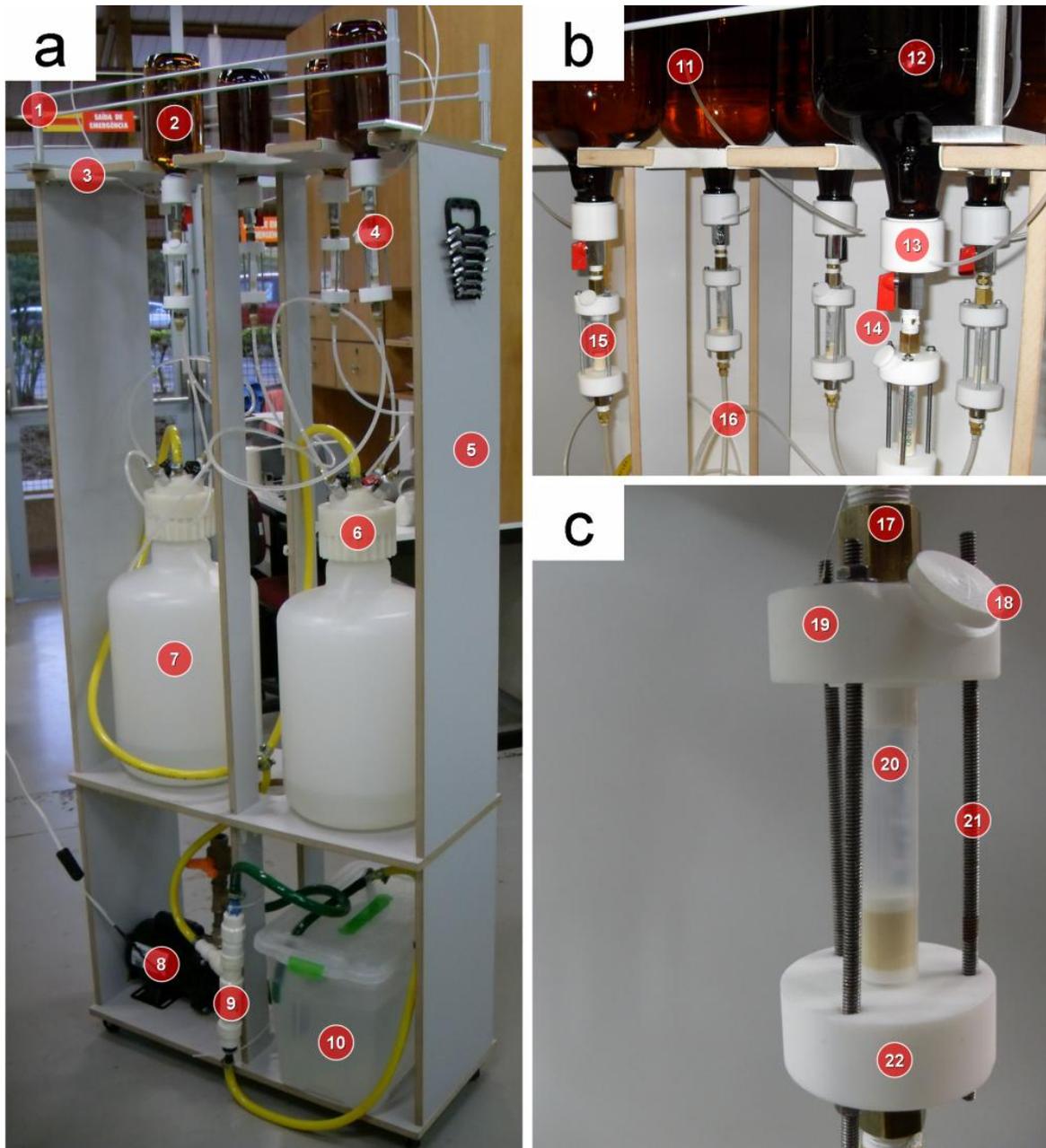


Figura 12: Fotografias do sistema de extração (a), conjuntos individuais de extração (b), módulo contendo o cartucho de extração (c). 1: grade de segurança, 2: frasco de 1 L, 3: suporte para frascos, 4: conjunto de extração, 5: estante, 6: tampa de nylon, 7: bombona, 8: bomba centrífuga, 9: injetor Venturi, 10: Caixa plástica, 11: tubo de PTFE, 12: garrafão de 4 L, 13: tampa em PTFE, 14: válvula-esfera, 15: módulo contendo o cartucho de extração, 16: mangueiras de PTFE, 17: adaptador em latão, 18: tampa, 19: peça em PTFE, 20: cartucho de extração, 21: haste rosqueada, 22: peça em PTFE.

QUANTIFICAÇÃO DOS ANALITOS: LC-MS/MS

A determinação dos contaminantes emergentes foi realizada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem com analisador de massas triplo quadrupolo (QqQ) empregando-se ionização por eletronebulização (ESI, do inglês, *electrospray ionization*) (LC-ESI-MS/MS). Foi utilizado um cromatógrafo Agilent modelo 1200, equipado com bomba binária, injetor automático e compartimento de coluna termostatizado. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna Zorbax SB-C18 (30 x 2,1 mm e tamanho de partícula de 3,5 μm) a 25 °C. A fase móvel foi constituída de água ultrapura e metanol, previamente filtrados em membranas com 0,2 μm de porosidade, contendo 0,01 % (v/v) de NH_4^+ , um aditivo à formação de íons. A composição do gradiente, em função da concentração de metanol, foi a seguinte: início com 30 % e aumento para 100 % em 6 min, composição que foi mantida por 4 min. Entre cada corrida cromatográfica o sistema restabeleceu as condições iniciais e de condicionamento da coluna em 6 min. O tempo total de cada corrida cromatográfica foi de 16 min, a uma vazão de 0,3 mL min^{-1} , incluindo-se o tempo destinado ao condicionamento da coluna.

A identificação e a quantificação dos compostos foram realizadas por espectrometria de massas em um equipamento Agilent com triplo quadrupolo (modelo 6410B) equipado com bomba de vácuo auxiliar operando na célula de colisão (Hot Box). Os analitos foram ionizados em uma fonte de eletronebulização nos modos positivo e negativo. Nitrogênio ultrapuro foi utilizado na célula de colisão e como gás de secagem a uma vazão de 10 L min^{-1} (350 °C). A pressão do nebulizador foi fixada em 35 psi e a voltagem na interface entre o espectrômetro e a fonte de ionização foi fixada em ± 4000 V. A quantificação foi realizada no modo MRM (do inglês, *Multiple Reaction Monitoring*) no qual cada sistema precursor-produto é específico para cada composto.

Soluções estoque (400 mg L^{-1}) dos compostos foram preparadas em metanol a partir da medição exata da massa dos padrões e armazenadas em refrigerador (≤ 4 °C). Soluções de trabalho, obtidas por meio da diluição das soluções estoque, foram

preparadas em metanol e armazenadas em refrigerador por, no máximo, 2 semanas. Durante este período não foram verificadas alterações nos padrões preparados.

A quantificação dos compostos foi realizada por meio da construção de curvas analíticas contendo entre 6 e 10 pontos, onde cada ponto foi preparado pela extração de 1 L de água ultrapura contendo concentrações dos 16 compostos que variaram entre 0,5 e 120 ng L⁻¹. Desta forma, perdas durante a etapa de extração foram assimiladas na quantificação dos analitos. No entanto, não foi possível preparar uma curva para cada tipo de matriz, devido ao alto custo do material e a logística de trabalho, por isso, optou-se pelo preparo da curva em água ultrapura.

As curvas analíticas foram construídas em cada campanha amostral, juntamente com um branco contendo apenas água ultrapura. Além disso, em cada campanha amostral, uma amostra de água tratada e uma de água bruta dos dois mananciais foram utilizadas como controle positivo, nas quais foram adicionados os 16 compostos investigados em concentração igual a 10 ng L⁻¹ antes da etapa de extração.

Uma curva construída pela injeção direta das soluções padrão em metanol também foi obtida em cada campanha e empregada como controle.

ATIVIDADE ESTROGÊNICA: ENSAIO BLYES

O bioensaio utilizado foi desenvolvido por Sanseverino *et al.* (2005) o qual se baseia no emprego de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, que contém o receptor de estrógeno humano (hER) e emite luz quando em contato com compostos estrogênicos.

Os bioensaios foram realizados na CETESB (parceria com o Projeto Temático FAPESP 07/58449-2) utilizando um luminômetro Victor X3 contendo um dispensador de reagentes Flex Drop Plus, ambos da Perkin Elmer.

Para o ensaio de atividade estrogênica, os mesmos extratos das amostras usados para a determinação química foram secos sob fluxo de N₂ e, posteriormente, os analitos foram redissolvidos em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 1 %.

O meio mínimo para o ensaio de YES (YMM) foi preparado pela adição dos itens listados na Tabela 8, com exceção dos aminoácidos, em 1 L de água ultrapura, seguido de autoclavagem a 121 °C por 10 min. Finalmente foram adicionadas as soluções de aminoácidos, previamente autoclavadas a 121 °C por 10 min. A solução de vitamina foi preparada em 500 mL de água ultrapura pela adição dos itens também listados na Tabela 8, sendo posteriormente esterilizada por filtração (0,22 µm) e armazenada em refrigerador.

O preparo de 1 L de meio de crescimento (YMMG) foi feito pela adição de 854,5 mL de meio mínimo, 10 mL de solução de vitamina, 100 mL de solução de glicose 20 %, 25 mL de solução de ácido aspártico (4 g L⁻¹), 8 mL de solução de treonina (24 g L⁻¹) e 2,5 mL de solução de sulfato de cobre (II) (10 g L⁻¹). Em seguida a solução foi esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm de porosidade. Para o meio utilizado em placa, adicionou-se 1,3 g de Agar Nobre por litro de solução do meio YMMG. Para os ensaios, 18 diferentes soluções foram preparadas em placas, com concentrações que variaram entre 2,5 10⁻¹² e 1,0 10⁻⁶ mol L⁻¹ de E2 e 50 µL de cultura.

Tabela 8: Compostos empregados no preparo de 1 L do meio mínimo (YMM) e de 500 mL de solução de vitamina para o bioensaio BLYES.

Composto	Concentração da Solução	Quantidade de solução ou composto	Marca
Preparo de 1 L de meio mínimo (YMM)			
KH ₂ PO ₄	-	13,61 g	Fisher
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	1,98 g	Fisher
KOH (<i>pellets</i>)	-	4,2 g	Fisher
MgSO ₄	-	0,2 g	Sigma
solução de FeSO ₄	0,8 g L ⁻¹	1 mL	-
L- Histidina	10 g L ⁻¹	50 mL	Sigma
adenina	5 g L ⁻¹	10 mL	Sigma
L-arginina	10 g L ⁻¹	2 mL	Sigma
L-metionina	10 g L ⁻¹	2 mL	Sigma
L-tirosina	10 g L ⁻¹	3 mL	Sigma
L-isoleucina	10 g L ⁻¹	3 mL	Fisher
L-fenilalanina	10 g L ⁻¹	2 mL	Sigma
L-ácido glutâmico	50 g L ⁻¹	2 mL	Sigma
L-valina	30 g L ⁻¹	5 mL	Sigma
L-serina	37,5 g L ⁻¹	10 mL	Sigma
Preparo de 500 mL da solução de vitamina			
tiamina		20 mg	Sigma
piridoxina		20 mg	Sigma
ácido Pantotenico		20 mg	Sigma
inositol		100 mg	Fisher
biotina	0,02 g L ⁻¹	50 mL	-

Para o cultivo, as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* BLYES e BLYR (obtidas a partir de culturas congeladas) foram colocadas para crescer em um erlenmeyer de 250 mL contendo 30 mL de meio mínimo. A solução foi mantida sob agitação em shaker a 250 rpm, por cerca de 22 h a 30 °C, até atingir densidade ótica em 600 nm (DO₆₀₀) de 1. Culturas estoque foram preparadas em ampolas de congelamento de 2 mL adicionando-se 50 % de solução de glicerol 40 % e armazenando-as em freezer a -70 °C.

Conforme protocolo descrito por Sanseverino *et al.* (2005), no dia anterior ao ensaio, as linhagens foram descongeladas e rapidamente transferidas para um frasco contendo 30 mL de YMMG. As culturas foram agitadas a 200 rpm e 28 °C por aproximadamente 20 horas, até atingir $DO_{600} \sim 1$. Em seguida, as culturas foram diluídas em volumes apropriados de meio de crescimento para se obter uma solução final com DO_{600} igual a 4. Finalmente, 50 μ L das culturas foram transferidos para os orifícios das micro-placas com auxílio de uma micropipeta.

O controle positivo dos bioensaios foi realizado utilizando-se soluções de 17 β -estradiol em concentrações que variaram entre $2,5 \cdot 10^{-13}$ e $1 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹. Para os compostos puros, foram empregadas soluções padrão de concentrações que variavam de 10^{-14} a 10^{-3} mol L⁻¹. Para os extratos, foram feitas 9 diluições seriadas partindo de uma solução 100 vezes concentrada das amostras. Foram dosados 100 μ L de amostra por poço em microplaca de 96 poços, assim como 100 μ L dos controles negativos (DMSO 1 %) e positivo (E2), conforme Figura 13. Todos os ensaios foram realizados com uma placa contendo a linhagem BLYES (responsiva a estrógeno) e outra placa com a linhagem BLYR (controle de toxicidade). As placas foram então agitadas em vórtex por 20 s e então incubadas a 30 °C. Foi realizada medida de luminescência das microplacas em luminômetro após 2, 3 e 4 h de incubação.

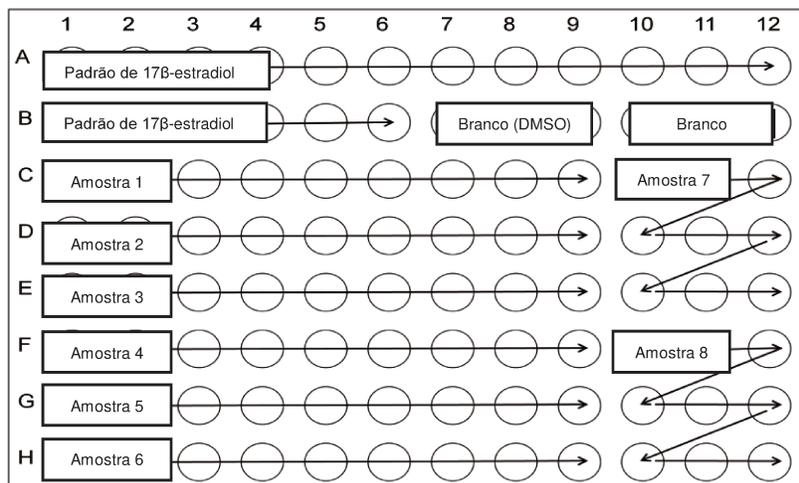


Figura 13. Mapa da microplaca indicando a distribuição dos controles, amostras e padrão de E2 no ensaio BLYES.

A cada dia de ensaio foi escolhido o melhor tempo de incubação, cujos dados foram utilizados. O tempo de incubação escolhido foi aquele onde foi observado maior aumento da luminescência no controle positivo, o que em geral ocorreu com 3 h de incubação.

O critério de positividade para as amostras em termos de atividade estrogênica significativa foi a média da resposta do controle negativo, contendo cultura de leveduras com solução de solvente DMSO 1 %, mais três vezes o desvio padrão ($n = 6$). A concentração efetiva 50 % (CE_{50}) dos compostos foi calculada avaliando-se o ponto médio da porção linear da curva dose resposta, considerando a resposta mínima dos controles negativos (Sanseverino *et al.*, 2009). O limite de detecção (LD) adotado para o método foi a concentração de E2 capaz de provocar efeito igual ao critério de positividade. As leituras de luminescência obtidas com a linhagem BLYES foram corrigidas no caso de existir toxicidade com a linhagem BLYR, desde que a toxicidade desta não fosse maior que 1,5 (razão entre a luminescência de background e a luminescência da amostra). Para estes casos, as medidas foram repetidas em concentrações menores ou desconsideradas.

Foram testadas diferentes diluições de padrões e amostras ambientais, sendo os valores de concentrações expressos em termos de porcentagem da resposta máxima obtida para o controle positivo E2 pela concentração em $ng L^{-1}$. Para as amostras ambientais esta relação foi corrigida pelo seu fator de concentração (100 vezes). As curvas dose e resposta foram construídas com dados de medida de luminescência obtidas para diferentes diluições das amostras, sendo normalizadas em termos de porcentagem de resposta máxima de E2.

Para calcular as concentrações dos compostos de interesse em torno da metade da resposta máxima do controle positivo (CE_{50}) foram avaliadas a equivalência das respostas obtidas para cada composto e a resposta obtida para E2, de acordo com a porção linear das curvas dose e resposta para a linhagem BLYES. As potências relativas (*Toxic Equivalent Coefficient* – TEQ) indicam a relação de potência entre um composto puro e o controle positivo E2, e são avaliadas através da relação da CE_{50} de E2 ($EC_{50}E2$) com os valores de CE_{50} para cada composto de acordo com a expressão:

$$TEQ = CE_{50}E2/CE_{50}.$$

Para medir as concentrações equivalentes a 17β-estradiol em cada amostra (ngE2_{equiv.} L⁻¹), as respostas consideradas positivas para diferentes diluições do extrato foram expressos em termos das concentrações de E2 que resultaram em respostas equivalentes, isto é, as concentrações de controle positivo que geram as mesmas respostas que as observadas para as amostras. A avaliação das amostras e padrões analíticos por bioensaios podem classificá-las como estrogênicas, tóxicas ou ainda estrogênicas e tóxicas. A partir dos resultados obtidos com as linhagens responsivas a estrógenos e linhagens de controle de toxicidade é possível concluir sobre a toxicidade e atividade hormonal. O fluxograma ilustrado na Figura 14 apresenta as etapas para se classificar uma amostra quanto à toxicidade e atividade estrogênica.

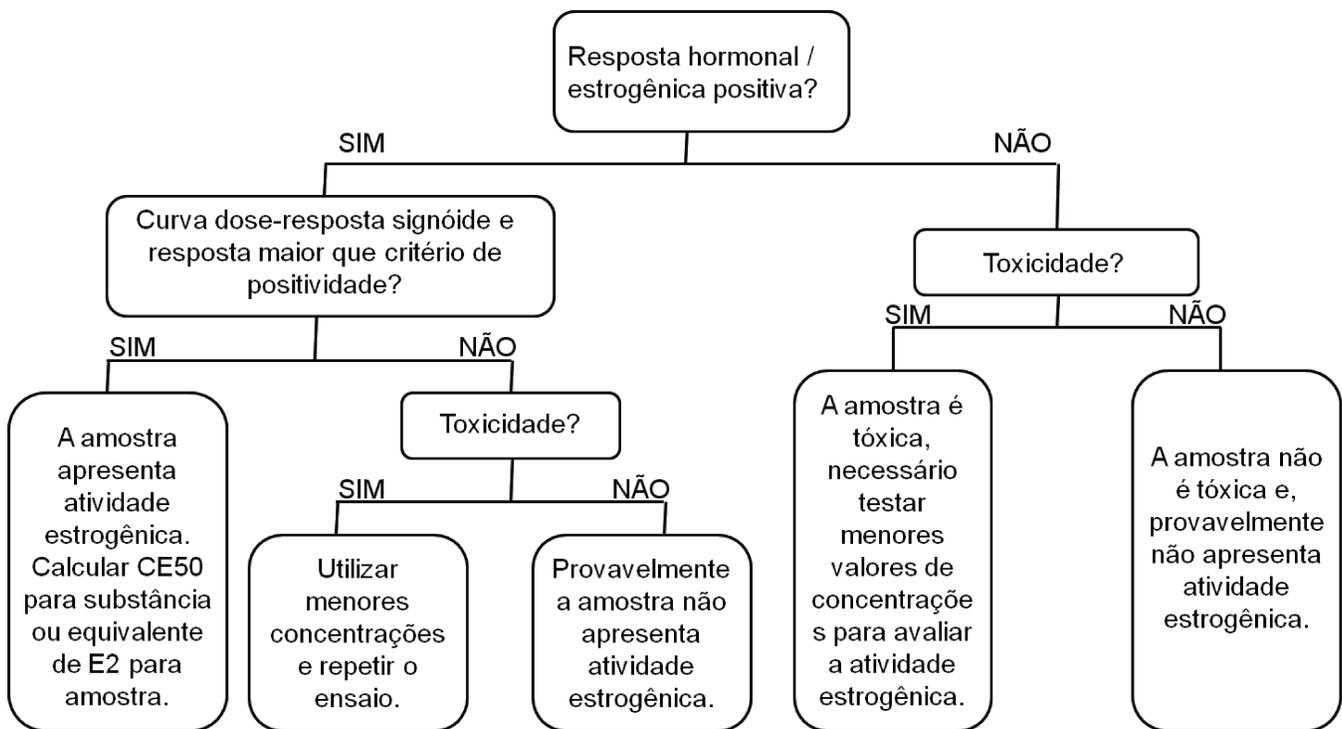


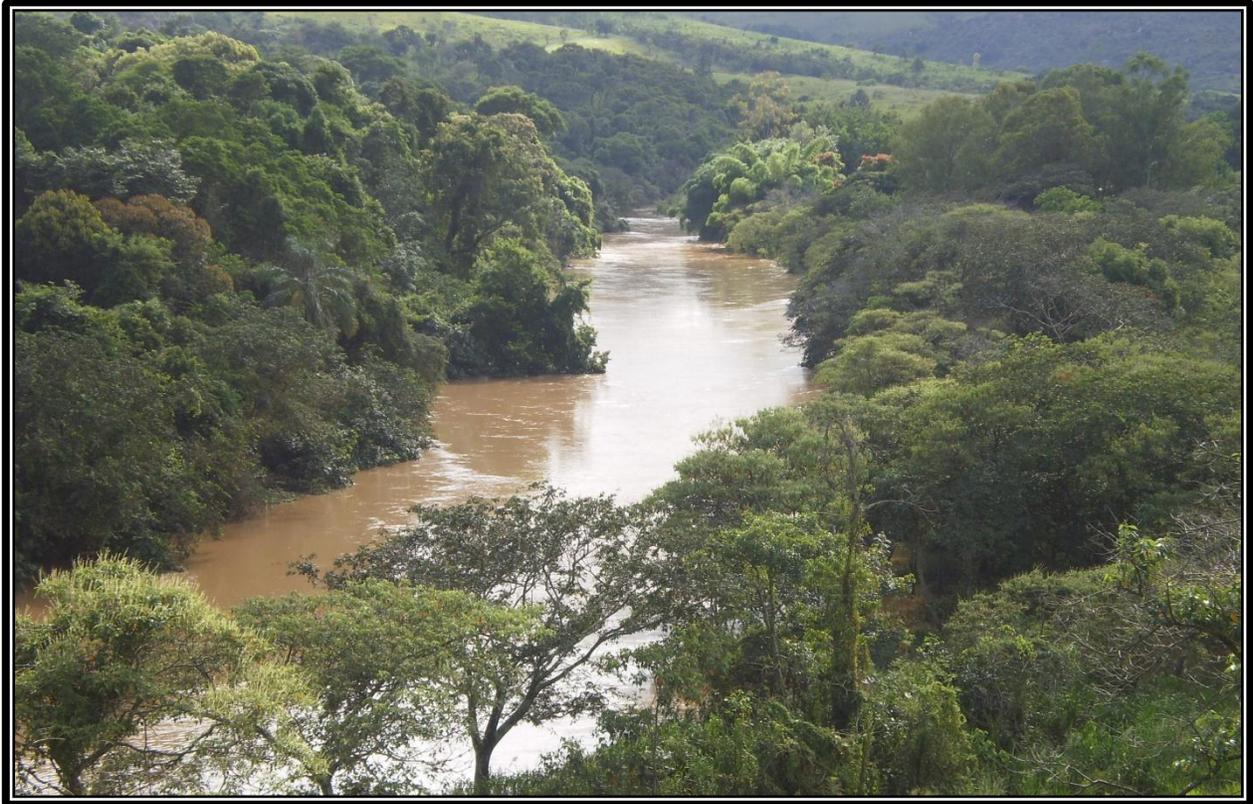
Figura 14: Fluxograma das etapas seguidas na tomada de decisão para determinar se compostos ou amostras ambientais são estrogênicos, tóxicos, estrogênicos e tóxicos, ou ainda, não estrogênicos e não tóxicos.

O potencial estrogênico das amostras ambientais foi calculado a partir das substâncias detectadas por meio das análises químicas, para normalização dos resultados e comparação. Neste caso, a contribuição de diferentes compostos presentes é expressa de acordo com a expressão: $\sum \text{equivalentes E2} = \sum \text{TEQ} \times C.$, sendo a somatória do produto entre as potências relativas (TEQ) de cada composto detectado pela concentração encontrada na amostra (Murk *et al.*, 2002; Salste *et al.*, 2007).

Além disso, foi avaliada a influencia da etapa de extração na atividade estrogênica dos principais compostos E1, E2, E3, EE2 e BPA e ATZ. Embora a atrazina não responda a este bioensaio, a presença dela nesta avaliação teve como objetivo verificar se haveria efeitos antagônicos ou sinérgicos que pudessem ser atribuídos à presença deste contaminante no meio. Para tal, foram extraídos (i) cada um dos seis compostos (10 ng L^{-1}) individualmente em 1 L de água ultrapura; (ii) MIX6 contendo os seis compostos na mesma concentração e; (iii) MIX5 contendo apenas E1, E2, E3, EE2 e BPA (10 ng L^{-1}) sem a atrazina.

Das 13 campanhas amostrais realizadas neste trabalho, amostras de água tratada de 8 campanhas foram analisadas pelo bioensaio BLYES para a avaliação da atividade estrogênica, assim como a maioria das amostras de água bruta, todas as amostras de água subterrânea, os brancos, bem como uma curva analítica extraída, e as amostras coletadas nas estações de tratamento de água.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÕES



Cassiana C.M. Raimundo

Rio Atibaia, janeiro de 2011.

Os resultados deste trabalho de tese consistiram-se (i) na obtenção de um método analítico para a determinação dos 16 compostos abordados empregando LC-ESI-MS/MS, (ii) na otimização do preparo de amostras utilizando SPE e, (iii) na avaliação da qualidade de águas bruta e tratada do município de Campinas.

Foram estudados um perfil sazonal de contaminação da água tratada e seus mananciais, obtido entre 2010 e 2011; um perfil diuturno e um semanal; a influência do aporte do ribeirão Pinheiros na qualidade da água do rio Atibaia; a atividade estrogênica das amostras; a eficiência de uma estação de tratamento de água convencional; a eficiência de remoção dos compostos pelas ETA de Campinas, e a qualidade da água subterrânea usada para abastecimento público em alguns bairros da cidade.

MÉTODOS PARA LC-MS/MS

Para se obter um diagnóstico da presença dos contaminantes emergentes nos corpos aquáticos do mundo todo, as ferramentas analíticas foram se aperfeiçoando, e hoje é possível detectar concentrações de poucos picogramas por litro dos compostos em amostras ambientais complexas. O desenvolvimento das fontes de ionização, principalmente a eletrobulização (ESI) e a ionização química a pressão atmosférica (APCI), permitiu que a espectrometria de massas fosse acoplada ao cromatógrafo líquido e, com isso, houve um grande avanço na determinação de contaminantes orgânicos. A extração em fase sólida, usada como preparo de amostras propiciou ainda a quantificação dos analitos nos níveis de traços.

Durante uma medida por LC-ESI-MS/MS(QqQ), a formação de íons está condicionada à utilização de um aditivo junto à fase móvel, normalmente uma base fraca, um ácido fraco ou uma solução tampão. Desta maneira, a ionização dos analitos é favorecida promovendo a obtenção de espectros de massa altamente informativos, uma vez que estes baseiam-se na contagem de íons. Neste trabalho, dois tipos de aditivos, ácido fórmico (HCOO^-) e íons amônio (NH_4^+), foram testados para a formação de massas com cargas positiva e negativa, respectivamente.

Na Figura 15 estão mostrados os cromatogramas para o bisfenol A ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) obtidos nos modos de ionização positivo e negativo e formados pela somatória dos íons gerados empregando-se os dois diferentes aditivos de fase móvel. É possível observar que a utilização de ambos os aditivos promoveu o aparecimento de íons. Entretanto, existem duas diferenças essenciais entre os picos atribuídos ao BPA. A primeira é a maior intensidade do pico atribuído à ionização positiva, como consequência da maior quantidade de íons positivos formados, conforme é mostrado no espectro de massas. A segunda diferença está diretamente associada à quantidade elevada de íons formados no modo positivo de ionização o que promove uma diminuição da relação sinal/ruído.

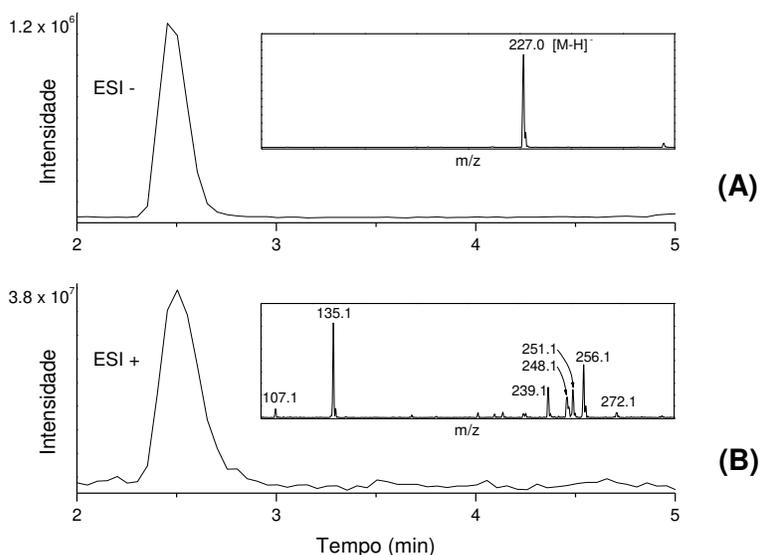


Figura 15: Cromatogramas obtidos para o bisfenol A ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) no modo SCAN empregando-se ionização por eletronebulização nos modos negativo (A) e positivo (B). Espectros de massa são relativos ao pico cromatográfico do BPA.

Na espectrometria de massas é comum a formação de íons protonados ($[M+H]^+$) ou desprotonados ($[M-H]^-$) para um determinado composto. No caso do BPA, que possui massa de 228 g mol^{-1} , é esperada a presença de íons com relação massa/carga (m/z) de 229 durante a ionização positiva e com m/z de 227 para a ionização negativa. Observa-se nos espectros de massas da Figura 15 que apenas o íon com m/z 227 foi formado no modo negativo apresentando uma linha de base bastante definida, uma vez que o único íon atribuído a este composto é formado pela espécie desprotonada. O espectro de massas obtido no modo positivo não apresentou o íon protonado (m/z 229) dentre os íons mais intensos. Na verdade, é possível observar íons com m/z superiores a 229 evidenciando a formação de adutos. Por exemplo, o íon com m/z 251 é atribuído ao $[M+Na]^+$, enquanto que os íons 256 e 272 podem surgir à partir dos adutos $[M+CO]^+$ e $[M+CO_2]^+$, respectivamente. O íon mais intenso é formado por $[M-C_6H_5OH]^+$ com m/z de 135.

A formação de adutos, principalmente com íons sódio, também ocorreu com outros compostos investigados neste trabalho, principalmente os estrógenos e os xenoestrogênios, com exceção da atrazina. Para a PROG, TTN, MEE, NGT, ATZ e CAF

a ionização positiva forneceu íons protonados mais intensos. No entanto, para a determinação simultânea, o aditivo empregado na fase móvel para todas as medidas foi o NH_4^+ , o qual forneceu melhor ionização para a maioria dos compostos. Além disso, alguns deles, como a atrazina e a fenolftaleína foram incorporados ao método posteriormente e, então, os parâmetros do método foram apenas avaliados com relação aos novos compostos para verificação da possibilidade de inseri-los na análise simultânea dos demais contaminantes. Os íons precursores para cada composto estudado neste trabalho, ou seja, aqueles íons que apresentam as maiores intensidades nos espectros de massas dos compostos estão mostrados na Tabela 9.

No LC-MS/MS os íons formados são guiados no interior do equipamento por meio de um campo elétrico formado em um octapolo posicionado ortogonalmente à fonte de ionização. Em seguida, os íons passam por uma segunda fonte de potencial RF utilizada para a transmissão de íons de elevada massa. Nos equipamentos da Agilent, há nesta segunda fonte, uma energia acessória denominada “*fragmentor*” a qual é aplicada para otimizar a transmissão e a fragmentação dos compostos. Em geral, quanto maior for o *fragmentor* maior também será a fragmentação. Por outro lado, os compostos que não são prontamente fragmentados são transmitidos de maneira mais eficiente sob valores elevados de *fragmentor*. Por este motivo, a energia de *fragmentor* ideal para um composto depende da avaliação de diferentes potenciais aplicados. Os valores de *fragmentor* para os compostos investigados estão mostrados na Tabela 9.

Após obter a energia do *fragmentor*, foram realizadas algumas injeções visando a obtenção dos parâmetros de um método empregando-se o modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) (Figura 16). Resumidamente, o modo MRM visa à obtenção de um ou mais sistemas precursor-produto específicos para cada composto. Baseia-se no monitoramento de íons no modo SIM (*Selected Ion Monitoring*) em cada um dos dois quadropolos (Q1 e Q2). Neste método, o íon precursor de cada composto é monitorado seletivamente em Q1 e, em seguida, sofre fragmentação na célula de colisão (q). Nesta célula, os íons precursores sofrem colisões com moléculas de N_2 sob a aplicação de um potencial. Este potencial aplicado, denominado energia de colisão (EC), favorece a fragmentação do íon precursor e conseqüentemente a formação de íons produto. Os

íons formados na célula de colisão são então monitorados seletivamente em Q2. Cada sistema precursor-produto, formado sob uma energia de colisão única, é empregado para quantificação dos compostos-alvo. A confirmação dos compostos é obtida por meio do monitoramento de outras transições características do sistema precursor-produto, levando à formação de, no mínimo, três pontos de identificação, o que preenche os requerimentos necessários à identificação e confirmação de contaminantes ambientais segundo, por exemplo, as definições da Comunidade Européia (2002/657/EC).

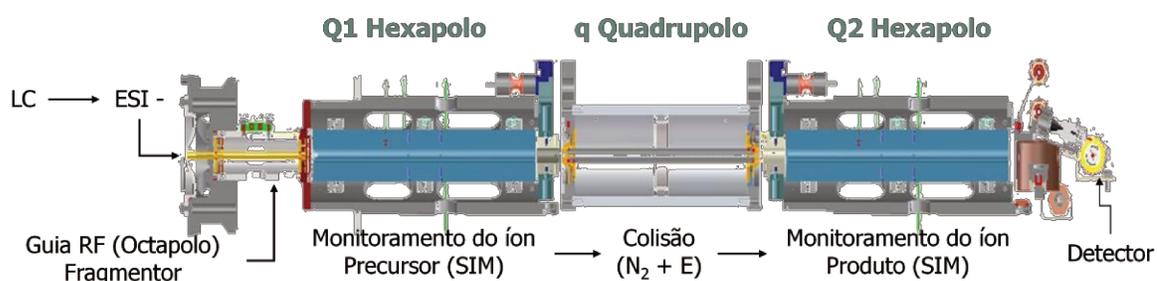


Figura 16: Ilustração de um espectrômetro de massas com triplo quadrupolo e o desenvolvimento de um método no modo MRM (Fonte: *Agilent Technologies*).

Na Figura 17 estão mostrados os espectros de massa obtidos para a estrona (E1) no modo de varredura (SCAN) em Q2. Estes espectros, obtidos sob diferentes energias de colisão, servem como parâmetro para a escolha dos íons produto de E1. É possível observar que, sob uma energia de colisão de 30 V, tem-se um sinal intenso em m/z 144,9 atribuído à forma $[M-C_8H_{12}O]^+$, comum em experimentos realizados por ESI(NI) (Gentili *et al.*, 2002). Outros picos intensos e característicos são observados em m/z 182,9 (35 V), 252,9 (25 V) e 143,0 (40 V). Considerando-se as intensidades dos picos mostrados nos espectros de massa da Figura 17, foi possível selecionar três sistemas precursor produto para a determinação de estrona por MRM. Neste caso, o sistema contendo o íon produto de maior intensidade, ou seja, 269,0→144,9 a 30 V foi utilizado para a quantificação de E1, enquanto que os sistemas 269,0→143,0 a 40 V e 269,0→182,9 a 35 V, foram utilizados para confirmar a presença da estrona.

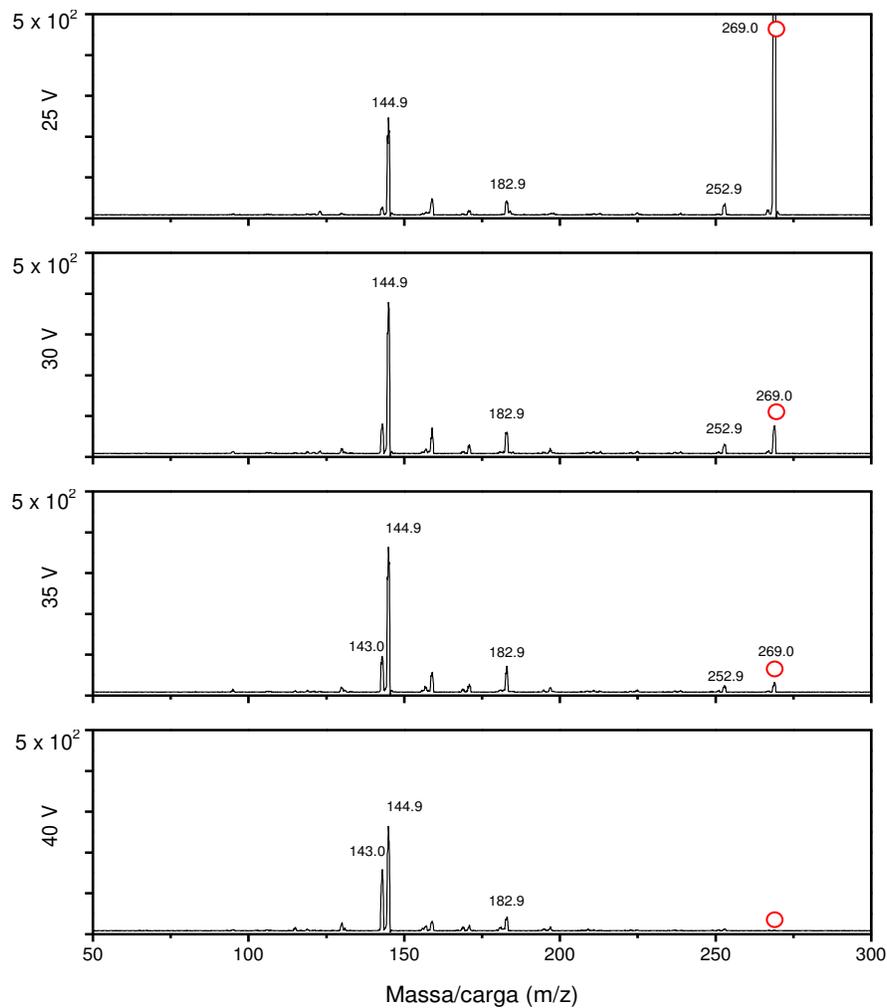


Figura 17: Espectros de massa obtidos para a estrona a partir da aplicação de diferentes energias de colisão sobre íon precursor $[M-H]^-$ (marcado com um círculo).

Todos os 16 compostos investigados foram submetidos à escolha de íons produto apropriados à quantificação e confirmação, estes estão descritos na Tabela 9.

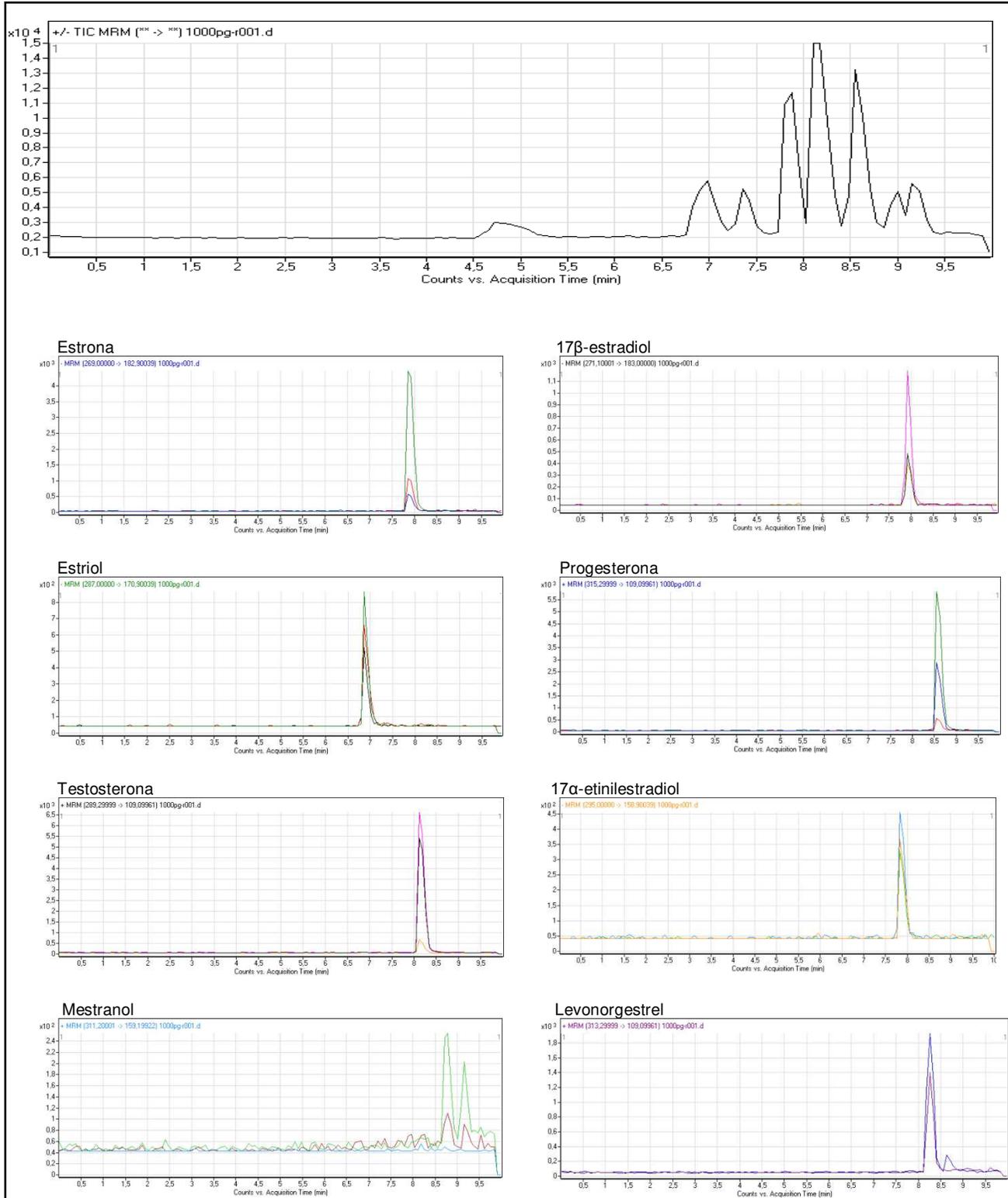
Considerando que a quantificação dos compostos foi realizada no modo MRM, no qual cada sistema precursor-produto é específico de um composto apenas, a separação cromatográfica pôde, até certo ponto, ser conduzida em um tempo mais curto sem que houvesse separação completa dos analitos. Assim, cada análise cromatográfica foi realizada em 16 min. Na Figura 18 estão mostrados um cromatograma típico no modo TIC da determinação dos 16 compostos investigados em uma solução padrão em metanol contendo $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada composto e os

cromatogramas individuais obtidos por MRM empregando as transições precursor-produto específicas para cada um dos compostos.

Tabela 9: Transições precursor-produto e as respectivas energias de colisão (EC) selecionadas para o monitoramento de 16 íons empregando o modo MRM.

Composto	Polaridade	Fragmentor (V)	Precursor (m/z)	Quantificação		Confirmação 1		Confirmação 2	
				m/z	EC (V)	m/z	EC (V)	m/z	EC (V)
E1	-	100	269,1	144,9	30	143,0	40	182,9	35
E2	-	90	271,1	183,0	35	143	40	144,9	30
E3	-	110	287,1	170,9	30	143	40	144,9	35
PROG	+	130	315,3	109,1	15	97,2	25	79,2	30
TTN	+	130	289,3	97,1	20	79,1	30	109,1	25
EE2	-	100	295,1	144,9	30	143,0	40	158,9	30
MEE	+	110	311,2	121,1	20	91,1	30	159,2	50
NGT	+	130	313,3	91,2	60	109,1	20	-	-
DES	-	130	267,2	222,0	30	237,1	25	251,1	15
TCS	-	110	287 / 289	35,1	5	37,1	5	-	-
Phph	-	120	317,1	93,1	5	180,2	20	272,2	15
4n-OP	-	120	205,0	106,0	15	132,0	25	-	-
4n-NP	-	70	219,1	106,0	15	119,0	35	-	-
BPA	-	90	227,1	132,9	25	210,9	30	-	-
ATZ	+	100	216,2	174,1	15	132,1	15	103,9	15
CAF	+	110	195,1	138,1	15	110,1	20	-	-
E2D3	-	100	274,2	185,2	45	145,3	45	242,3	45
BPAD16	-	100	241,3	142,2	20	223,3	20	96,9	20

*m/z \pm 0,1



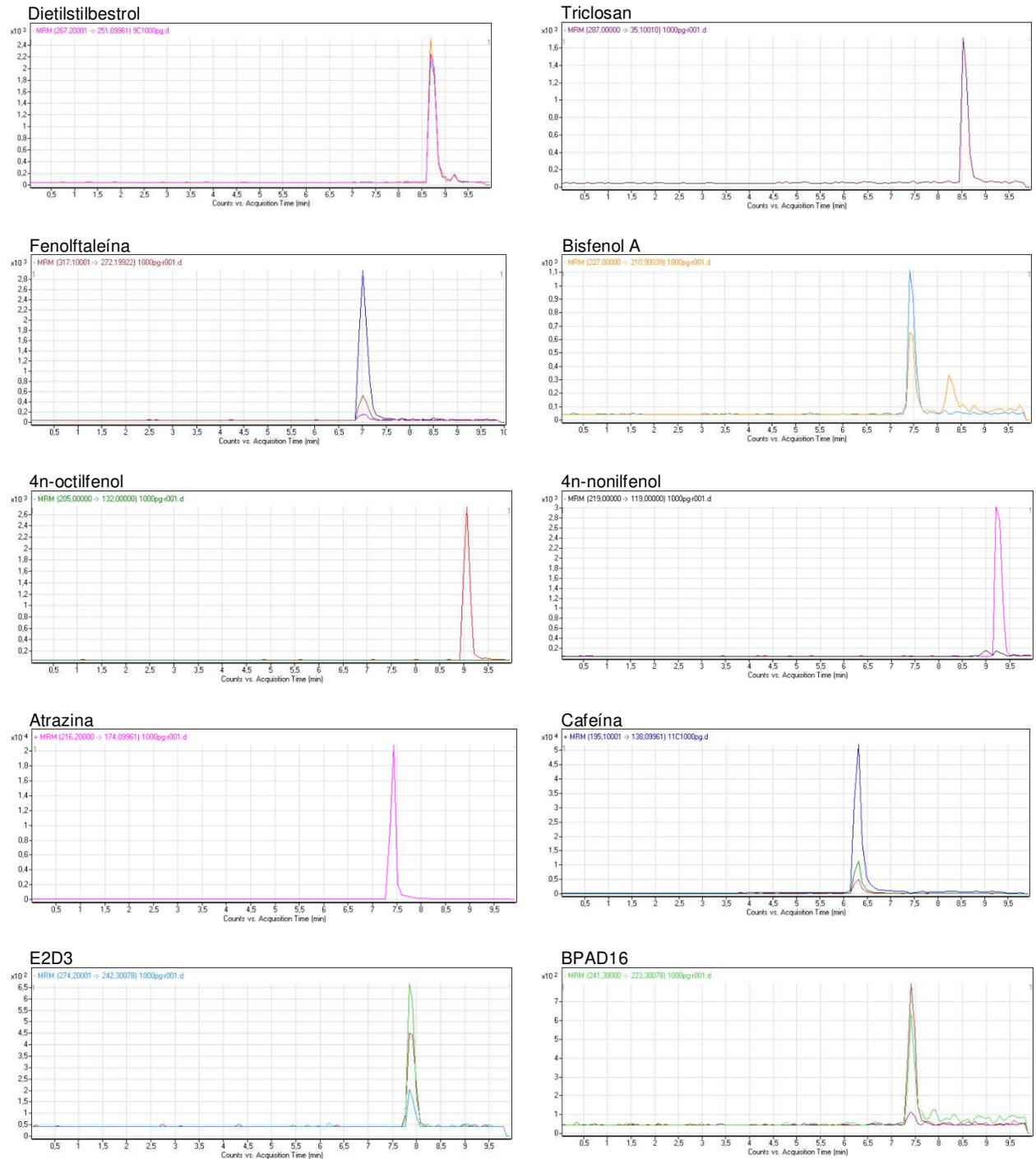


Figura 18: Cromatogramas típicos: modo TIC da determinação dos 16 compostos investigados em uma solução padrão em metanol (massa de 1000 pg na coluna); e os cromatogramas individuais obtidos por MRM para cada um dos compostos.

O cromatograma denominado TIC (*Total Ion Chromatogram*), da Figura 18, representa a somatória de todas as transições monitoradas por MRM, incluindo os sistemas precursor-produto empregados para a quantificação e confirmação dos compostos. O cromatograma apresenta 8 picos, sendo que o primeiro corresponde apenas à cafeína. Nos demais picos, pelo menos dois compostos estão co-eluídos com tempos de retenção bastante próximos. Seis deles apresentam tempos de retenção entre 7,5 e 8,0 min. Entretanto, considerando-se as especificidades das transições precursor-produto, foi possível acessar facilmente e de maneira individual os sinais cromatográficos referentes a cada um dos compostos.

Apesar da seletividade da técnica, alguns interferentes precisaram ser melhor explorados para evitar falsos positivos. Isso aconteceu principalmente com o EE2 e o triclosan. Para o EE2 e o TCS, após a etapa de extração, alguns picos apareceram no cromatograma apresentando inclusive todas as transições específicas do composto. O que os diferenciou do pico original foram o tempo de retenção e a proporção da intensidade de cada transição precursor-produto. Nas Figuras 19 e 20 estão apresentados os cromatogramas de padrões e amostras referentes ao triclosan e ao EE2, respectivamente.

Para a TTN, o tempo de retenção foi a principal diferença entre os picos originais do composto ($t_R = 8$ min) e um interferente falso positivo ($t_R = 5,5$ min). Para o BPA, a transição de confirmação apresentou, em geral, dois picos, um deles com tempo de retenção cerca de 1,5 minutos após o pico referente a transição do composto independente da etapa de extração (Figura 18). Para o mestranol duas das três transições selecionadas apresentaram um pico seguido do pico original do composto (Figura 18). Além disso, os tempos de retenção dos compostos na corrida cromatográfica variaram cerca de 1 min entre as campanhas amostrais. Para evitar erros, as curvas analíticas foram preparadas em cada campanha e injetadas juntamente com as amostras.

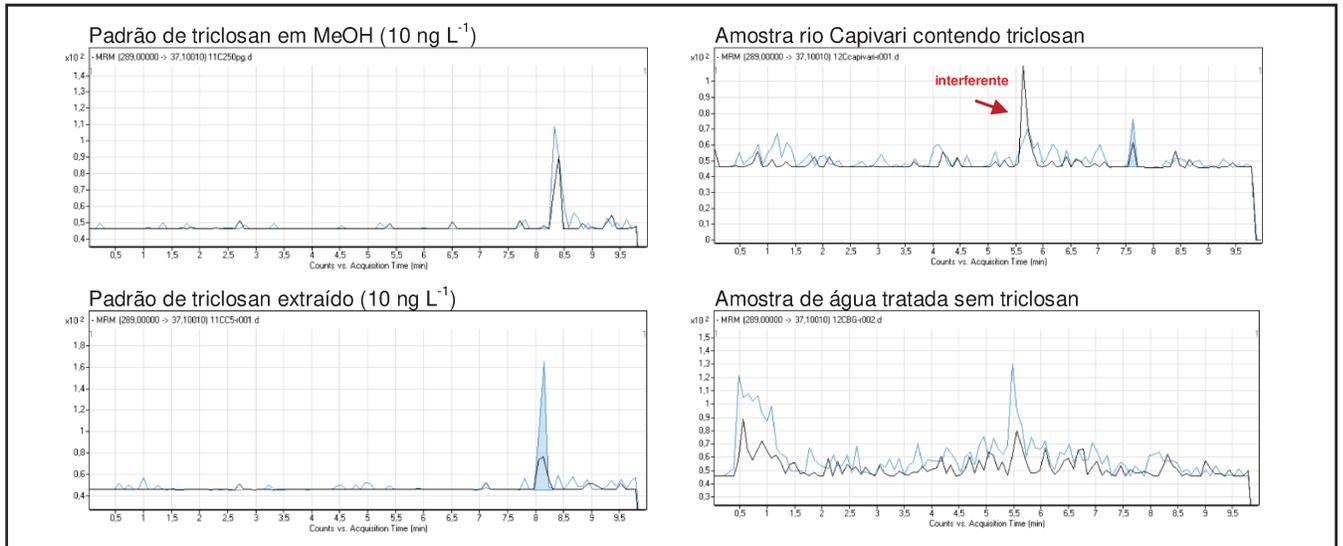


Figura 19: Cromatogramas referente à determinação de triclosan por LC-ESI-MS/MS em padrões no solvente, padrões extraídos, amostra contendo TCS, amostra sem TCS.

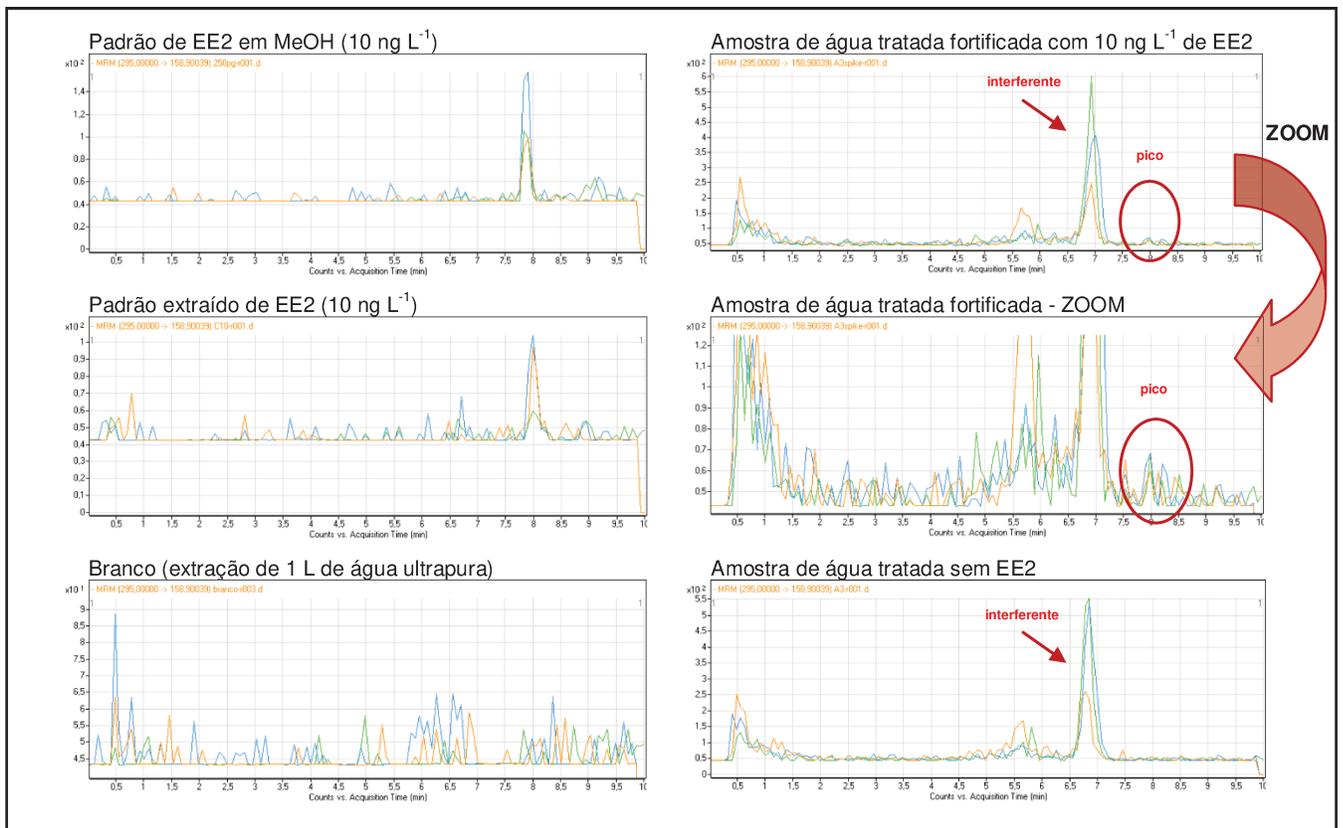


Figura 20: Cromatogramas referente a determinação de EE2 por LC-ESI-MS/MS em padrões no solvente, padrões extraídos, amostra fortificada, amostra sem EE2 e branco extraído.

CURVA ANALÍTICA

Após o desenvolvimento do método no modo MRM, foram construídas curvas analíticas para determinação dos compostos considerando algumas figuras de mérito tais como linearidade, limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) de acordo com Miller e Miller (2005).

O LC-MS/MS possui um injetor automático capaz de injetar de 0,1 a 40 μL de amostra, com uma precisão de 0,1 μL . As curvas analíticas no solvente, usadas como controle, foram construídas com base na variação do volume injetado de padrão no solvente e, conseqüentemente, empregando-se a massa de cada composto injetada na coluna cromatográfica como variável independente. Neste caso, foi possível obter LQ entre 0,8 e 21 ng L^{-1} , obtido por meio da razão entre o desvio padrão da correlação linear e o coeficiente angular da reta multiplicados por 10 e, linearidade das curvas analíticas, expressa por meio do coeficiente de correlação de Pearson (r^2), superiores a 0,8. Porém, as curvas analíticas construídas no solvente não consideram a eficiência de extração, nem a presença de interferentes, e estes dados são importantes quando se trabalha com amostras complexas. Nestes casos, geralmente são feitos testes de recuperação para inferir sobre essas possíveis perdas. A maneira empregada para considerar as perdas na etapa de extração foi construir curvas com a extração de diferentes alíquotas de 1 litro de água ultrapura contendo concentrações dos analitos que variaram entre 0,5 e 120 ng L^{-1} . Foram preparados, no mínimo 6 pontos, das chamadas “amostras branco fortificadas”, de acordo com as normas da Comunidade Européia, as quais foram analisadas em triplicata e os parâmetros estão apresentados na Tabela 10 onde também está apresentada a correlação entre os dois tipos de curvas analíticas (*curva dos padrões no solvente e curva das amostras branco fortificada*).

Na Tabela 10 os valores obtidos de LD e LQ encontram-se corrigidos em função do fator de concentração de 2500 vezes (de 1 L de amostra para 400 μL no extrato), empregado para a determinação dos contaminantes nas amostras de água bruta e tratada.

Tabela 10: Faixa linear, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e linearidade para a curva das amostras branco fortificadas; LQ para a curva preparada com os padrões no solvente e coeficiente de correlação entre as duas curvas obtidos para a determinação dos 16 compostos por LC-MS/MS.

Composto	Curva das amostras branco fortificadas				Curva no solvente LQ (ng L⁻¹)	Correlação entre as duas curvas (r²)
	Faixa linear (ng L⁻¹)	LD (ng L⁻¹)	LQ (ng L⁻¹)	Linearidade (r²)		
E1	0,8 - 10	0,8	2,6	0,9745	1,4	0,9805
E2	1,8 - 10	1,8	5,9	0,8841	0,8	0,9873
E3	0,3 - 60	0,3	0,8	0,9834	2,2	0,9901
PROG	0,8 - 10	0,8	2,7	0,9828	1,8	0,9805
TTN	0,5 - 20	0,5	1,7	0,9933	2,8	0,9220
EE2	4,2 - 80	4,2	13,9	0,9768	5,3	0,9954
MEE	2,6 - 60	2,6	8,8	0,8780	8,2	0,9387
NGT	0,3 - 40	0,3	0,9	0,9468	4,1	0,8690
DES	1,0 - 40	1,0	3,4	0,8201	1,9	0,7956
TCS	0,2 - 20	0,2	0,7	0,9655	4,7	0,9870
Phph	1,1 - 60	1,1	3,7	0,9967	1,7	0,9579
BPA	0,5 - 40	0,5	1,5	0,9226	7,2	0,9651
4n-OP	3,2 - 40	3,2	10,6	0,9150	2,9	0,9794
4n-NP	1,5 - 20	1,5	5,1	0,8418	2,4	0,9874
ATZ	2,4 - 40	2,4	7,9	0,8601	3,5	0,9341
CAF	4,6 - 120	4,6	15,4	0,8850	21	0,8796

A correlação entre a curva no solvente e a curva preparada com as amostras branco fortificada, expressa pelo (r^2), variou entre 0,7956 para o DES e 0,9954 para o EE2, o que foi considerado adequado nos baixos níveis de concentração empregados neste trabalho, verificando assim a possibilidade de se trabalhar com a construção de curvas analíticas preparadas pela extração dos analitos, onde as perdas no processo de pré-tratamento foram consideradas nos cálculos das concentrações dos contaminantes nas amostras.

As curvas das amostras branco fortificadas foram construídas para cada campanha amostral, e empregada na quantificação dos contaminantes neste trabalho. As curvas preparadas com os padrões em metanol foram construídas periodicamente sendo estas usadas como controle. Um branco usando água ultrapura foi extraído em todas as campanhas para verificar possíveis contaminações durante o tratamento das amostras.

A curva preparada em água ultrapura (usada como branco) não contemplou o efeito de matriz que, nas amostras de água bruta foram caracterizados principalmente pela matéria orgânica em suspensão, e nas amostras de água tratada, pela presença do cloro residual. Neste trabalho, o efeito de matriz foi avaliado com as amostras fortificadas. Em cada campanha uma alíquota de 1 L de amostra de água tratada e dos dois mananciais (rios Atibaia e Capivari) foram fortificadas com 10 ng L^{-1} dos 16 contaminantes, extraídas por SPE e analisadas por LC-MS/MS. A Tabela 11 apresenta a média e a estimativa do desvio padrão da porcentagem de recuperação para as amostras fortificadas.

Tabela 11: Porcentagem de recuperação média e estimativa do desvio padrão para as amostras fortificadas coletadas nas 13 campanhas amostrais ($n = 13$).

Composto	Água tratada	Água bruta
E1	42 ± 37	62 ± 22
E2	65 ± 20	68 ± 12
E3	44 ± 29	71 ± 17
PROG	52 ± 9	59 ± 23
TTN	51 ± 12	72 ± 30
EE2	79 ± 35	58 ± 23
MEE	47 ± 32	33 ± 52
NGT	69 ± 20	73 ± 35
DES	47 ± 30	29 ± 60
TCS	84 ± 12	79 ± 26
Phph	69 ± 22	72 ± 26
BPA	83 ± 22	79 ± 30
4n-OP	57 ± 32	39 ± 43
4n-NP	53 ± 36	35 ± 51
ATZ	89 ± 22	88 ± 32
CAF	-	-

Não houve diferenças significativas nas porcentagens de recuperação para as amostras dos dois mananciais por isso, foram inseridos na mesma estimativa denominada “água bruta”. De maneira geral, as porcentagens de recuperação média, variaram entre 42 e 89 % para as amostras de água tratada e, 33 e 88 % para as amostras de água bruta. Para a cafeína, não foi possível calcular a porcentagem de

recuperação, pois as concentrações basais presentes em todas as amostras excederam em muito os 10 ng L⁻¹ adicionados.

Para alguns compostos, como os hormônios naturais, por exemplo, as porcentagens de recuperação média foram menores para as amostras de água tratada, mas para os alquilfenóis, os menores valores foram obtidos para as amostras de água bruta. Com relação ao desvio padrão, para a maioria dos contaminantes os maiores desvios foram obtidos para as amostras de água bruta, o que pode estar relacionado com a complexidade das amostras e a grande variação de matriz entre os períodos de seca e cheia dos rios.

Para os cálculos das porcentagens de recuperação foram consideradas apenas as amostras em que os contaminantes não estiveram presentes em concentrações acima dos limites de quantificação.

As variações nos resultados obtidos refletem a dificuldade de quantificação desses contaminantes em concentrações próximas aos limites de detecção do método, considerando sub nanogramas por litro. Efeitos supressivos dos sinais também podem provocar diminuições nas concentrações finais dos compostos quando se trabalha com matrizes complexas. No entanto, essa limitação do método é aceitável quando se trabalha com substâncias de diferentes classes e em baixas concentrações.

Assim como os padrões, todas as amostras foram analisadas em triplicata e, o teste Q estatístico foi empregado para excluir um resultado atribuído a erros não aleatórios.

AMOSTRAGEM, PERFIL DIUTURNO E SEMANAL

Durante todo o trabalho a amostragem foi do tipo pontual, ou seja, uma alíquota de 1 L foi coletada em cada ponto, em geral, no mesmo dia e no período da manhã, e esta foi usada para representar a qualidade da água, tratada ou do manancial, naquela campanha. Uma amostragem do tipo composta foi realizada para verificar se haveria diferenças significativas no tipo de amostragem realizada para água tratada. Para isso, coletaram-se duas amostras pontuais às 9 h da manhã em dois dias consecutivos, e outra composta do mesmo ponto de água tratada (P3). Para a amostra composta foram coletadas alíquotas de 450 mL a cada 3 horas durante o período de um dia totalizando 4 L de amostra. A determinação da amostra composta foi realizada em duplicata e os resultados foram comparados com aqueles das amostras pontuais.

Nestas amostras foram determinados atrazina e cafeína. As concentrações de atrazina não variaram significativamente entre as amostras e estiveram entre 4,8 e 6,7 ng L⁻¹. A concentração de cafeína foi maior na amostra composta (171 ng L⁻¹), enquanto que nas duas amostras pontuais as concentrações foram de 74 e 85 ng L⁻¹. No entanto é difícil associar o aumento na concentração da amostra composta com variações na qualidade dos mananciais, provocadas pelo aporte de esgoto doméstico e, conseqüentemente na qualidade da água que é servida a população ao longo do dia. Apesar das coletas terem sido realizadas nos cavaletes externos das residências, não se pode estimar o tempo de residência destas nos reservatórios de distribuição, pois estes são diferentes e projetados para atender demandas específicas em cada região da cidade. Apesar de amostras compostas serem mais representativas, neste trabalho optou-se pela amostragem pontual com todas as amostras coletadas no mesmo período do dia, a qual foi considerada satisfatória para o tipo de estudo realizado.

Para avaliar se haveria diferenças significativas nas concentrações dos compostos investigados nos mananciais ao longo de um dia e de uma semana, foram realizados os ensaios de perfil diuturno e semanal, respectivamente. As amostras foram coletadas no rio Atibaia, no final do período de estiagem, o que caracteriza um dos piores cenários

de contaminação devido ao grande aporte de esgoto e a baixa vazão dos rios neste período. Na Tabela 12 estão apresentadas as concentrações dos compostos nas amostras coletadas e as respectivas estimativas de desvios padrões (triplicata). Dos 16 compostos investigados, sete deles foram monitorados pelo ensaio (estrona, estriol, testosterona, bisfenol A, triclosan, atrazina e cafeína). Na Figura 21 é possível observar as variações nas concentrações dos compostos determinados ao longo de um dia e de uma semana.

Tabela 12: Concentração (ng L^{-1}) e estimativa do desvio padrão dos 7 contaminantes investigados, determinados nos ensaios de perfil diuturno e semanal no rio Atibaia. Os demais compostos apresentaram concentrações abaixo dos limites de detecção.

<i>Perfil diuturno</i>	<i>Concentração nas amostras (ng/L)</i>						
	<i>E1</i>	<i>E3</i>	<i>TTN</i>	<i>BPA</i>	<i>TCS</i>	<i>ATZ</i>	<i>CAF</i>
A1 (13h)	6,1 ± 1,1	3,3 ± 1,4	1,2 ± 0,1	11 ± 1,9	28 ± 7,0	3,8 ± 0,7	4.314 ± 731
A2 (17h)	6,5 ± 2,2	5,6 ± 1,4	1,4 ± 0,1	7,5 ± 3,2	33 ± 4,2	4,0 ± 0,8	3.072 ± 132
A3 (21h)	4,5 ± 1,8	5,9 ± 1,7	1,3 ± 0,1	5,4 ± 2,5	24 ± 5,1	3,3 ± 0,2	5.650 ± 610
A4 (01h)	3,4 ± 2,5	6,1 ± 2,7	1,3 ± 0,1	3,9 ± 2,7	25 ± 7,5	3,3 ± 0,5	3.861 ± 265
A5 (05h)	4,4 ± 0,9	5,1 ± 2,2	1,4 ± 0,1	7,3 ± 2,4	35 ± 8,0	3,8 ± 0,4	3.968 ± 267
A6 (09h)	4,2 ± 1,1	4,9 ± 3,5	1,5 ± 0,1	1,8 ± 1,8	34 ± 4,9	3,8 ± 0,8	5.291 ± 174
A7 (13h)	5,6 ± 1,7	6,8 ± 1,6	1,3 ± 0,2	6,6 ± 2,8	20 ± 8,3	3,1 ± 1,3	5.028 ± 466
<i>Perfil semanal (coletas às 9 h)</i>							
terça	4,8 ± 2,1	5,3 ± 1,8	1,2 ± 0,1	5,5 ± 1,8	32 ± 1,1	4,8 ± 1,2	4.021 ± 953
quarta	6,4 ± 1,3	4,2 ± 1,6	1,5 ± 0,1	12,0 ± 0,7	23 ± 1,5	4,3 ± 1,5	4.543 ± 382
quinta	3,1 ± 2,6	7,1 ± 3,1	1,5 ± 0,4	10 ± 0,8	26 ± 2,0	3,9 ± 1,4	3.153 ± 996
sexta	5,2 ± 1,7	5,3 ± 2,2	1,5 ± 0,1	12 ± 1,7	28 ± 2,5	3,7 ± 1,2	4.110 ± 354
sábado	5,6 ± 1,5	5,7 ± 2,1	1,3 ± 0,1	22 ± 0,6	33 ± 1,7	5,1 ± 2,2	4.580 ± 216
domingo	5 ± 1,3	4,4 ± 2,2	1,3 ± 0,1	9,6 ± 1,2	30 ± 2,0	14 ± 1,4	3.632 ± 359
segunda	5,2 ± 1,4	2,8 ± 2,1	1,2 ± 0,1	5,2 ± 1,9	29 ± 2,2	16 ± 2,4	4.537 ± 344

Para a análise dos resultados obtidos no perfil diuturno, o teste estatístico ANOVA foi aplicado, o que indicou que não houve variações significativas das concentrações dos contaminantes nas amostras coletadas ao longo do dia, com exceção para a cafeína e o bisfenol A. Os valores de F calculados para cada composto

se apresentaram inferiores ao F tabelado com grau de confiança de 95 % (8,94 para conjuntos de sete amostras analisadas em triplicata).

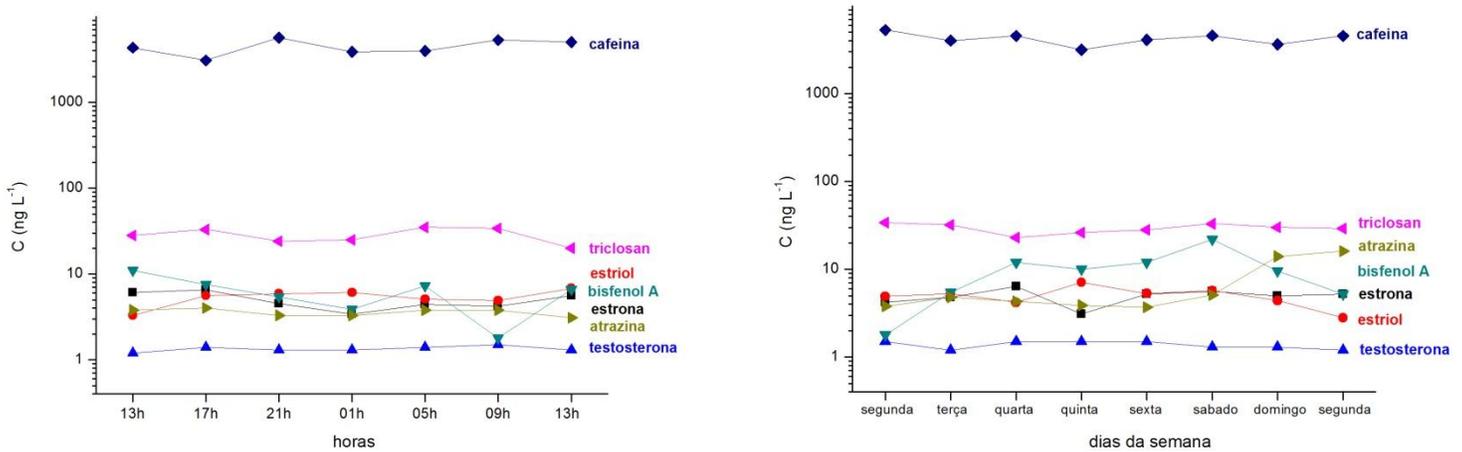


Figura 21: Concentrações em escala logarítmica dos sete compostos determinados pelos perfis diuturno (esquerda) e semanal (direita) realizados no rio Atibaia ao lado da estação de captação de água da SANASA em setembro de 2010.

Para o perfil semanal, o teste ANOVA apontou diferenças entre as médias das amostras coletadas ao longo da semana, com exceção da TTN. No entanto, essas diferenças foram consideradas pequenas para a maioria dos compostos. Para o BPA, observou-se um aumento na concentração obtida no sábado de quase duas vezes. Para a atrazina, os maiores valores foram determinados no domingo e na segunda feira.

A cafeína, utilizada como um traçador de contaminação antrópica, foi determinada em todas as amostras analisadas neste trabalho. Durante o ensaio diuturno, observou-se uma diminuição na sua concentração no período noturno e, durante a semana, as concentrações variaram significativamente (entre 3,1 e 4,6 $\mu\text{g L}^{-1}$), porém não houve uma tendência na variação deste composto, o que pode indicar um aporte constante de esgoto neste corpo d'água.

O perfil diuturno também indicou que a amostragem pontual, empregada nesse trabalho, não afetaria a resposta obtida. Ainda assim, todas as amostras foram coletadas no período da manhã, entre 9 e 12 horas.

PREPARO DE AMOSTRAS

O pré tratamento das amostras consistiu basicamente na filtração em membranas (0,45 μm) e extração dos analitos por SPE. Os cartuchos OASIS HLB (500 mg, 6 mL) empregados como fase extratora possui capacidade para extração de 1 L de amostra. No entanto, volumes maiores podem ser extraídos dependendo das características da matriz.

Para água superficial, a etapa de filtração foi fundamental devido à grande quantidade de material particulado presente na amostra, principalmente nos períodos de cheia dos mananciais. Nesta época, a alta vazão dos rios, aliada a fortes chuvas, provocam muitas zonas de mistura entre a coluna d'água e o sedimento e, além disso, há um aumento da lixiviação dos solos, intensificada em regiões onde a mata ciliar já está degradada. Em algumas campanhas no período de cheia, amostras do rio Capivari precisaram ser filtradas, primeiramente em filtros de papel antes de serem filtradas em membranas de fibra de vidro e acetato de celulose. A decantação também foi um dos procedimentos empregados para minimizar as dificuldades de filtração em algumas amostras.

Para água tratada, o preparo de amostras foi otimizado quanto ao volume de extração e a necessidade de filtração. Na Figura 22 estão mostradas as concentrações de cafeína (ng L^{-1}) para os diferentes volumes de amostra. Os resultados à esquerda, referem às amostras extraídas sem a etapa de filtração e, os resultados à direita, as amostras filtradas em membrana de acetato de celulose 0,45 μm de porosidade antes de serem extraídas por SPE.

As análises, feitas em triplicatas, mostraram que houve uma correlação com o volume de amostra e a concentração dos analitos no extrato, comprovando que é possível obter fatores de concentração mais altos extraindo maiores volumes de amostras, porém esta correlação não se mostrou proporcional a concentração do analito, o que endossa uma tendência de saturação da fase extratora.

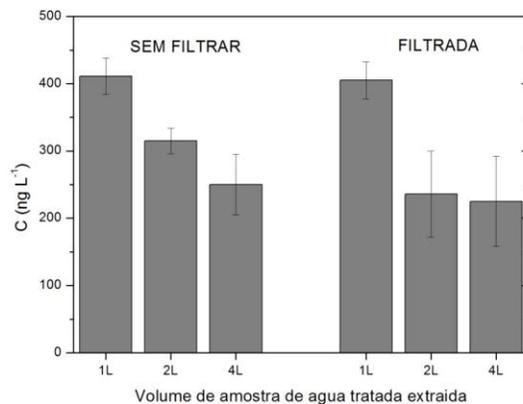


Figura 22: Concentrações (ng L^{-1}) de cafeína para a mesma amostra de água tratada (P3) determinadas com 3 diferentes alíquotas (1L, 2L e 4L). À esquerda, as amostras foram extraídas sem a etapa de filtração e; à direita, as amostras foram extraídas após a etapa de filtração em membrana ($0,45 \mu\text{m}$).

Nessa amostra de água tratada (P3) foram determinados triclosan, atrazina e cafeína. O teste t estatístico foi aplicado para os três contaminantes e, verificou-se com 95 % de confiança que a hipótese nula não era aplicada, ou seja, houve diferença significativa entre as médias obtidas de TCS, ATZ e CAF para os diferentes volumes extraídos.

Com relação à etapa de filtração, embora as amostras filtradas tenham sido extraídas em um tempo menor, devido a diminuição na quantidade de material particulado, as concentrações dos analitos no extrato foram, de maneira geral, 15 % menores do que aquelas determinadas nas amostras não filtradas. Na Tabela 13 estão apresentadas as porcentagens de recuperação dos 16 compostos abordados obtidas com a extração de 1 L de amostras fortificadas (10 ng L^{-1}), com e sem a etapa de filtração. Para a cafeína não foi possível obter a porcentagem de recuperação com exatidão, pois a concentração desta na amostra analisada ($\sim 400 \text{ ng L}^{-1}$) foi muito maior que aquela adicionada.

O bioensaio de atividade estrogênica foi aplicado aos diferentes extratos obtidos desta amostra e, para nenhum dos volumes foi verificada atividade estrogênica. Os extratos referentes às amostras fortificadas apresentaram estrogenicidade para o ensaio BLYES igual a 1,1 e 1,3 $\text{ngE}_{2\text{equiv}} \text{ L}^{-1}$, para as amostras filtradas e não filtradas

respectivamente. Esses valores, no entanto, não sugerem diferenças significativas entre os dois procedimentos de preparo de amostra.

Tabela 13: Porcentagem de recuperação e estimativa do desvio padrão dos 16 compostos em amostras fortificadas (10 ng L^{-1}) extraídos com e sem a etapa prévia de filtração em membrana de acetato de celulose $0,45 \mu\text{m}$. ($n = 3$)

Composto	% recuperação		Composto	% recuperação	
	Amostra não filtrada	Amostra filtrada		Amostra não filtrada	Amostra filtrada
E1	79 ± 3	67 ± 8	DES	58 ± 12	57 ± 8
E2	78 ± 6	65 ± 5	TCS	88 ± 5	69 ± 8
E3	83 ± 3	62 ± 11	Phph	90 ± 1	71 ± 2
PROG	75 ± 7	71 ± 7	BPA	85 ± 2	62 ± 6
TTN	72 ± 2	57 ± 4	4n-OP	68 ± 2	48 ± 3
EE2	91 ± 13	75 ± 10	4n-NP	69 ± 5	53 ± 9
MEE	69 ± 15	55 ± 17	ATZ	105 ± 2	89 ± 5
NGT	71 ± 14	72 ± 16	CAF	-	-

As porcentagens de recuperação variaram significativamente entre os compostos para a faixa de concentração estudada (10 ng L^{-1}), próxima aos limites de quantificação do método para a maioria dos contaminantes. Os menores valores foram obtidos para as amostras filtradas (48 e 89 %). Para as amostras não filtradas, a recuperação variou entre 68 % e 105 %, com exceção do DEE (58 %) e, esses valores ($> 60 \%$) são considerados satisfatórios quando se trabalha com métodos multiresíduos para análise de traços (Rodil *et al.*, 2009; Grós *et al.*, 2006; Vanderford *et al.*, 2003).

Portanto, a partir dos resultados obtidos nesse ensaio, optou-se por trabalhar com 1 litro de amostra de água tratada, sem a etapa de filtração. No protocolo estabelecido, as amostras foram coletadas no mesmo frasco usado no sistema de extração, o que diminuiu a manipulação e conseqüentemente a contaminação das amostras que foram extraídas imediatamente após a coleta em cerca de 4 horas, tempo considerado adequado a logística de amostragem e tratamento das amostras. As amostras de água subterrânea foram extraídas sem a etapa de filtração e o tempo de extração variou entre 4 e 7 horas para 1 litro de amostra.

ATIVIDADE ESTROGÊNICA DOS COMPOSTOS

Bioensaios estrogênicos e androgênicos *in vitro* baseados em leveduras tem se estabelecido com uma ferramenta rápida para a identificação de substâncias ou amostras com potencial atividade estrogênica. Um interferente endócrino pode agir de diversas maneiras e comprometer a saúde, principalmente o desenvolvimento e o sistema reprodutor. A linhagem de levedura usada neste trabalho que utiliza uma proteína de receptor humano e elementos de resposta para ativar a transcrição do gene repórter, não é capaz de identificar um interferente endócrino específico, uma vez que as leveduras não possuem sistema endócrino. Por isso, estudos *in vivo* se fazem necessários para elucidar, em detalhes, os efeitos provocados por compostos interferentes endócrinos no organismo. Ainda assim, os ensaios de BLYES têm sido usados como uma ferramenta de *screening* inicial para a determinação da atividade estrogênica de um composto ou amostra em diversos trabalhos científicos, principalmente para verificar a remoção da estrogenicidade de uma amostra após algum tratamento específico (Sanseverino *et al.*, 2009).

Os resultados de atividade estrogênica foram obtidos a partir dos gráficos plotados da intensidade de bioluminescência (contagem por segundo) versus concentração (fator de concentração ou concentração molar), utilizando-se o software SigmaPlot®. Para o controle positivo foi calculada a CE₅₀, a partir do ponto médio da parte linear da curva dose-resposta (Figura 23). As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram aumento da luminescência em pelo menos 3 concentrações, de forma a tornar possível a realização de regressão linear. O resultado foi expresso em nanogramas equivalentes de E2 por litro de amostra (ngE2_{equiv} L⁻¹), sendo este o quociente entre o CE₅₀ do E2 e o CE₅₀ da amostra, calculado com base na regressão linear. O LQ para o bioensaio BLYES, obtido pela média das respostas de 10 replicatas do E2, foi de 9 ± 2 ng L⁻¹. Considerando que as amostras foram concentradas 100 vezes, obteve-se, portanto um LQ igual a 0,01 ngE2_{equiv} L⁻¹, o que representou pelo menos 2 ordens de magnitude mais sensível que aqueles LQ obtidos nas análises químicas. Não foi verificada estrogenicidade em nenhum dos brancos analisados.

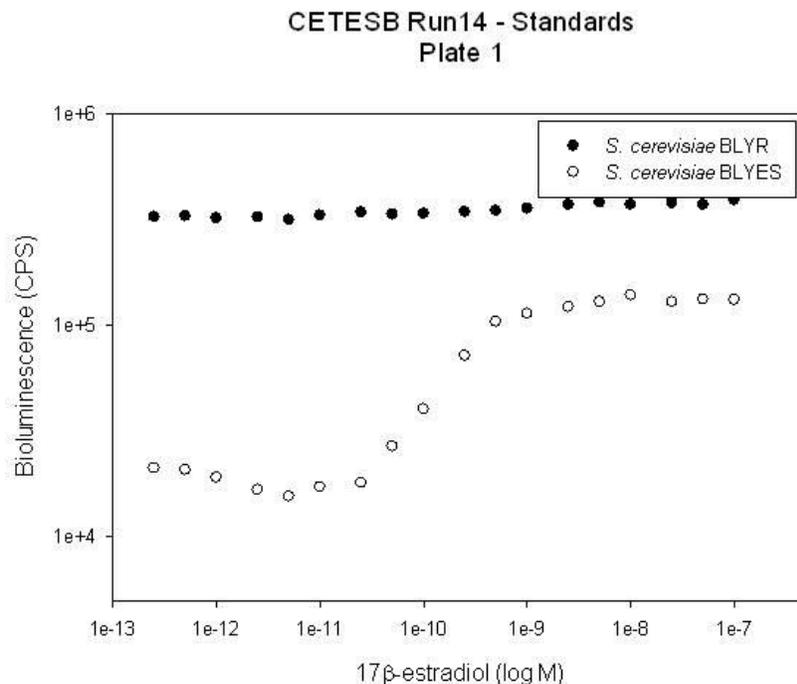


Figura 23: Curva dose-resposta de 17β-estradiol (intensidade de bioluminescência versus concentração molar) disponibilizada pela CETESB, obtida para o ensaio BLYES (atividade estrogênica) e BLYR (toxicidade).

As potências relativas dos compostos E1, E2, E3, EE2, BPA e Phph foram obtidas pelo ensaio BLYES com os padrões utilizados neste trabalho (Tabela 14). Na Tabela 14 também estão reportados os valores obtidos por Sanseverino *et al.* (2009) para esses e outros compostos abordados neste trabalho que não foram testados, cujo potencial estrogênico foi menos relevante, seja pelo valor muito baixo, ou seja, porque os contaminantes não foram detectados em águas brasileiras. Neste caso padrões dos compostos puros foram analisados pelo ensaio de BLYES e a resposta observada esta indicada em termos de potência equivalente de E2.

Os valores de potencial estrogênico obtidos neste trabalho e por Sanseverino *et al.* (2009) foram concordantes para a maioria dos compostos, com exceção para o EE2 que apresentou estrogenicidade 3 vezes menor no ensaio realizado neste trabalho. Na Figura 24 é possível comparar o potencial estrogênico das diferentes substâncias abordadas neste trabalho.

Tabela 14: Potência relativa dos compostos em termos de E2.

Compostos	Atividade estrogênica EC₅₀ (mol L⁻¹)	Potencia relativa TEQ₅₀	Referencias
E2	4,41 x 10 ⁻¹⁰	1	Neste trabalho
	6,3 x 10 ⁻¹⁰	1	Sanseverino <i>et al.</i> , 2009
E1	2,23 x 10 ⁻⁹	1,98 x 10 ⁻¹	Neste trabalho
	6,4 x 10 ⁻⁹	9,84 x 10 ⁻²	Sanseverino <i>et al.</i> , 2009
E3	1,3 x 10 ⁻⁷	3,1 x 10 ⁻³	Neste trabalho
	3,23 x 10 ⁻⁸	1,95 x 10 ⁻²	Sanseverino <i>et al.</i> , 2009
EE2	5,57 x 10 ⁻¹¹	7,9	Neste trabalho
	2,5 x 10 ⁻¹¹	25,2	Sanseverino <i>et al.</i> , 2009
BPA	9,5 x 10 ⁻⁵	4,6 x 10 ⁻⁶	Neste trabalho
	6,2 x 10 ^{-4*}	2,26 x 10 ^{-7*}	Sanseverino <i>et al.</i> , 2009
Phph	1,86 x 10 ⁻³	2,37 x 10 ⁻⁷	Neste trabalho
PROG	2,09 x 10 ^{-4*}	6,7 x 10 ^{-7*}	Sanseverino <i>et al.</i> , 2009
TTN	2,23 x 10 ⁻⁵	2,83 x 10 ⁻⁵	Sanseverino <i>et al.</i> , 2009
MEE	8,08 x 10 ⁻⁹	7,80 x 10 ⁻²	Sanseverino <i>et al.</i> , 2009
DES	6,42 x 10 ⁻¹⁰	9,81 x 10 ⁻¹	Sanseverino <i>et al.</i> , 2009
4n-NP	1,64 x 10 ⁻⁷	3,84 x 10 ⁻³	Sanseverino <i>et al.</i> , 2009
4n-OP		não testado	

(*) Valor obtido para EC₂₀ e TEQ₂₀

Cada substância interage de modo específico ao sítio receptor do bioensaio, a atrazina, por exemplo, é um composto interferente endócrino conhecido, mas não responde ao bioensaio BLYES, ou seja, este mecanismo de ação desenvolvido por Sanseverino *et al.*, (2009) não contempla o modo que a atrazina reage no organismo provocando interferência endócrina. O bioensaio discutido por Gutendorf e Westendorf (2001) e Auriol *et al.*, (2006) usando ensaios de proliferação de células MCF7 (Figura 4), mostra resultados semelhantes para os contaminantes estudados. Os hormônios sintéticos apresentaram maiores estrogenicidades relativas, seguido pelos hormônios naturais e os xenoestrogênios, mesma tendência que pôde ser observada por BLYES.

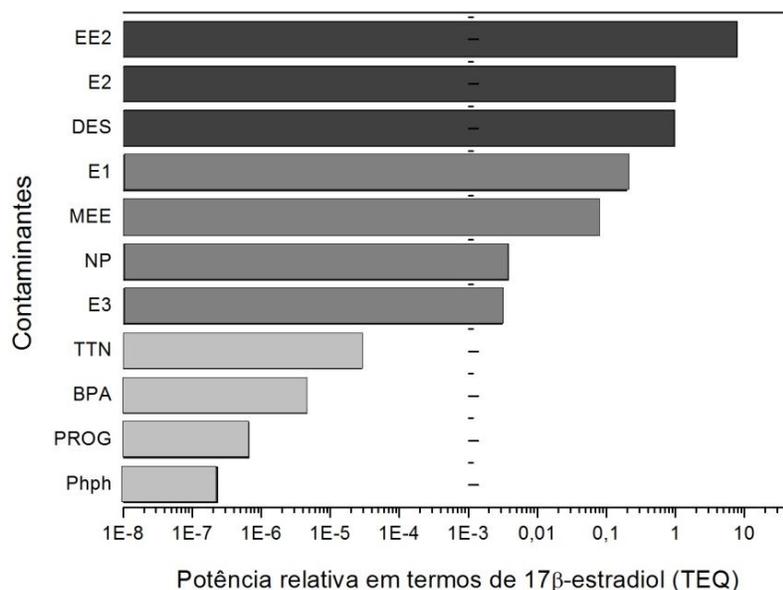


Figura 24: Estrogenicidade relativa dos compostos abordados neste trabalho obtida por ensaio BLYES.

Dentre os 16 contaminantes investigados, o EE2 apresentou a maior potência relativa, sendo cerca de 8 vezes maior que a do estrogênio natural E2. O estrogênio sintético DES apresentou potencial estrogênico semelhante ao E2, o mestranol apresentou potencia relativa próxima a do E1, e o E3 e o NP apresentaram valores da ordem de 0,003 ngE₂_{equiv} L⁻¹. A TTN, BPA, PROG e a Phph foram os compostos que apresentaram os menores valores de atividade estrogênica, sendo aproximadamente 1 milhão de vezes inferior ao E2. Outros contaminantes como o NGT, TCS, ATZ e CAF, não apresentaram estrogenicidade para este ensaio. Além disso, o 4n-octilfenol não foi testado nesses trabalhos.

A atividade estrogênica das amostras branco fortificadas usadas na construção de uma das curvas analíticas foi avaliada para ser apresentada como controle. Estas amostras continham concentrações equivalentes dos 16 compostos que variaram entre 0,5 e 120 ng L⁻¹. Para toda a faixa de trabalho a correlação entre a concentração da amostra branco fortificada e a atividade estrogênica observada, expressa por r^2 , foi de 0,9089 e, para a faixa de trabalho entre 0,5 e 10 ng L⁻¹, utilizada para a quantificação da maioria dos compostos, o r^2 foi de 0,9516 (Figura 25).

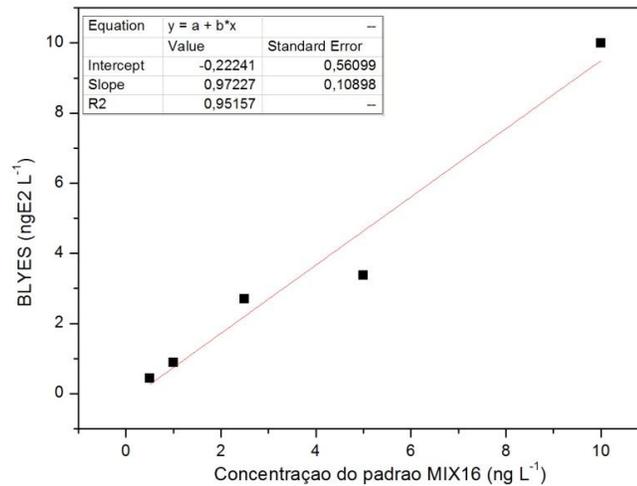


Figura 25: Atividade estrogênica utilizando o ensaio BLYES ($\text{ngE2}_{\text{equiv}} \text{L}^{-1}$) em função das concentrações (ng L^{-1}) das amostras branco fortificadas usadas na construção da curva analítica.

Os resultados obtidos por LC-MS/MS podem ser correlacionados com a resposta observada por BLYES calculando o que seria a “*resposta esperada*” em $\text{ngE2}_{\text{equiv}} \text{L}^{-1}$, com base nas concentrações dos compostos detectados nas análises químicas. Isso é feito multiplicando a concentração determinada do contaminante por sua potência relativa (descrita na Tabela 14). Da somatória desta relação, para todas as substâncias determinadas na amostra, têm-se a *resposta esperada* para o BLYES.

Os valores observados de atividade estrogênica para os diferentes padrões da curva foram próximos das concentrações dos compostos individuais na solução e cerca de 10 vezes menores que a atividade estrogênica esperada, considerando 100 % de recuperação dos compostos na etapa de extração (Tabela 15). No entanto, sabe-se que houve perdas durante a SPE, e para muitos compostos, as menores concentrações dos padrões estiveram abaixo do LQ do método analítico. O bioensaio é uma ferramenta mais sensível capaz de detectar concentrações menores de interferentes endócrinos. Além disso, há efeitos de sinergismo e antagonismo relacionados à presença de vários compostos presentes em um mesmo padrão que devem ser considerados. Para avaliar esses efeitos, os principais contaminantes (E1, E2, E3, EE2, BPA e ATZ) foram extraídos individualmente de 1 L de água ultrapura e em uma solução contendo 5 dos 6

compostos (sem a atrazina, MIX5), e outra contendo todos eles (MIX6) em concentrações de 10 ng L⁻¹ (Tabela 16).

Tabela 15: Atividade estrogênica dos padrões mistos em termos de ngE2_{equiv} L⁻¹ obtida pelo ensaio BLYES e a atividade estrogênica calculada com base nas concentrações dos compostos.

Concentração do padrão MIX 16 (ng L⁻¹)	Atividade estrogênica observada (ngE2_{equiv} L⁻¹)	Atividade estrogênica esperada (ngE2_{equiv} L⁻¹)	Concentração do padrão MIX 16 (ng L⁻¹)	Atividade estrogênica observada (ngE2_{equiv} L⁻¹)	Atividade estrogênica esperada (ngE2_{equiv} L⁻¹)
0,5	0,4	5,1	20	13	203
1,0	0,9	10	40	57	407
2,5	2,7	25	60	65	610
5,0	3,4	51	120	92	1220
10	9,9	102			

Tabela 16: Atividade estrogênica dos padrões individuais e mistos (ngE2_{equiv} L⁻¹), extraídos por SPE de 1 L de água ultrapura, atividade estrogênica esperada; concentração, estimativa do desvio padrão (s) e porcentagem de recuperação dos compostos.

Compostos	Atividade estrogênica observada (ngE2_{equiv} L⁻¹)	Atividade estrogênica esperada (ngE2_{equiv} L⁻¹)	C (ng L⁻¹)	s (ng L⁻¹)	Recuperação média (%)
Padrões individuais					
E1	1,12	1,98	10	1,9	100
E1	1,23	2,04	10,3	2,9	
E2	5,75	8,5	8,5	3,9	65
E2	5,52	4,5	4,5	1,4	
E3	0,02	0,02	6,8	2,7	76
E3	0,03	0,03	8,5	3,2	
EE2	4,39	35	4,4	4,8	62
EE2	175	65	8,1	6	
BPA	< 0,01	4,60 x 10 ⁻⁵	10	0,4	90
BPA	< 0,01	3,73 x 10 ⁻⁵	8,1	2,1	
ATZ	< 0,01	-	7,6	3,1	61
ATZ	< 0,01	-	4,6	0,7	
Padrões mistos (10 ng L⁻¹)					
MIX6	55	36			
MIX6	24	30			
MIX5	98	80			
MIX5	38	41			

Os resultados descritos na Tabela 16 mostraram coerência entre os dados químicos e biológicos, principalmente para os padrões individuais. As variações nos resultados das replicatas foram atribuídas à etapa de extração, uma vez que os valores observados de atividade estrogênica acompanharam a porcentagem de recuperação do método analítico. Além disso, nenhum efeito pode ser atribuído a presença de atrazina nos padrões mistos. A resposta esperada considerando 100 % de recuperação na etapa de extração seria de $91 \text{ ngE2}_{\text{equiv}} \text{ L}^{-1}$. Os valores de resposta esperada calculados com base nas concentrações obtidas por LC-MS/MS variaram entre 30 e $80 \text{ ngE2}_{\text{equiv}} \text{ L}^{-1}$, o que acompanhou a recuperação do EE2 (~ 60 %) que é o estrógeno mais potente dentre os contaminantes estudados.

A atividade estrogênica foi avaliada para aproximadamente 140 amostras, das 220 coletadas neste trabalho, dentre elas, amostras de água bruta e tratada, água subterrânea e, de estações de tratamento de água.

Para as amostras de água bruta de Campinas (rios Atibaia e Capivari), 85 % delas foram avaliadas por BLYES e todas apresentaram resposta positiva para o bioensaio. Os valores de resposta observada em função da potência do E2 variaram entre os dois mananciais e os diferentes períodos do ano, sendo que o menor valor obtido foi igual a $0,06 \text{ ngE2}_{\text{equiv}} \text{ L}^{-1}$ e, o maior de $6,54 \text{ ngE2}_{\text{equiv}} \text{ L}^{-1}$ (Figura 26). Além disso, em uma amostra do rio Atibaia, a resposta observada para o bioensaio foi de $46,9 \text{ ngE2}_{\text{equiv}} \text{ L}^{-1}$, esse resultado foi atribuído a presença de EE2 nesta amostra em concentrações próximas ao limite de detecção do método analítico ($2,4 \text{ ng L}^{-1}$).

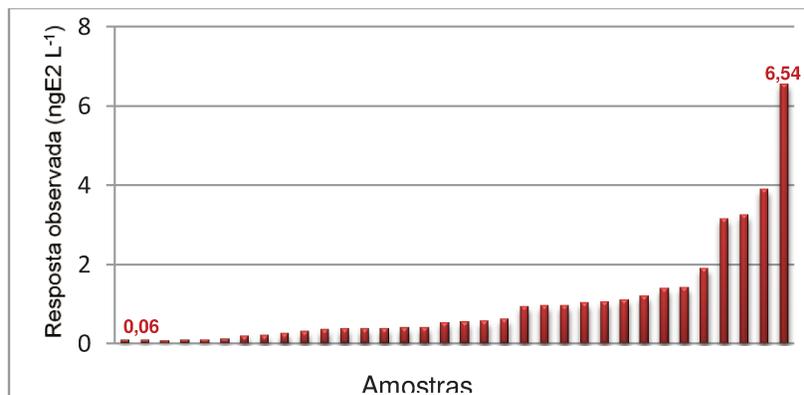
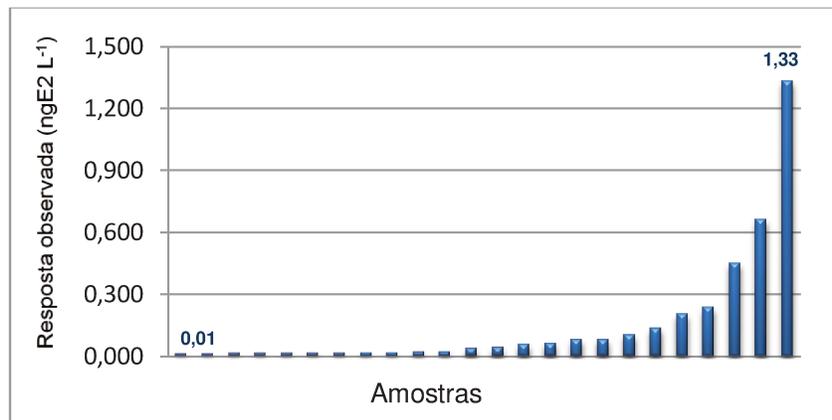


Figura 26: Atividade estrogênica observada no ensaio BLYES ($\text{ngE2}_{\text{equiv}} \text{ L}^{-1}$) para as amostras de água bruta de Campinas (rios Atibaia e Capivari). (n= 34 amostras)

A atividade estrogênica de águas tratadas foi avaliada em dois conjuntos de amostras, um coletado no período de estiagem (1^o, 3^o e 4^o campanhas) e outro no período de chuvas (9^o, 10^o, 11^o, 12^o e 13^o campanhas). Das 61 amostras analisadas, 24 apresentaram atividade estrogênica positiva, ou seja, 40 % do total. Os valores variaram entre 0,01 e 1,33 ngE2_{equiv} L⁻¹ (Figura 27), sendo as maiores respostas observadas nas amostras coletadas no período de estiagem. A maioria das amostras coletadas no período de chuvas não apresentou atividade estrogênica acima do LQ (0,01 ngE2_{equiv} L⁻¹). Esta mesma tendência pôde ser observada para as amostras dos mananciais, o que enfatiza a relação direta entre a qualidade do manancial e da água que é distribuída à população.



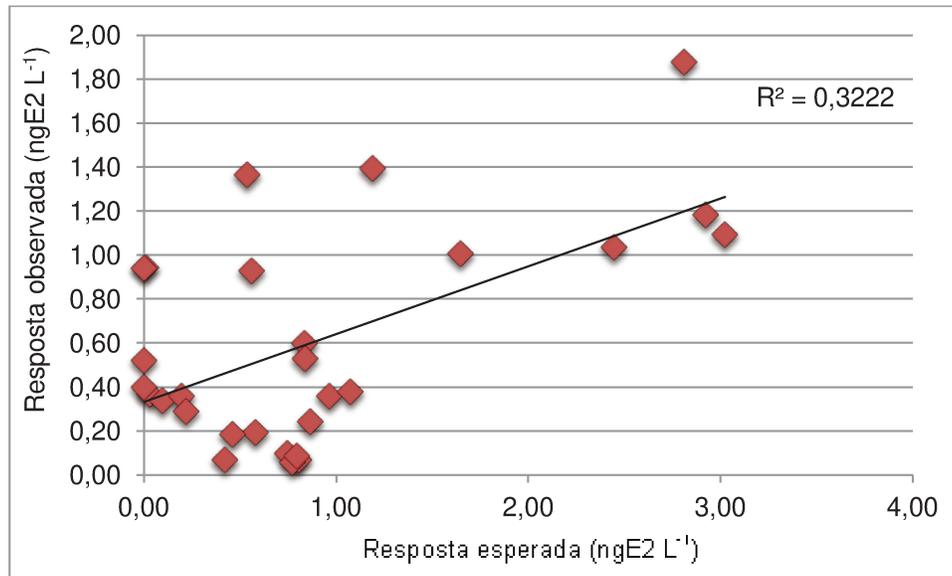


Figura 28: Correlação entre a resposta observada no bioensaio BLYES e a resposta esperada calculada com base nas análises químicas.

CONTAMINANTES EMERGENTES NOS MANANCIAIS



Cassiana C.M. Raimundo

Rio Capivari, julho de 2010.

Os mananciais que abastecem o município de Campinas, rio Atibaia e rio Capivari, foram investigados quanto à presença dos contaminantes emergentes em 13 campanhas amostrais durante 2010 e 2011. Dos 16 compostos estudados, 13 foram determinados em pelo menos um. Os hormônios sintéticos levonorgestrel, dietilestilbestrol e mestranol não foram detectados nas amostras em concentrações acima dos limites de detecção (0,3, 1,0 e 2,6 ng L⁻¹, respectivamente). Por outro lado, a cafeína e a atrazina foram determinadas em todas as amostras analisadas (ANEXO 3).

Dentre os demais interferentes endócrinos, a estrona (74 %), o bisfenol A (67 %), o estriol (54 %) e o triclosan (49 %) foram os mais frequentemente detectados, a fenolftaleína, o 17 β -estradiol e a testosterona foram determinados em cerca de 20 % das amostras, enquanto que a progesterona, o EE2 e os alquilfenóis não foram determinados em mais de duas amostras analisadas. Na Figura 29 estão apresentados os resultados gerais obtidos para os mananciais de Campinas.

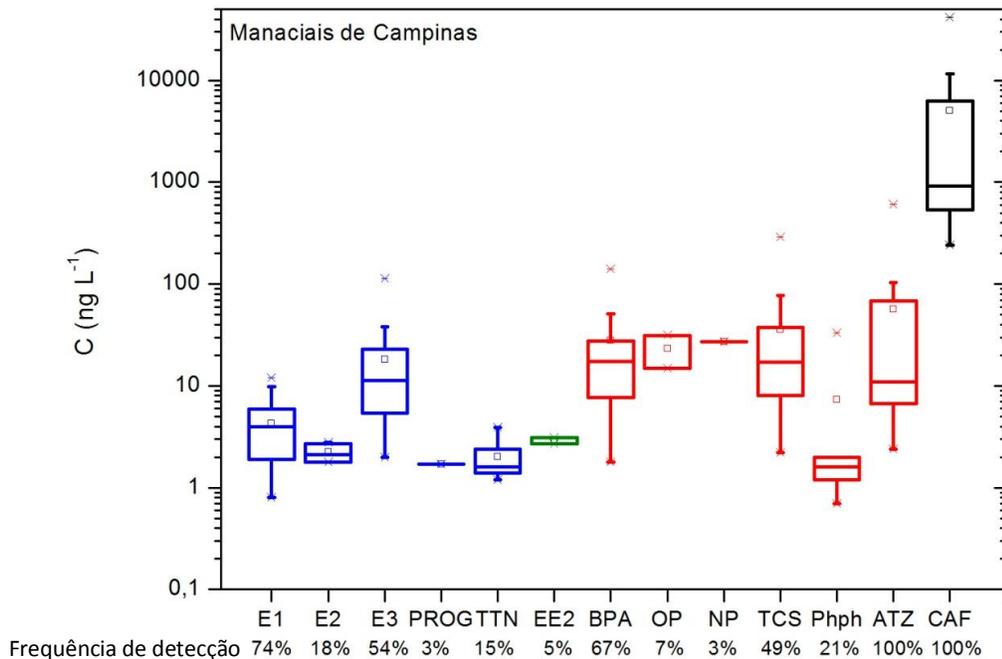


Figura 29: Concentração em escala logarítmica dos compostos determinados nos mananciais que abastecem a cidade de Campinas (rios Atibaia e Capivari) e a frequência de detecção dos compostos para as 39 amostras analisadas em 13 campanhas amostrais entre 2010 e 2011. A média aritmética é representada pelo quadrado. As linhas horizontais da caixa representam 25, 50 (mediana) e 75 % dos valores; barras de erro indicam 5 e 95 %; (*) corresponde aos valores máximos e mínimos.

No ANEXO 3 estão descritos os valores determinados na água bruta para cada composto em todas as campanhas amostrais. As maiores concentrações foram determinadas para a cafeína, que esteve presente em todas as amostras em concentrações cerca de 1000 vezes maior que a média da maioria dos outros compostos (0,2 – 41,8 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Usada como um traçador de atividade antrópica, sua presença nos mananciais está diretamente relacionada com o aporte de esgoto doméstico nos corpos d'água. Na Figura 30 estão mostradas as concentrações de cafeína ($\mu\text{g L}^{-1}$) determinadas ao lado da estação de captação de água no rio Atibaia durante as 13 campanhas amostrais. Foi possível verificar que a variação na concentração deste contaminante está relacionada com os períodos de seca e cheia dos rios (Figura 10). Isso porque o aporte de esgoto é constante durante o ano e eventos de chuvas provocam um efeito de diluição dos

contaminantes nos rios. Consequentemente, as concentrações detectadas são menores neste período.

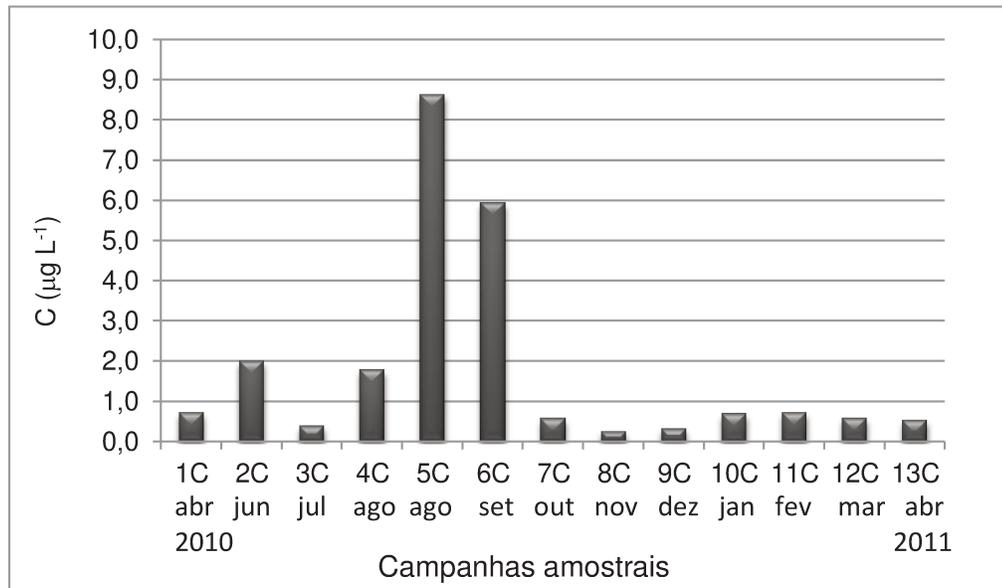


Figura 30: Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) de cafeína ao lado da estação de captação de água no rio Atibaia determinada nas 13 campanhas amostrais realizadas entre abril de 2010 e abril de 2011.

A cafeína foi monitorada nesses mesmos mananciais entre 2006 e 2007 com concentrações entre $0,2$ e $16,9 \mu\text{g L}^{-1}$ nos mesmos pontos de amostragem usando SPE-HPLC-DAD (Raimundo, 2007). Os resultados obtidos neste trabalho mostraram um aumento na concentração desta substância nos mananciais ao longo dos quatro anos, mesmo tendo Campinas aumentado a sua capacidade de tratamento de esgoto de 8 % em 2007 para 80 % em 2011.

Em países onde o problema de coleta e tratamento de esgoto já foi equacionado, a presença de cafeína nos corpos d'água esta relacionada com a eficiência das ETE, que são capazes de remover entre 80 e 99 % desses contaminantes, dependendo do tipo de tratamento que é aplicado. Além disso, algumas concessionárias de água utilizam cafeína como um marcador para indicar a presença de vazamentos nos sistemas de esgoto. Nos EUA e Canadá, as concentrações determinadas em regiões densamente povoadas relatadas na literatura, não ultrapassam 225 ng L^{-1} (Wang *et al.*, 2011; Fogazio, *et al.*, 2008; Conley *et al.*, 2008; Stackelberg *et al.*, 2007; Chen *et al.*,

2006b). Para países como Itália, Alemanha, França e Espanha são reportados valores de cafeína nos mananciais de até $3 \mu\text{g L}^{-1}$, dependendo da região (Loos *et al.*, 2007; Musolff *et al.*, 2009; Togola e Budzinski, 2008; Fernandez *et al.*, 2010; Huerta-Fontela *et al.*, 2007).

Para os hormônios naturais as concentrações variaram entre 1 e 31 ng L^{-1} , com exceção para o estriol que foi determinado na última campanha no rio Capivari com 114 ng L^{-1} . O E1 e o E3 foram os mais frequentemente detectados. As concentrações desses dois hormônios variaram significativamente entre os períodos de seca e cheia dos rios, sendo as maiores concentrações determinadas durante a estiagem. Por outro lado, o E2, a PROG e a TTN foram determinados apenas nos períodos de seca, onde o aporte de esgoto, constante ao longo do ano, é realçado com a diminuição da vazão dos rios em detrimento aos poucos eventos de chuva na região. O E2 é o estrogênio mais potente, seguido pela E1 e o E3. O estriol, no entanto é a principal forma excretada, pois na biossíntese do 17β -estradiol no organismo, outros hormônios, juntamente com o E2 se convertem em estrona e posteriormente em estriol antes da excreção (Osterlund e Hurd, 2001).

Países como Itália, Holanda, Bélgica e EUA reportaram concentrações desses estrógenos nos seus mananciais entre 0,2 e $21,7 \text{ ng L}^{-1}$ (Loos *et al.*, 2007; Verliefde, *et al.*, 2007; Benotti *et al.*, 2009). Por outro lado, o histórico registrado para alguns mananciais brasileiros, incluindo os rios Atibaia e Capivari, é mais preocupante. Concentrações em níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$ são relatadas para estrógenos em rios de Campinas, Jaboticabal e Belo Horizonte (Montagner e Jardim, 2011; Lopes *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2009).

O EE2 foi detectado apenas no rio Atibaia, durante a quinta campanha amostral, coletada no final do período de estiagem, onde se obteve um dos piores cenários de contaminação desses mananciais. As concentrações determinadas nos dois locais de amostragem foram muito próximas ao limite de quantificação do método analítico, o que apenas evidencia uma tendência em se detectar estrógenos sintéticos nos corpos d'água estudados. No entanto, a sua presença não pode ser confirmada apenas por esses resultados. Países como Holanda e EUA também reportaram concentrações

semelhantes, entre 0,4 e 1,4 ng L⁻¹, em alguns mananciais. A *Endocrine Society* manifestou recentemente sua preocupação com a presença e a exposição crônica a concentrações traços de interferentes endócrinos com alto potencial estrogênico, como o EE2 e outras substâncias utilizadas como contraceptivos, pelo fato de provocarem efeitos adversos a saúde humana (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

Para os demais xenoestrogênios as concentrações variaram entre os períodos de cheia e seca, entre 1 e 100 ng L⁻¹ com mediana próxima a 20 ng L⁻¹, com exceção para a fenolftaleína e a atrazina.

A fenolftaleína foi detectada em apenas 3 campanhas amostrais (1C, 3C e 5C). Em duas delas, as concentrações estavam entre os LD e LQ (1,1 e 3,7 ng L⁻¹). Na primeira campanha, no entanto, foi determinado Phph no rio Atibaia em concentração igual a 33 ng L⁻¹ ao lado da estação de captação de água da SANASA. Nesta mesma campanha, foram detectadas concentrações deste contaminante também na água tratada proveniente deste manancial. Por se tratar de um evento único, não foi possível inferir sobre o aporte deste contaminante no manancial estudado. Não há relatos da presença de fenolftaleína em amostras ambientais descritos na literatura.

A atrazina foi analisada a partir da 4ª campanha amostral e determinada em todas as amostras, em concentrações que variaram entre 2,4 e 611 ng L⁻¹. O maior estoque foi encontrado no rio Capivari. Apesar de ser bastante estável no ambiente, a presença deste herbicida nos corpos d'água esta relacionada com a lixiviação de solos agrícolas e, por isso, pode haver um aumento na concentração dela em períodos chuvosos, mas principalmente, na época de aplicação, onde deverá se detectar as maiores concentrações de ATZ no ambiente. A atrazina é um dos herbicidas mais consumidos do Brasil e é usada em diversos tipos de cultura como milho e cana de açúcar em ações pré ou pós emergentes.

Considerada um interferente endócrino muito ativo em baixas concentrações, foi responsável pela feminização de anfíbios expostos a concentrações de 2,5 µg L⁻¹, durante a fase de desenvolvimento. Hayes *et al.* (2010) associaram a exposição de machos a atrazina com a diminuição dos níveis de testosterona no plasma dos animais

quando examinados 2 anos após a metamorfose. Embora a atrazina não responda ao bioensaio BLYES utilizado neste trabalho, outros autores relataram diferentes efeitos adversos nos organismos, provocados pela exposição ao herbicida (Munif *et al.*, 2011). Os níveis detectados nos mananciais de Campinas ainda são menores que aqueles citados nos trabalhos de Hayes *et al.*, porém, os resultados deste trabalho não mostraram uma tendência que pudesse ser relacionada com a sazonalidade e a aplicação de atrazina na lavoura. Observou-se apenas um aumento de cerca de 3 vezes na concentração de ATZ na coleta realizada no mês de março de 2011, o que poderia ser um indício de período em que o herbicida está sendo aplicado. A Figura 31 apresenta as concentrações de ATZ no rio Capivari durante julho de 2010 e abril de 2011.

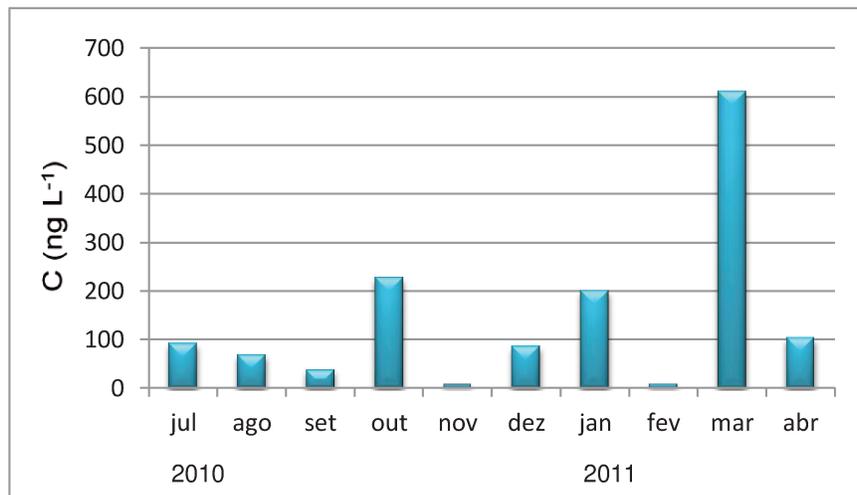


Figura 31: Concentrações (ng L⁻¹) de atrazina no rio Capivari entre 2010 e 2011.

Na Figura 32, estão resumidas as concentrações por classes de contaminantes, nas amostras dos dois diferentes mananciais, nos locais de captação de água da SANASA. De maneira geral, os compostos estiveram presentes em ambos os corpos d'água em concentrações semelhantes, com exceção do triclosan, atrazina e cafeína, que foram detectados no rio Capivari em concentrações mais elevadas. Este rio é classificado como classe 3 na Resolução CONAMA nº 357/04, pois recebe alta carga de efluentes industriais e domésticos ao longo de seu curso.

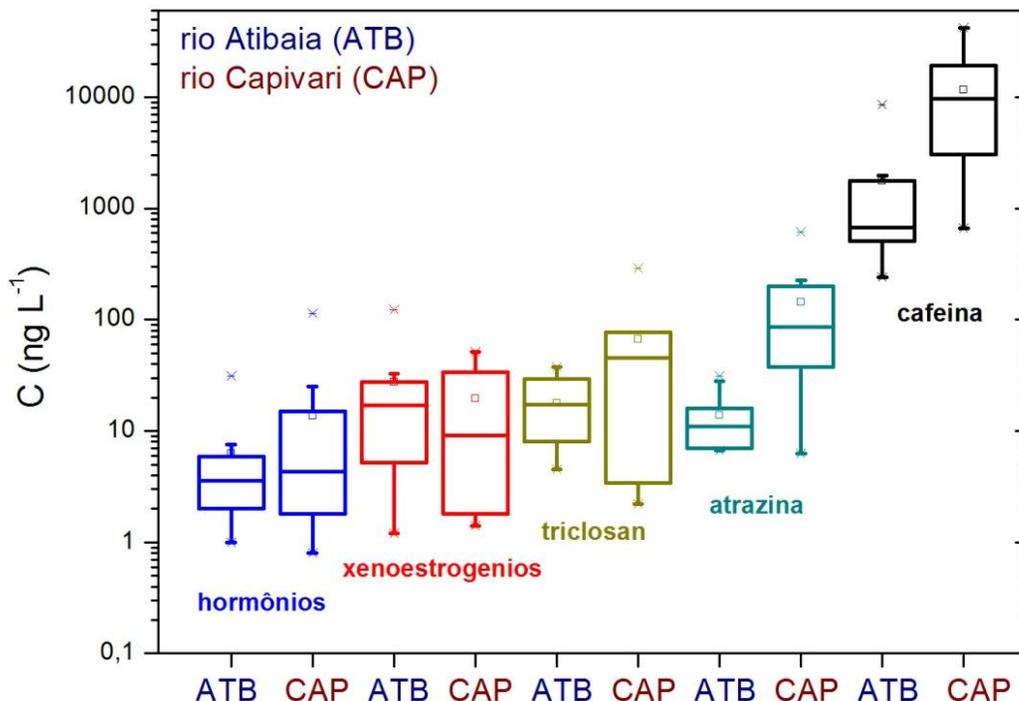


Figura 32: Concentração em escala logarítmica dos contaminantes por classes, determinadas nos locais de captação de água da SANASA nos dois mananciais que abastecem Campinas, rio Atibaia (ATB) e rio Capivari (CAP). A média aritmética é representada pelo quadrado. As linhas horizontais da caixa representam 25, 50 (mediana) e 75 % dos valores; barras de erro indicam 5 e 95 %; (*) corresponde aos valores máximos e mínimos.

O triclosan foi determinado em concentrações entre 2,2 e 289 ng L⁻¹ no rio Capivari e, entre 4,5 e 37,5 ng L⁻¹ no rio Atibaia. Além disso, esteve em concentrações menores que o LQ (0,7 ng L⁻¹) em 6 das 13 campanhas amostrais. Apesar de ser solúvel em água ($\phi \sim 10 \text{ mg L}^{-1}$ à 20 °C), possui baixo tempo de meia vida (Zhao *et al.*, 2010) e a maior preocupação está nos seus produtos de degradação e destino no ambiente. Chalew e Halden (2009) reportaram os níveis de concentração de triclosan que se têm determinado em diferentes mananciais e alguns efeitos atribuídos a exposição crônica, onde enfatizaram que crustáceos e algas são as espécies mais sensíveis, susceptíveis a efeitos adversos pela exposição ao biocida em níveis de nanogramas por litro, que foram os níveis de TCS determinados neste trabalho e em outros corpos d'água da Itália, EUA e China (Loos *et al.*, 2007; Benotti *et al.*, 2009; Snyder *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011; Loraine e Pettigrove, 2006; Zhao *et al.*, 2009)

Para o bisfenol A as concentrações variaram entre 2 e 141 ng L⁻¹ em ambos mananciais, e não houve relação com a sazonalidade. As concentrações variaram aleatoriamente durante o ano e em algumas campanhas esteve abaixo do LQ do método analítico. Este contaminante possui baixo potencial estrogênico, porém esta presente em diversos materiais de consumo humano, produtos para bebês e alimentos enlatados. Nos EUA e alguns países da Europa, as concentrações de BPA determinadas nos mananciais estão nos níveis de µg L⁻¹ (Fogazio *et al.*, 2008; Verliefde *et al.*, 2007; Quednow e Puttmann, 2008; Musolff, *et al.*, 2009; Ribeiro, *et al.*, 2009). Essas concentrações já foram detectadas no rio Capivari (8 µg L⁻¹) em junho de 2006 e foram associadas ao aporte de efluentes industriais (Raimundo, 2007).

Assim como BPA, os alquilfenóis são detectados em diversos mananciais de países como EUA, Canadá, Itália, Suíça, Alemanha e Espanha em concentrações que variam de poucos nanogramas por litro até microgramas por litro (Benotti *et al.*, 2009; Snyder *et al.*, 2008; Stackelberg *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2006b; Loos *et al.*, 2010; Jonkers *et al.*, 2009; Musolff *et al.*, 2009; Petrovic *et al.*, 2003). Em mananciais da região metropolitana de Belo Horizonte (MG), Moreira *et al.* (2009) determinaram 4-nonilfenol em concentrações entre 44 e 1918 ng L⁻¹. Os resultados obtidos neste trabalho para os rios Atibaia e Capivari não apontam um cenário preocupante com relação a esses compostos. O 4n-OP foi detectado em apenas duas amostras, uma do rio Capivari na 1ª campanha amostral (31 ng L⁻¹) e outra no rio Atibaia na 3ª campanha (15 ng L⁻¹). O 4n-NP foi detectado em apenas 1 amostra, juntamente com o 4n-OP na 3ª campanha amostral no rio Atibaia (27 ng L⁻¹).

Com relação ao rio Atibaia, não houve diferença significativa nas concentrações dos contaminantes emergentes nos dois diferentes pontos amostrais estudados. O primeiro (ATB2065) coincide com o ponto de monitoramento feito pela CETESB que classifica o corpo d'água quanto ao Índice de Qualidade de Água para Abastecimento Público (CETESB, 2009). No entanto, este ponto não considera o aporte do ribeirão Pinheiros que é feito cerca de 200 metros à jusante deste ponto e 1600 metros à montante da estação de captação de água da SANASA (ATB captação). Este ribeirão

recebe grande carga de esgoto doméstico das cidades de Valinhos e Vinhedo e aporta no rio Atibaia como um corpo bastante impactado (Figura 33).

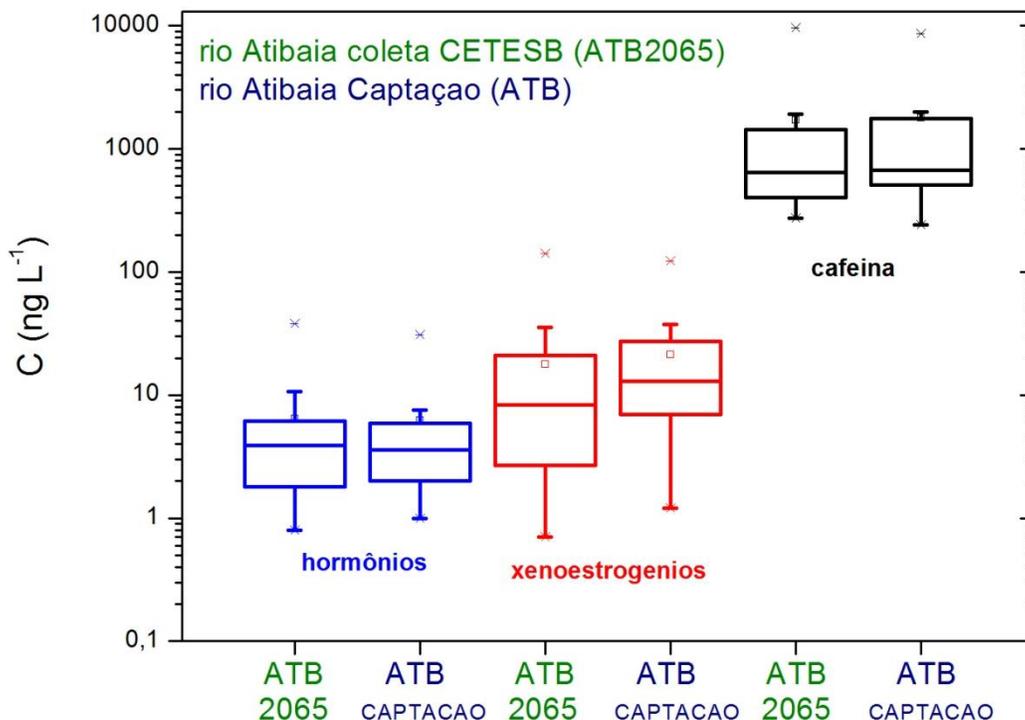


Figura 33: Concentrações em escala logarítmica dos hormônios naturais, xenoestrogênios e cafeína determinadas em dois pontos no rio Atibaia, um à montante da captação e do aporte do ribeirão Pinheiros, usado no monitoramento da CETESB (ATB2065) e o outro ao lado da estação de captação de água da SANASA (ATB captação). A média aritmética é representada pelo quadrado. As linhas horizontais da caixa representam 25, 50 (mediana) e 75 % dos valores; barras de erro indicam 5 e 95 %; (*) corresponde aos valores máximos e mínimos.

Com relação à estrogenicidade das amostras nos dois pontos, observou-se um pequeno aumento na atividade estrogênica das amostras coletadas ao lado da estação de captação da SANASA no período de estiagem (entre 1C e 8C). Este aumento pode ser atribuído ao aporte do ribeirão Pinheiros, uma vez que a região entre esses dois pontos amostrais estudados é pouco urbanizada, caracterizada por chácaras sem atividade agrícola significativa, a mata ciliar é preservada e não há outro aporte de esgoto clandestino à montante da captação (Figura 34).

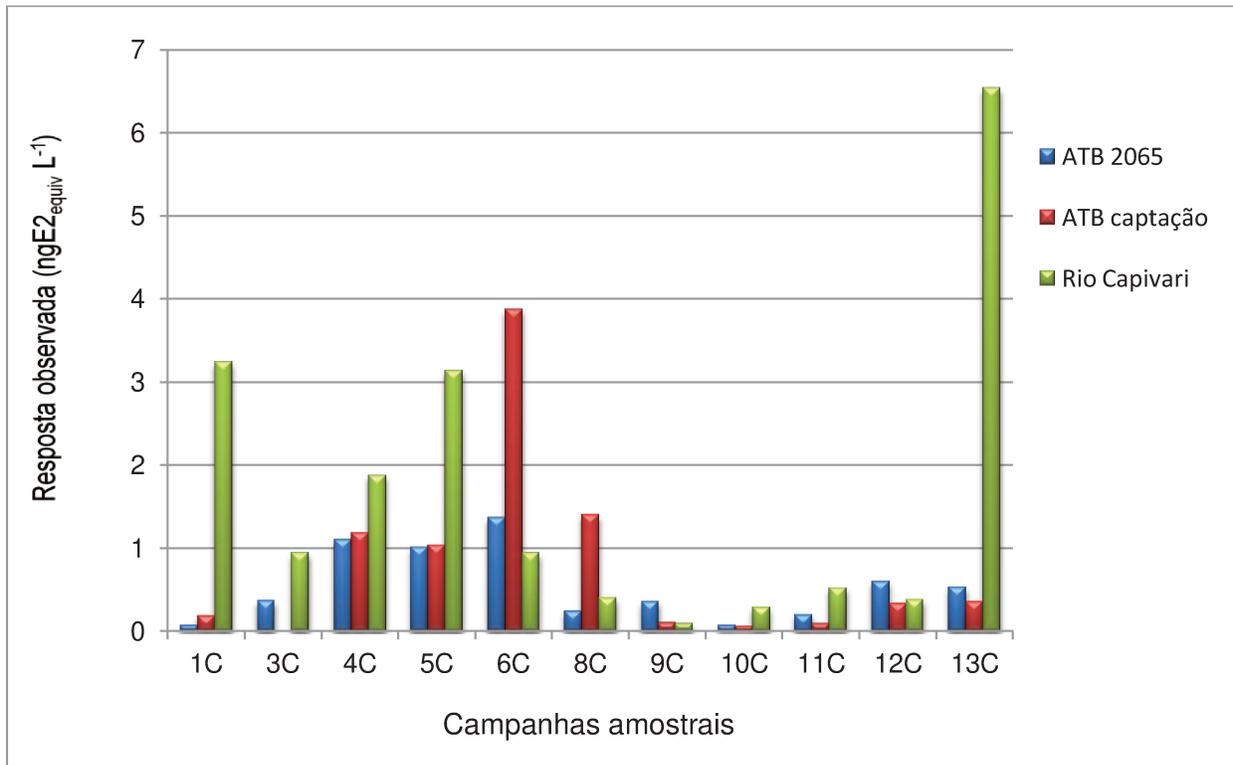


Figura 34: Atividade estrogênica (ngE2_{equiv} L⁻¹) das amostras coletadas nos rios Atibaia e Capivari entre abril de 2010 e abril de 2011 nos três pontos amostrais deste trabalho; rio Atibaia à montante do aporte do ribeirão Pinheiros, no ponto ATB2065 de coleta da CETESB; rio Atibaia à jusante do aporte do ribeirão Pinheiros, ao lado da estação de captação de água da SANASA e; rio Capivari ao lado da ETA Capivari.

Na Tabela 17 estão apresentados os valores da resposta obtida pelo bioensaio BLYES em ngE2_{equiv} L⁻¹ para as amostras de água superficiais analisadas neste trabalho. No período de chuvas, os maiores valores de atividade estrogênica foram reportados para o ponto de coleta da CETESB, localizado 200 m à montante do aporte do ribeirão Pinheiros. Entre dezembro e fevereiro (9C e 12C), devido ao grande volume de chuvas, o rio Atibaia transbordou nesta região, o volume de água aumentou cerca de 10 m e em janeiro houve uma grande área alagada onde não foi possível identificar se quer o aporte do ribeirão Pinheiros no Atibaia.

O rio Capivari apresentou valores de atividade estrogênica maiores que o rio Atibaia para a maioria das amostras coletadas. Este é um rio de menor vazão e o seu

curso, próximo a ETA, não ficou tão comprometido com os grandes volumes de chuva (Tabela 17).

Tabela 17: Resposta obtida por BLYES ($\text{ngE2}_{\text{equiv}} \text{L}^{-1}$) para as amostras de águas superficiais analisadas neste trabalho (rio Atibaia e rio Capivari).

Resposta observada ($\text{ngE2}_{\text{equiv}} \text{L}^{-1}$)			
Campanhas	ATB 2065	ATB captação	Rio Capivari
1C	0,07	0,19	3,24
3C	0,37	46,9	0,94
4C	1,10	1,18	1,88
5C	1,01	1,04	3,14
6C	1,37	3,88	0,94
8C	0,24	1,40	0,40
9C	0,36	0,10	0,09
10C	0,07	0,06	0,29
11C	0,20	0,09	0,52
12C	0,60	0,34	0,38
13C	0,53	0,36	6,54

Como mostrado anteriormente, na Figura 28, houve baixa correlação entre a resposta química e a biológica para as amostras analisadas neste trabalho, o que nos fez inferir que outros compostos estariam contribuindo com a estrogenicidade das amostras e estes não estão sendo abordados neste trabalho. No entanto, sabe-se que as maiores contribuições para o estado de degradação dos mananciais da região de Campinas são devido ao aporte de esgoto doméstico, característico de regiões densamente povoadas. Apesar da cafeína não ser um interferente endócrino foi possível obter uma correlação entre as concentrações de cafeína e o potencial estrogênico das amostras de mananciais coletadas.

Na Figura 35 esta apresentada a correlação entre as concentrações de cafeína ($\mu\text{g L}^{-1}$) e a atividades estrogênicas observadas ($\text{ngE2}_{\text{equiv}} \text{L}^{-1}$) por BLYES. Neste caso, o BLYES infere sobre um conjunto de contaminantes, considerando inclusive efeitos de sinergismos e antagonismos presentes em uma amostra complexa, para reportar a atividade estrogênica em função de um estrógeno natural, o E2. O coeficiente de

correlação obtido de 0,445 indica que a determinação de cafeína responde aproximadamente 45 % da atividade estrogênica de uma amostra, ou seja, se a cafeína estiver presente em uma amostra, há quase 50 % de chances dessa amostra apresentar atividade estrogênica superior a 0,01 ngE2_{equiv} L⁻¹ devido a presença de outros compostos interferentes endócrinos no meio. No entanto, apenas com esses dados, não foi possível conhecer uma relação direta entre a concentração de cafeína e o potencial estrogênico de uma amostra.

A determinação de cafeína, que pode ser feita usando outras técnicas mais simples e de menor custo que o LC-MS/MS, como o HPLC-DAD e o CG-MS pode ser facilmente incorporada em análises de rotina por concessionárias de água e agências regulatórias, para inferir sobre a presença de interferentes endócrinos nos corpos d'água, pelo menos enquanto não se estabelece limites para a presença desses contaminantes emergentes nos mananciais.

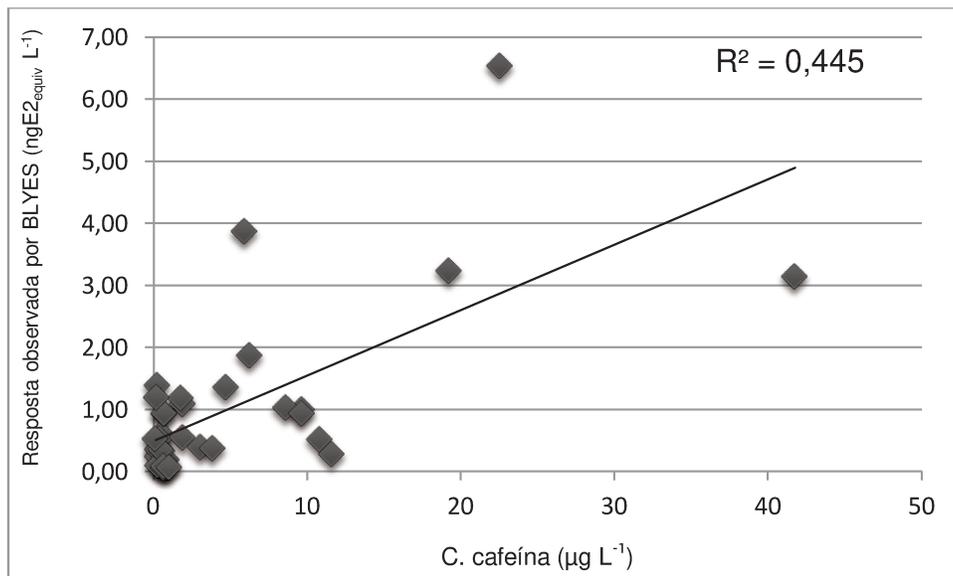


Figura 35: Correlação entre a concentração de cafeína (µg L⁻¹) e a resposta observada no bioensaio BLYES para as amostras dos mananciais. Coeficiente de correlação (r²) igual a 0,445.

CONTAMINANTES EMERGENTES NA ÁGUA TRATADA



Cassiana C.M. Raimundo

Campinas, julho de 2011.

Amostras de água tratada de diferentes bairros de Campinas foram analisadas durante abril de 2010 e abril de 2011, totalizando 103 em 13 campanhas amostrais. Com o objetivo de inferir sobre a eficiência das estações de tratamento de água da cidade e obter um diagnóstico da qualidade da água que é servida à população no que se refere aos compostos interferentes endócrinos e a cafeína, as amostras foram analisadas quimicamente por LC-MS/MS e biologicamente por BLYES.

Dos 16 contaminantes analisados, 6 deles foram determinados em pelo menos 1 amostra (estrona, fenolftaleína, bisfenol A, triclosan, atrazina e cafeína) (Figura 36) e, 40 % das amostras submetidas ao bioensaio, apresentaram atividade estrogênica positiva. Os valores variaram entre 0,01 e 1,33 ngE_{equiv} L⁻¹ (ANEXO 3).

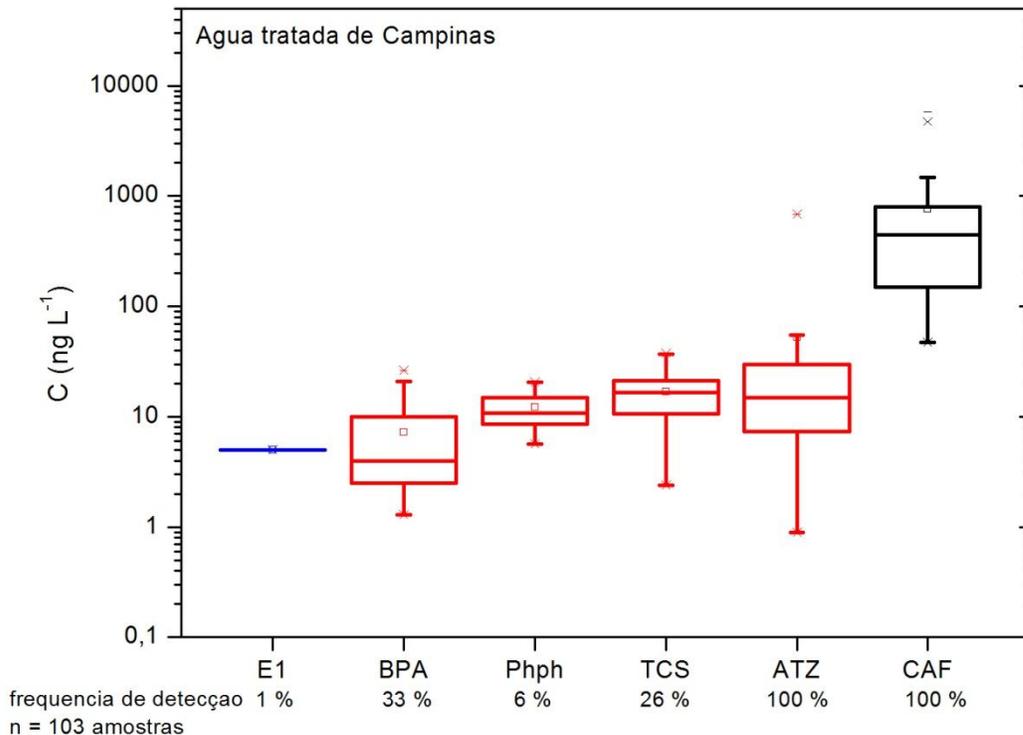


Figura 36: Concentração em escala logarítmica dos 6 compostos determinados na água tratada da cidade de Campinas (SP) e a freqüência de detecção dos compostos para as 103 amostras analisadas em 13 campanhas amostrais entre 2010 e 2011. A média aritmética é representada pelo quadrado. Em azul estão os estrogênios naturais, em vermelho, os xenoestrogênios e em preto a cafeína. As linhas horizontais da caixa representam 25, 50 (mediana) e 75 % dos valores; barras de erro indicam 5 e 95 %; (*) corresponde aos valores máximos e mínimos.

Assim como nos mananciais, dentre os contaminantes detectados na água tratada a cafeína e a atrazina foram determinadas em 100 % das amostras. O bisfenol A esteve presente em 33 %, o triclosan em 26 % e, a fenoltaleína e a estrona foram os compostos detectados o menor número de vezes.

A estrona foi detectada apenas na 12^o campanha (março/2011) no rio Capivari em concentração igual a 5 ng L⁻¹. Essa concentração, apesar de muito próxima ao limite de quantificação do método analítico, é cerca de 10 vezes maior que os níveis detectados na Alemanha (Kuch e Ballschmiter, 2001). Os demais estrogênios naturais, detectados nos mananciais, não foram quantificados em concentrações acima do LQ nas amostras de água tratada. Isso coincide com outros trabalhos descritos na literatura, onde os

autores não detectaram estrogênios naturais na água tratada de países como Holanda, Espanha, EUA e Canadá, em concentrações acima dos LD ($\sim 1 \text{ ng L}^{-1}$), apesar de alguns deles terem sido determinados nos mananciais em concentrações de poucos nanogramas por litro (Verliefde *et al.*, 2007; Kuster *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011; Benotti *et al.*, 2009; Kleywegt *et al.*, 2011).

A fenolftaleína foi detectada apenas na 1ª campanha nas 6 amostras de água tratada provenientes do rio Atibaia. As concentrações variaram entre 5,7 e 14,8 ng L^{-1} , e foram menores que a concentração determinada próximo ao local de captação de água no rio Atibaia (33 ng L^{-1}). Não há relatos da presença deste contaminante em amostras ambientais. O uso de fenolftaleína é quase que exclusivamente químico, e é pouco provável que a sua presença no manancial seja devido ao aporte de esgoto doméstico, pois o seu uso como laxante foi proibido no Brasil. Este composto deveria ter sido usado como padrão interno neste trabalho, mas passou a ser monitorado juntamente com os outros contaminantes em todas as campanhas amostrais, no entanto, apenas com o resultado positivo em uma única amostragem, não foi possível inferir sobre a presença dele no meio. O potencial estrogênico da fenolftaleína é cerca de 1 milhão de vezes menor que o E2 e este não foi detectado em concentrações significativas nas amostras analisadas.

O bisfenol A foi determinado em concentrações entre 1,5 e 26 ng L^{-1} , esteve presente em todos os pontos amostrais de água tratada e não apresentou correlação com períodos de cheia e seca dos rios. A maioria dos trabalhos descritos na literatura investigam a eficiência das ETA analisando amostras de água bruta e tratada. Na Europa e nos EUA as concentrações de BPA em alguns mananciais estão em níveis de $\mu\text{g L}^{-1}$ e, portanto, há grande preocupação em obter um tratamento de água adequado a remoção deste contaminante. Com exceção para Li *et al.* (2010) que reportaram concentrações de BPA em água de torneira de diferentes regiões da China entre 2,3 e 317 ng L^{-1} , diversos autores determinaram BPA na água tratada de ETA de diferentes países como Espanha, Alemanha, França, EUA e Canadá entre 0,1 e 220 ng L^{-1} (Rodrigues-Mozaz *et al.*, 2005; Kuch e Ballschmiter, 2001; Baugros *et al.*, 2008; Benotti *et al.*, 2009; Stackelberg *et al.*, 2007; Kleywegt *et al.*, 2011).

O triclosan é um agente antimicrobiano solúvel em água, porém com curto tempo de meia vida nos corpos d'água. Diversos estudos abordam o destino dele no ambiente, uma vez que alguns de seus produtos de degradação e conjugados são mais tóxicos ou estrogênicos que a sua forma livre. O triclosan foi detectado em 27 das 103 amostras de água tratada analisadas neste trabalho. As concentrações variaram entre 2,4 e 37 ng L⁻¹, com média igual a 17 ng L⁻¹. Valores abaixo dessa média foram determinados em países como EUA e China (Wang *et al.*, 2011; Benotti *et al.*, 2009; Snyder *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010).

Assim como o bisfenol A, o triclosan foi determinado em concentrações menores na água tratada. Na Figura 37 estão mostradas as concentrações desses dois contaminantes nos mananciais e na água distribuída à população. No entanto, nada pôde ser inferido sobre a sazonalidade desses compostos no ambiente.

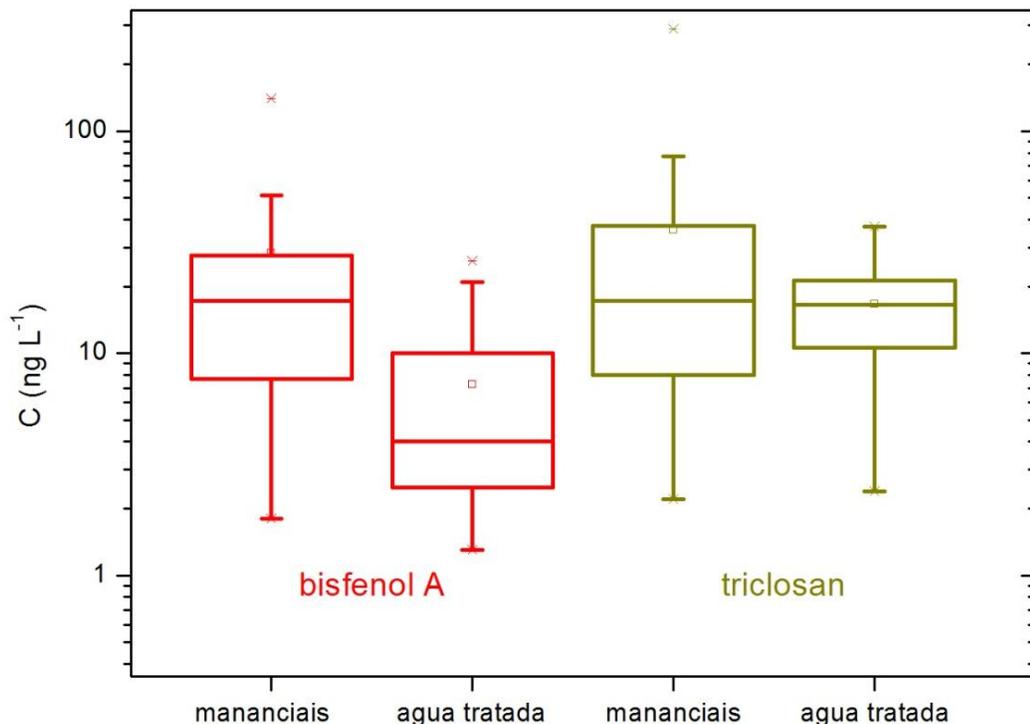


Figura 37: Concentrações de bisfenol A e triclosan determinadas nos mananciais e na água tratada da cidade de Campinas. A média aritmética é representada pelo quadrado. As linhas horizontais da caixa representam 25, 50 (mediana) e 75 % dos valores; barras de erro indicam 5 e 95 %; (*) corresponde aos valores máximos e mínimos.

A atrazina foi determinada em todas as amostras analisadas e os níveis foram maiores nas amostras de água tratada provenientes do rio Capivari. Nestas, as concentrações variaram entre 8,3 e 687 ng L⁻¹, enquanto que nas amostras de água tratada provenientes do rio Atibaia as concentrações variaram entre 2,4 e 42 ng L⁻¹ (Figura 38). Isso porque as ETA convencionais não são eficientes na remoção e o rio Capivari recebe um aporte de atrazina cerca de dez vezes maior que o rio Atibaia. Concentrações de atrazina entre 1 e 62 ng L⁻¹ foram determinadas em amostras de água tratada da Espanha, Itália, Holanda e do Canadá (Quintana *et al.*, 2001; Rodrigues-Mozaz *et al.*, 2005; Loos *et al.*, 2007; Verliefde *et al.*, 2007; Garcia-Ac *et al.*, 2009). Nos EUA, concentrações médias de 50 ng L⁻¹ foram relatadas por Benotti *et al.* (2009) na água de torneira, onde foram determinadas atrazina em 80 % das amostras investigadas com concentrações máximas de 930 ng L⁻¹.

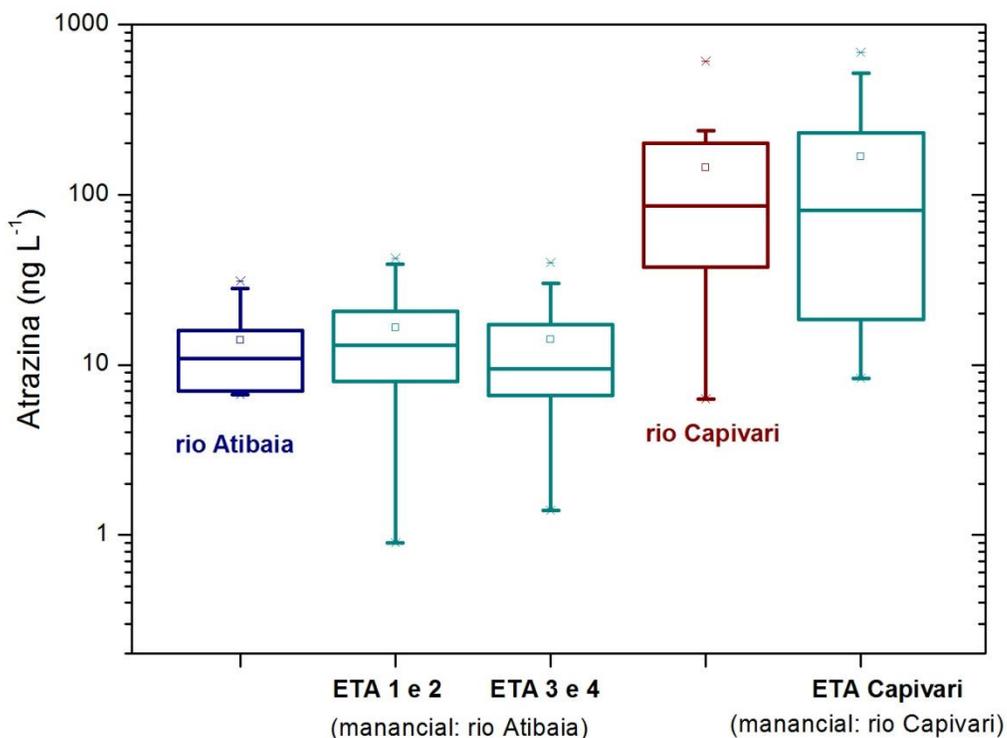


Figura 38: Concentração de atrazina determinada nos mananciais e na água tratada da cidade de Campinas. A média aritmética é representada pelo quadrado. As linhas horizontais da caixa representam 25, 50 (mediana) e 75 % dos valores; barras de erro indicam 5 e 95 %; (*) corresponde aos valores máximos e mínimos.

Para a cafeína, as concentrações determinadas na água distribuída à população variaram cerca de 100 vezes entre períodos de cheia e estiagem ($47 - 4324 \text{ ng L}^{-1}$) acompanhando o perfil do manancial (Figura 39). No entanto, ao contrário da atrazina, não houve diferenças significativas nas concentrações determinadas nas amostras de água tratada provenientes dos dois mananciais, mesmo tendo o rio Capivari um estoque maior deste contaminante. Na Figura 40 estão apresentadas as concentrações de cafeína determinadas no rio Atibaia, no rio Capivari e na água tratada proveniente dos 5 estações de tratamento de água.

Com relação à presença de cafeína na água tratada de outros países, trabalhos descritos na literatura reportam concentrações menores que as determinadas neste trabalho, entre $1,2$ e 181 ng L^{-1} na Itália, França, EUA e Canadá (Loos *et al.*, 2007; Togola e Budzinski, 2008; Stackelberg *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2006).

As concentrações encontradas na água tratada de Campinas ainda são maiores que os níveis de cafeína determinados nos mananciais de diversos países como Itália, Alemanha, França, Espanha, EUA e Canadá, onde os sistemas de coleta e tratamento de esgoto estão implantados adequadamente (Loos *et al.*, 2007; Loos *et al.*, 2010; Musolff *et al.*, 2009; Togola e Budzinski, 2008; Fernandez *et al.*, 2010; Huerta-Fontela *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011; Fogazio *et al.*, 2008; Conley *et al.*, 2008; Stackelberg *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2006b).

As concentrações de cafeína reportadas nos mananciais brasileiros estão em níveis de centenas de $\mu\text{g L}^{-1}$. Frohener *et al.* (2010) determinaram concentrações entre $1,4$ e $753,5 \mu\text{g L}^{-1}$ em mananciais na região de Curitiba (PR). Gonçalves (2008) determinou concentrações entre $0,2$ e $47,5 \mu\text{g L}^{-1}$ em Teresópolis (RJ). Em Campinas o histórico de contaminação desses mananciais por cafeína aponta concentrações entre $0,2$ e $127 \mu\text{g L}^{-1}$ (Montagner e Jardim, 2011). Portanto, é diante deste cenário de degradação dos corpos d'água superficiais e a falta de tratamento de esgoto adequado que se é possível determinar concentrações elevadas não só de cafeína, mas de outros contaminantes orgânicos na água tratada distribuída a população no Brasil.

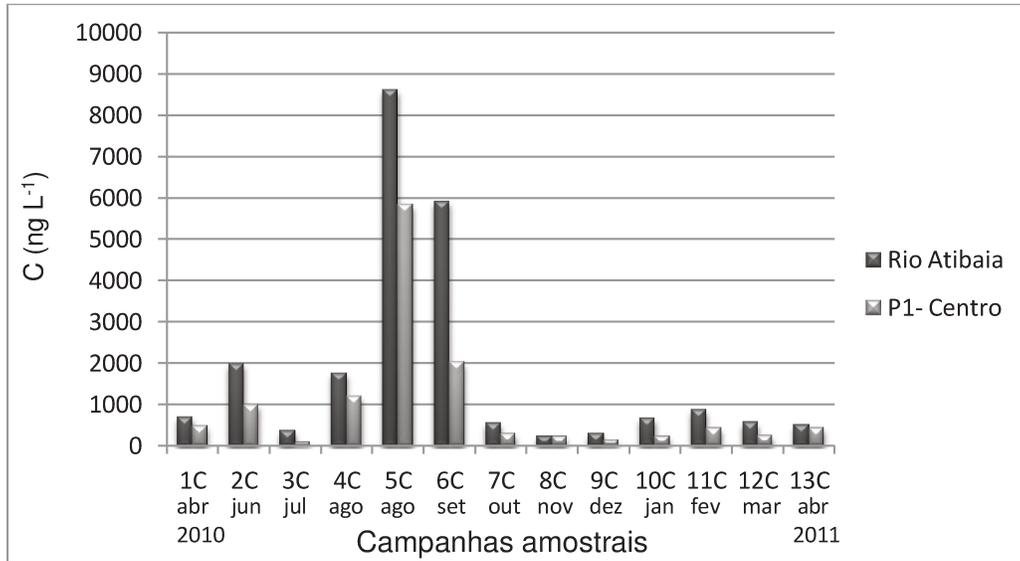


Figura 39: Concentrações (ng L⁻¹) de cafeína, determinadas nas 13 campanhas amostrais, no rio Atibaia ao lado da estação de captação de água e na água tratada coletada no Centro da cidade (P1) que recebe água proveniente das ETA 1 e 2.

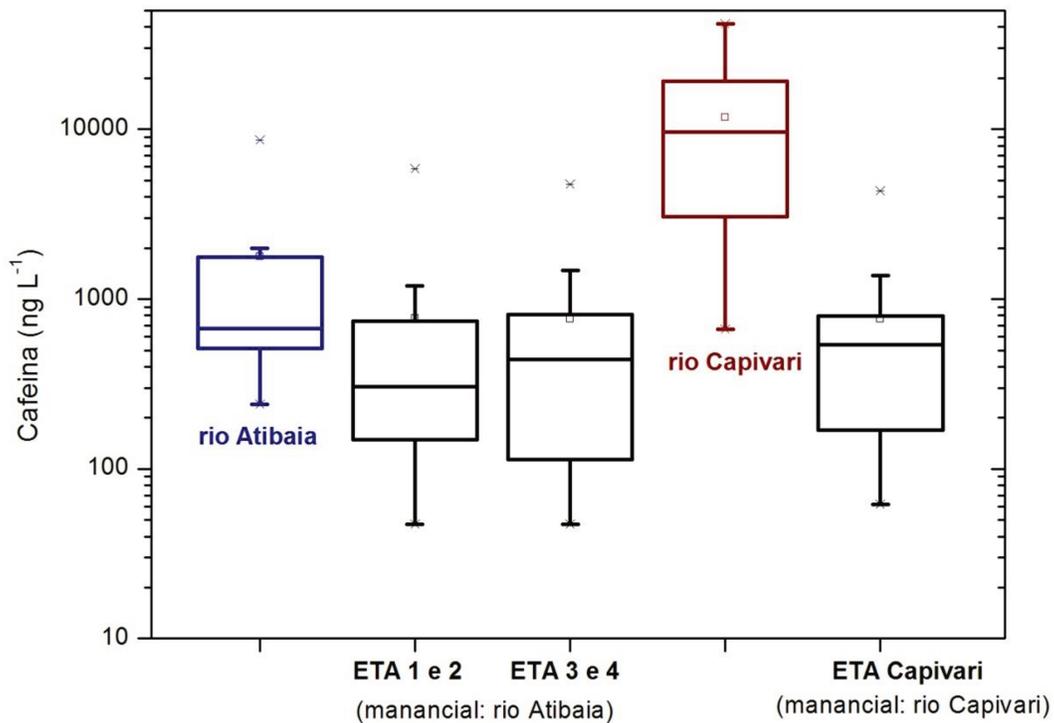


Figura 40: Concentração de cafeína determinada nos mananciais e na água tratada da cidade de Campinas. A média aritmética é representada pelo quadrado. As linhas horizontais da caixa representam 25, 50 (mediana) e 75 % dos valores; barras de erro indicam 5 e 95 %; (*) corresponde aos valores máximos e mínimos.

Na Figura 41 é possível comparar as concentrações de E1, BPA, TCS, ATZ e CAF determinadas nas amostras de água tratada de Campinas com a de outros países como Alemanha, Espanha, França, Itália, Holanda, China, EUA e Canadá, conforme descrito na Tabela 3. As maiores médias foram determinadas neste trabalho para 4 dos 5 compostos detectados na água tratada, sendo os níveis de cafeína cerca de uma ordem de grandeza maior que aqueles determinados em outros países. A concentração de estrona de 5 ng L⁻¹ determinada em uma amostra deste trabalho é dez vezes maior que aquela determinada na Alemanha (Kuch e Ballschmiter, 2001). Outros países como a Holanda não detectaram concentrações de E1 maiores que os LD do método empregado os quais variaram entre 0,4 e 1,0 ng L⁻¹ (Verliefde *et al.*, 2007). O bisfenol A teve as maiores concentrações determinadas na água tratada da França, China e EUA, países onde há um estoque grande de BPA nos mananciais.

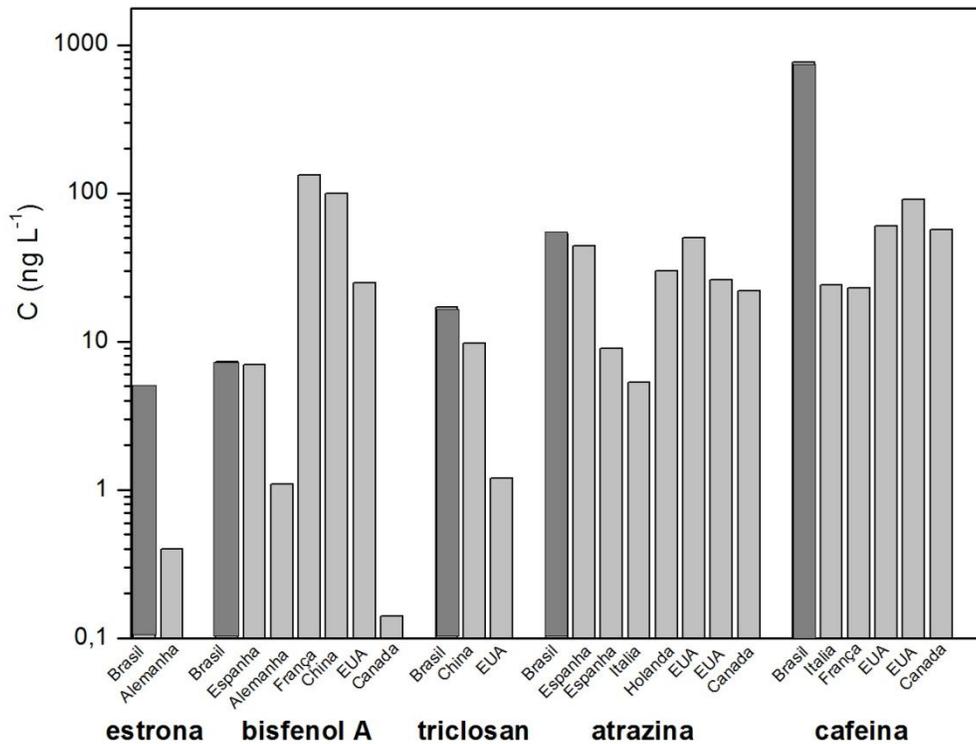


Figura 41: Concentrações de 5 contaminantes determinados na água tratada de Campinas (estrona, bisfenol A, triclosan, atrazina e cafeína) comparada com as de outros países, de acordo com os dados reportados na Tabela 3.

Com relação à atividade estrogênica, aproximadamente 40 % das amostras de água tratada apresentaram estrogenicidade maior ou igual a $0,01 \text{ ngE2}_{\text{equiv}} \text{ L}^{-1}$, sendo os maiores valores observados no período de estiagem. Nas campanhas de julho e agosto, aonde a umidade do ar chega em seu estágio mais crítico durante o ano, todas as amostras coletadas apresentaram atividade estrogênica por BLYES. Na Tabela 18 estão apresentados os resultados obtidos para 8 das 13 campanhas, nos diferentes bairros de Campinas.

O ponto P7, no bairro Recanto do Sol II foi o que apresentou atividade estrogênica positiva em um maior número de amostras (~ 70 %). No entanto, não houve uma variação grande nos valores observados para os diferentes pontos amostrais que indicasse um local mais preocupante quanto à qualidade da água recebida. Assim como observado pelos níveis de cafeína determinados nas amostras de água distribuídas pelas diferentes ETA (Figura 40), é possível inferir que a água distribuída nas diferentes regiões do município apresenta qualidade semelhante, mesmo sendo tratada em 5 diferentes ETA. Neste caso, é importante ressaltar que a rede de distribuição de água de Campinas não é segmentada e pode haver misturas nos centros reservatórios e de distribuição, fazendo com que não haja diferenças na água tratada distribuída à população campineira.

Tabela 18: Resposta obtida por BLYES ($\text{ngE2}_{\text{equiv}} \text{ L}^{-1}$) para as amostras de águas tratadas dos diferentes bairros de Campinas.

Amostras de água tratada	Resposta observada ($\text{ngE2}_{\text{equiv}} \text{ L}^{-1}$)							
	seca			cheia				
	1C (abr/10)	3C (jul/10)	4C (ago/10)	9C (dez/10)	10C (jan/11)	11C (fev/11)	12C (mar/11)	13C (abr/11)
A1 – Centro	nd	0,02	0,08	0,01	0,06	nd	nd	nd
A2 – NE	nd	0,02	0,23	nd	0,13	0,02	nd	nd
A3 – MSA	nd	0,10	1,33	nd	nd	nd	nd	0,45
A4 – BV	0,01	0,06	0,02	0,01	nd	nd	nd	nd
A5 – Sousas	nd	0,66	0,04	nd	0,01	nd	nd	nd
A6 – BG	0,01	0,01	0,01	nd	0,01	nd	nd	nd
A7 – RS	0,20	0,01	0,08	-	nd	nd	0,01	0,04
A8 – DIC IV	nd	0,01	0,01	0,01	0,01	nd	nd	nd

EFICIÊNCIA DAS ETA DE CAMPINAS



Cassiana C.M. Raimundo

ETA Capivari, SANASA Campinas/SP.

A eficiência das estações de tratamento de água de Campinas na remoção dos contaminantes emergentes abordados neste trabalho foi avaliada em julho de 2011 durante um período de estiagem, porém as coletas foram realizadas após um dia de chuva atípica intensa. Foram coletadas amostras do rio Atibaia, na estação de captação, e do rio Capivari na ETA Capivari. Além disso, amostras de água foram coletadas ao final do tratamento da ETA Capivari e das ETA 1 e 2, embora as águas tratadas nestas ETA são misturadas antes de serem lançadas na rede de distribuição para abastecer a região central da cidade. Neste caso, assim como nas ETA 3 e 4, onde também ocorre a mistura antes de serem distribuídas, foram coletadas amostras na saída da rede, ou seja, uma mistura do que são tratadas nas duas plantas. Nas ETA 3 e 4 não foi possível coletar amostras separadamente. No entanto, a análise da mistura, nos traz uma amostra mais fidedigna do que esta sendo lançado na rede de distribuição.

Na Tabela 19 estão apresentados os resultados obtidos nas análises químicas e biológicas, bem como o cálculo da resposta esperada no bioensaio com base na concentração obtida por LC-MS/MS e a potência relativa de cada composto. Foram detectados 7 dos 16 contaminantes investigados, estrona, estriol, testosterona, bisfenol A, triclosan, atrazina e cafeína. Os demais compostos que tiveram concentrações abaixo do LD não são apresentados nesta Tabela. O TCS e a TTN foram detectados apenas em uma amostra de água tratada, das ETA 1 e 2, respectivamente.

Tabela 19: Concentração (ng L^{-1}) dos compostos detectados nas amostras de água bruta e tratada nas diferentes ETA de Campinas, a resposta esperada calculada com base nos dados químicos e a resposta observada obtida por BLYES ($\text{ngE2}_{\text{equiv}} \text{L}^{-1}$).

Amostras	Concentração dos compostos (ng L^{-1})							($\text{ngE2}_{\text{equiv}} \text{L}^{-1}$)	
	E1	E3	TTN	BPA	TCS	ATZ	CAF	Resposta esperada	Resposta observada
<i>Rio Atibaia</i>	5,1	40	< 0,5	32	< 0,2	3,0	1 028	1,13	0,17
ETA 1	< 0,8	< 0,3	< 0,5	< 0,5	7,1	3,5	359	0,00	0,38
ETA 2	1,5	4,8	5,0	5,5	< 0,2	4,5	648	0,31	0,8
ETA 1 e 2	< 0,8	< 0,3	< 0,5	5,7	< 0,2	4,3	635	$2,6 \times 10^{-5}$	< 0,01
ETA 3 e 4	< 0,8	< 0,3	< 0,5	7,7	< 0,2	4,0	719	$3,5 \times 10^{-5}$	0,12
<i>Rio Capivari</i>	< 0,8	< 0,3	< 0,5	< 0,5	< 0,2	37	1 923	0,00	0,55
ETA Capivari	< 0,8	< 0,3	< 0,5	< 0,5	< 0,2	13	592	0,00	< 0,01

No rio Atibaia foram determinados E1, E3, BPA, ATZ e CAF. A atrazina não foi removida pelas ETA e esteve presente na água tratada nos mesmos níveis de concentração do manancial ($\sim 4 \text{ ng L}^{-1}$). Os estrógenos naturais E1 e E3 foram removidos com eficiência superior a 84 e 99 %, respectivamente pela maioria das ETA, com exceção da ETA 2, que apresentou concentrações próximas ao LD para os dois compostos. A remoção do BPA variou entre 76 e 98 % nas ETA 1, 2, 3 e 4. Além disso, não houve diminuição representativa da atividade estrogênica observada nas amostras tratadas provenientes do rio Atibaia.

A amostra coletada no rio Capivari apresentou atividade estrogênica igual a $0,55 \text{ ngE2}_{\text{equiv}} \text{ L}^{-1}$, e esta não foi associada a nenhum dos contaminantes abordados neste trabalho. A amostra tratada coletada na ETA Capivari não apresentou atividade estrogênica superior a $0,01 \text{ ngE2}_{\text{equiv}} \text{ L}^{-1}$ que corresponde ao LD do bioensaio utilizado, o que indica uma porcentagem de remoção superior a 98 % na planta de tratamento. Essa tendência também foi observada nas amostras coletadas durante as 13 campanhas amostrais onde, apesar dos altos valores de resposta observada para as amostras do rio Capivari (entre $0,09$ e $6,54 \text{ ngE2}_{\text{equiv}} \text{ L}^{-1}$), as amostras de água tratada dos bairros Recanto do Sol e DIC IV, provenientes da ETA Capivari apresentaram estrogenicidade entre $0,01$ e $0,08 \text{ ngE2}_{\text{equiv}} \text{ L}^{-1}$ para a maioria das amostras em que a resposta foi positiva ($\sim 60 \%$). Nas análises químicas, foram detectados apenas atrazina e cafeína nas amostras bruta e tratada do rio Capivari, sendo que a remoção de atrazina pela ETA Capivari foi de aproximadamente 65 %.

Na Figura 42 estão apresentadas as porcentagens de remoção de cafeína pelas ETA de Campinas, as quais variaram entre 30 e 70 %. Trabalhos descritos na literatura que avaliaram a remoção de cafeína por ETA apresentam remoções entre 78 e 99 % dependendo do tipo de tratamento aplicado (Loos *et al.*, 2007; Stackelberg *et al.*, 2007; Togola e Budzinski, 2008; Wang *et al.*, 2011). Stackelberg *et al.* (2007) reportaram remoção de cafeína superior a 99 % em uma planta dos EUA empregando clarificação, desinfecção e filtração em filtro de carvão ativo granulado.

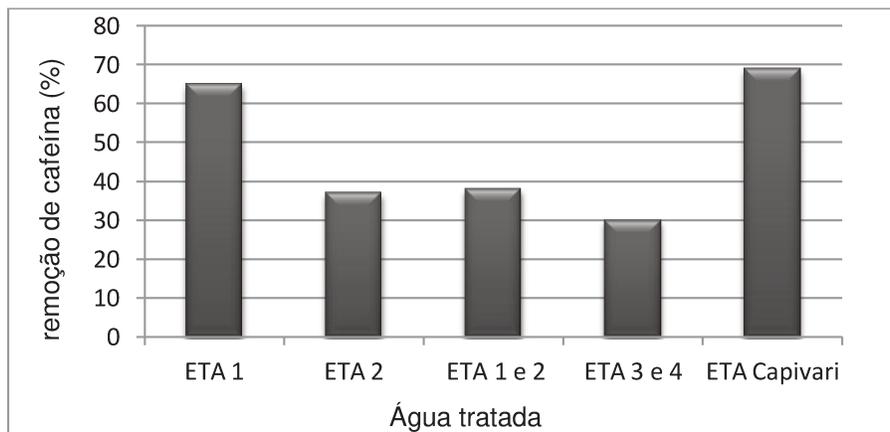


Figura 42: Porcentagem de remoção de cafeína pelas diferentes estações de tratamento de água de Campinas. Desvio padrão médio $\leq 5 \%$.

ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ÁGUA CONVENCIONAL

Os ensaios realizados na ETA Capim Fino avaliaram a eficiência de um tratamento convencional com relação à remoção dos contaminantes emergentes. A água bruta proveniente do rio Corumbataí, em Piracicaba, apresentou seis dos 16 compostos investigados: estrona, estriol, triclosan, bisfenol A, atrazina e cafeína. As concentrações (ng L^{-1}) nas diferentes etapas do tratamento estão apresentadas na Tabela 20, e a resposta obtida no bioensaio, bem com a calculada com base nas análises químicas estão apresentadas na Tabela 21.

Tabela 20: Concentrações (ng L^{-1}) dos compostos detectados na água bruta do rio Corumbataí e nas diferentes etapas do tratamento da ETA Capim Fino.

Pontos amostrais	Concentrações (ng/L)											
	E1		E3		TCS		BPA		ATZ		CAF	
	seca	cheia	seca	cheia	seca	cheia	seca	cheia	seca	cheia	seca	cheia
bruta	1,3	< 0,8	4,2	< 0,3	1,7	20,0	27,3	5,7	4,8	7,5	3 131	4 083
coagulada	0,8	< 0,8	3,9	< 0,3	1,1	22,1	2,7	< 0,5	3,0	6,9	1 786	2 032
floculada	0,8	< 0,8	< 0,3	< 0,3	1,0	16,8	2,8	< 0,5	1,3	7,8	1 308	2 381
decantada	< 0,8	< 0,8	< 0,3	< 0,3	1,5	11,3	3,5	< 0,5	1,1	13,6	1 392	997
filtrada	< 0,8	< 0,8	< 0,3	< 0,3	0,9	9,3	2,6	< 0,5	3,3	13,5	1 279	1 088
tratada	< 0,8	< 0,8	< 0,3	< 0,3	0,7	14,1	2,2	< 0,5	4,7	16,5	1 345	930

Tabela 21: Resposta esperada, calculada com base nos dados químicos e, a resposta observada obtida por BLYES para as amostras coletadas na ETA Capim Fino.

Pontos amostrais	$(\text{ngE2}_{\text{equiv}} \text{L}^{-1})$			
	Resposta esperada		Resposta observada por BLYES	
	seca	cheia	seca	cheia
bruta	0,27	$3,0 \times 10^{-5}$	0,68	0,37
coagulada	0,17	0,00	0,03	0,42
floculada	0,14	0,00	0,01	< 0,01
decantada	$1,6 \times 10^{-5}$	0,00	0,01	< 0,01
filtrada	$1,2 \times 10^{-5}$	0,00	0,01	< 0,01
tratada	$1,0 \times 10^{-5}$	0,00	0,06	< 0,01

De maneira geral, a principal etapa de remoção dos contaminantes investigados foi atribuída aos processos de pré-cloração e coagulação. Nesta planta, não foi possível coletar uma amostra bruta que tenha recebido cloro antes de receber o agente coagulante (Figura 43). Assim, a amostra analisada denominada coagulada, contém o cloro e o agente coagulante. O processo de desinfecção, no entanto, consiste do conjunto das etapas de coagulação, floculação e decantação, e observou-se que praticamente não houve diferença nas amostras coletadas após receberem o agente coagulante, no floculador e no decantador.



Figura 43: Foto da ETA Capim Fino em Piracicaba, na primeira etapa do tratamento, onde a água bruta recebe cloro e o agente coagulante antes de chegar aos floculadores.

O tratamento como um todo apresentou eficiência máxima de remoção em torno de 90 %. Os hormônios estrona e estriol foram detectados apenas no período de estiagem. As concentrações de bisfenol A foram menores no período de cheia, e compostos como triclosan, atrazina e cafeína foram quantificados em maiores

concentrações no período de elevada pluviosidade. Na Figura 44 estão apresentados as concentrações dos compostos em cada etapa do tratamento.

O rio Corumbataí, assim como o rio Atibaia e o rio Capivari, apresentou maior atividade estrogênica na amostra coletada no período de estiagem. O processo de desinfecção foi eficiente na diminuição da atividade estrogênica que atingiu valores próximos ao LD. Nas amostras coletadas na cheia, a atividade estrogênica atingiu valores menores que 0,01 ngE2_{equiv} L⁻¹ apenas com a adição de cloro e o agente coagulante.

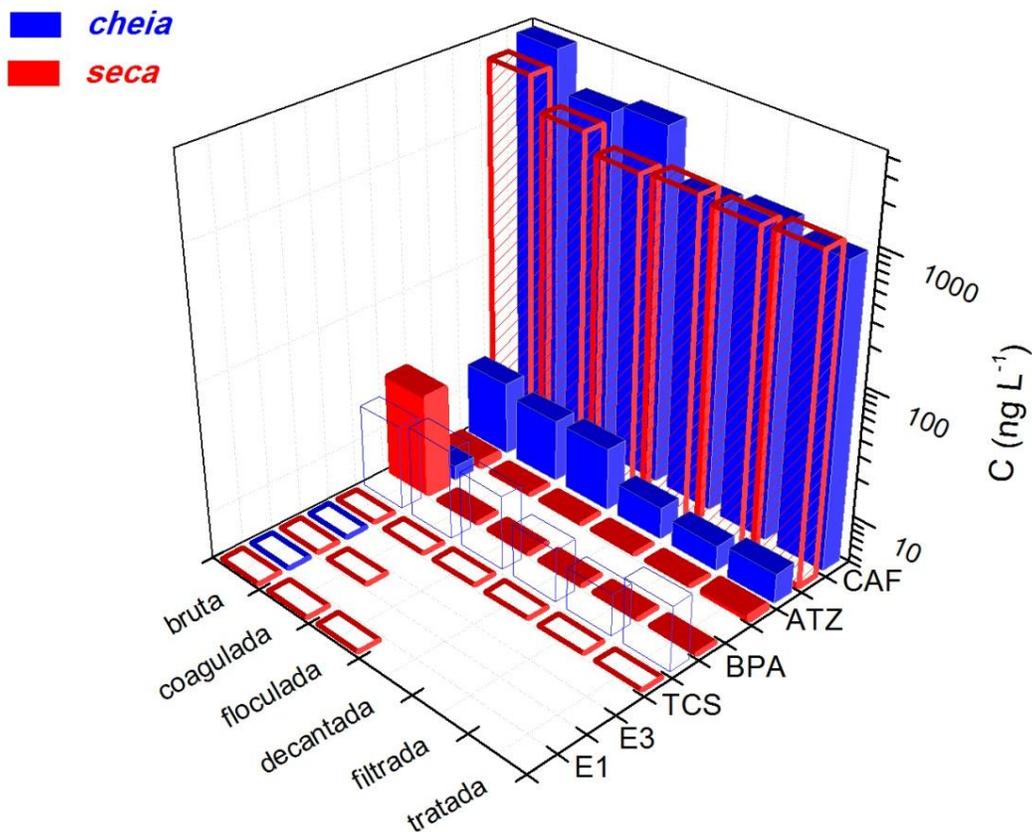


Figura 44: Concentrações dos seis contaminantes determinados em cada etapa do tratamento convencional da planta da ETA Capim Fino (SEMÁE Piracicaba). O vermelho refere-se às amostras coletadas no período de seca (agosto/2010) e, o azul, às amostras coletadas no período de cheia dos rios (fevereiro/2011).

CONTAMINANTES EMERGENTES NA ÁGUA SUBTERRÂNEA

Em Campinas 0,07 % da população é abastecida com água proveniente de poços rasos, construídos e mantidos pelos próprios moradores e, poços profundos, instalados pela SANASA que capta a água, adiciona cloro, abastece os reservatórios locais e distribui à uma pequena parte da população.

O bairro Recanto dos Dourados está localizado na região leste Campinas, ao lado do rio Atibaia, juntamente com os bairros Parque dos Pomares, Parque Xangrilá e Carlos Gomes. É um bairro composto por chácaras residenciais, não há rede de esgoto e nem asfalto no local. Há cerca de três anos, a SANASA implantou a rede de água que abastece a população com água clorada de poços profundos perfurados na região. No entanto, muitos moradores ainda utilizam poços rasos residenciais como fonte de água tratada.

Em cinco campanhas (3C, 4C, 5C, 11C e 13C) foram coletadas amostras de uma residência desta região (Recanto dos Dourados) onde a água proveniente de poços rasos é consumida sem nenhum tratamento. Dos 16 contaminantes estudados, foram detectados apenas bisfenol A e atrazina. No entanto, a atividade estrogênica obtida por BLYES variou entre 0,01 e 3,23 ngE₂_{equiv} L⁻¹ (Tabela 22). Nestes casos, a atividade estrogênica positiva indica contaminação do lençol freático por outros compostos interferentes endócrinos que não estão sendo abordados neste trabalho e que potencializam este efeito.

Em junho de 2011, um dos poços profundos que abastece a região foi amostrado, juntamente com o poço raso residencial estudado ao longo do trabalho. Nesta amostragem foram coletadas amostras clorada e não clorada do poço da SANASA e, água do poço raso (~ 7 metros) no bairro Recanto dos Dourados. Na Tabela 22 estão apresentados os resultados obtidos para as amostras de água subterrânea coletadas em Campinas.

Tabela 22: Resposta observada por BLYES ($\text{ngE2}_{\text{equiv}} \text{L}^{-1}$) e as concentrações (ng L^{-1}) para os dois dos 16 compostos detectados nas amostras de água subterrânea Campinas.

Campanha amostral	Resposta observada ($\text{ngE2}_{\text{equiv}} \text{L}^{-1}$)	ATZ (ng L^{-1})	BPA (ng L^{-1})
3C (jul /10)	0,24	< 2,4	< 0,5
4C (ago/10)	0,04	2,9	27
5C (ago/10)	-	4,1	< 0,5
11C (fev/11)	3,23	3,5	19
13C (abr/11)	0,01	< 2,4	25
poço raso (jun/11)	1,72	5,0	10
poço SANASA não clorada	0,36	3,1	37
poço SANASA clorada	4,28	< 2,4	7

Foi possível observar que a cloração removeu cerca de 80 % de bisfenol A, mas provocou um aumento na atividade estrogênica das amostras, que pode estar associado à formação de produtos de degradação derivados da cloração das amostras. No entanto, não foi possível elucidar os mecanismos de reação do cloro com os contaminantes durante este trabalho.

Loos *et al.* (2010b) avaliaram a presença de 59 contaminantes emergentes em 164 amostras de água subterrânea de 23 países europeus. Dentre eles, a atrazina foi determinada em 56 % das amostras com média igual a 8 ng L^{-1} e concentração máxima de 253 ng L^{-1} e o bisfenol A foi determinado em 40 % das amostras com concentração média de 79 ng L^{-1} e máxima de $2\,299 \text{ ng L}^{-1}$. Além desses, a cafeína foi detectada em 83 % das amostras com concentração máxima de 189 ng L^{-1} .

CONCLUSÕES

As análises realizadas em águas tratadas da cidade de Campinas apontaram a presença de seis dos 16 compostos investigados em pelo menos uma amostra. A estrona foi detectada apenas uma vez. As maiores concentrações de atrazina foram determinadas nas amostras provenientes do rio Capivari. A fenolftaleína foi determinada em apenas uma campanha em todas as amostras provenientes do rio Atibaia. As concentrações médias de bisfenol A e triclosan foram 7 e 17 ng L⁻¹, respectivamente, o que representou baixa remoção pelas ETA. E finalmente, todas as amostras analisadas apresentaram concentrações de cafeína que variaram significativamente entre os períodos de seca e cheia dos rios.

Nos mananciais que abastecem a cidade, 13 dos 16 compostos investigados foram determinados em pelo menos uma amostra, sendo que os estrogênios sintéticos levonorgestrel, mestranol e dietilestilbestrol não foram determinados em concentrações acima do limite de detecção do método analítico. Nas amostras de água superficial as concentrações dos contaminantes e a frequência de detecção foram maiores comparadas àquelas determinadas na água tratada.

A cafeína, empregada como indicador de atividade antrópica, foi determinada em todas as amostras analisadas neste trabalho em concentrações da ordem de microgramas por litro. No rio Capivari, a média de cafeína foi de 11,8 µg L⁻¹, no rio Atibaia, foi de 1,8 µg L⁻¹ e, nas amostras de água tratada as concentrações variaram entre 0,005 e 5,8 µg L⁻¹ com média de 0,77µg L⁻¹.

Todas as amostras de água subterrânea coletadas no bairro Recanto dos Dourados, em Campinas, apresentaram atividade estrogênica embora não tenham sido quantificados concentrações elevadas dos compostos abordados neste trabalho.

As estações de tratamento de água de Campinas, operando no sistema convencional foram capazes de remover entre 30 e 99 % dos contaminantes investigados.

Os ensaios na ETA Capim Fino apresentaram remoção máxima de 90 % dos compostos determinados na água bruta pelo tratamento convencional, e indicou a pré cloração e a coagulação como a principal etapa de remoção.

A análise do perfil diuturno nos mananciais apontou uma pequena diminuição nas concentrações de cafeína e estrógenos no período noturno, mas nenhuma tendência foi observada para os xenoestrogênios. O perfil semanal indicou apenas uma tendência de aportes pontuais de bisfenol A e triclosan. Para os demais compostos, não foi observada variações significativas ao longo da semana.

A otimização do preparo de amostras promoveu uma diminuição na contaminação e das perdas pelo armazenamento uma vez que as amostras começaram a ser tratadas imediatamente após as coletas. O uso das curvas extraídas promoveu a aquisição de resultados mais fidedignos, principalmente para as amostras de água tratada, apesar de ter elevado os limites de detecção do método.

Os resultados de atividade estrogênica endossaram a baixa eficiência das ETA na remoção de compostos interferentes endócrinos, principalmente no período de estiagem, uma vez que 40 % das amostras de água tratada apresentaram estrogenicidade positiva para o bioensaio empregado. Todas as amostras de água bruta apresentaram estrogenicidade que variou entre 0,06 e 6,54 ngE_{2equiv} L⁻¹. O BLYES apresentou-se como uma ferramenta simples, que pode ser empregada na avaliação rotineira da qualidade da água distribuída à população no diagnóstico de potencial interferência endócrina.

Não houve correlação entre a resposta obtida por BLYES e a resposta esperada calculada com base nos contaminantes detectados e suas respectivas estrogenicidades, o que permite pressupor que outros compostos não abordados neste

trabalho estariam potencializando esses efeitos, mesmo que efeitos antagônicos tenham sido observados nas amostras de água bruta.

A melhor correlação entre as respostas química e biológica foi obtida com a cafeína, que não é um composto interferente endócrino, mas a sua presença no manancial esta associada ao aporte de esgoto bruto que conseqüentemente lança inúmeros outros contaminantes estrogênicos nos corpos d'água. Na água tratada, a presença de cafeína indica a baixa eficiência de remoção de contaminantes orgânicos pelos sistemas convencionais de tratamento de água. Reforçando a hipótese de usá-la como um traçador, a sua determinação pode ser feita com técnicas analíticas mais simples e de menor custo, ideal para análises de rotina.

Finalmente, os resultados apresentados neste trabalho apresentam um diagnóstico sazonal da qualidade da água tratada distribuída à população de um município com alta densidade populacional e sérios problemas de saneamento básico, cenário muito comum em diversas cidades do Brasil e do mundo. Até o momento, não existe legislação ambiental que inclua os contaminantes emergentes. A apresentação do problema, no entanto, fornece subsídios reais para que as agências regulatórias e órgãos do governo obrigados a garantir a qualidade dos mananciais para seus múltiplos usos possam direcionar pesquisas e discussões no sentido de estabelecer os melhores padrões para a preservação da vida aquática, conservação dos mananciais e potabilidade da água distribuída à população, no que se referem os contaminantes emergentes.

ANEXO 1:

DETERMINAÇÃO DE INTERFERENTES ENDÓCRINOS POR HPLC-DAD-FL

Na primeira etapa do trabalho foi desenvolvido e validado, a partir de dados descritos na literatura (Montagner e Jardim, 2011; Sodr e *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2003; Lopez de Alda e Barcel o, 2000; Snyder *et al.*, 1999), um método analítico para a determina o de quinze compostos classificados como interferentes endócrinos utilizando a extra o em fase sólida (SPE) e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada aos detectores de arranjo de diodos (HPLC-DAD) e fluorescência (HPLC-FL). Os compostos investigados foram: cinco estrogênios naturais: estrona, 17 -estradiol, estriol, progesterona e testosterona; dois estrogênios sintéticos: 17 -etinilestradiol e dietilstilbestrol; dois surfactantes: 4-octilfenol e 4-nonilfenol; o bisfenol A, e cinco ésteres ftálicos: dimetilftalato, dietilftalato, benzilbutilftalato, dibutilftalato, dioctilftalato.

O método foi empregado na determina o dos contaminantes em duas campanhas amostrais a fim de se obter um perfil inicial sobre a situa o da água tratada distribuída   popula o de Campinas.

EXPERIMENTAL

A extra o dos analitos de interesse empregou a SPE utilizando como fase extratora cartuchos Oasis HLB (Waters). A separa o por HPLC foi realizada em um aparelho Shimadzu, modelo SCL 10AVP, equipado com uma coluna de guarda Shimpack G-ODS(4) octadecil de 4 mm de diâmetro interno, marca Shimadzu e uma coluna de separa o Shiseido Co. modelo CAPCLLE PAK C18 AG120 S-5  m, de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno. Acetonitrila e água foram os solventes utilizados como fase móvel a uma vazão de 0,8 mL min⁻¹. Estes foram degaseificados antes de serem bombeados por uma esta o LC 10A DVP. Dois detectores foram empregados nas análises: um detector na região do ultravioleta com arranjo de fotodiodos, modelo SPD-M10VP, e um detector por fluorescência molecular, modelo RF-10A XL, ambos da Shimadzu.

Para otimizar a separação dos quinze compostos, parâmetros relacionados à fase móvel como pH, vazão e gradiente de concentração foram avaliados a fim de aumentar a eficiência da análise cromatográfica.

Para a construção da curva analítica, toda a vidraria foi calibrada de acordo com os padrões da ISO 17025. Para a pesagem dos padrões secos foi utilizada uma balança (METTLER AE 200) também calibrada, assim como foram calibradas as pipetas volumétricas marca EPPENDORF empregadas no preparo dos quinze padrões mistos com concentrações entre 0,01 e 10 mg L⁻¹.

Além das amostras, foi feito um branco utilizando água ultrapura e um teste de recuperação dos analitos com duas amostras fortificadas contendo os quinze compostos em concentrações de 1 e 10 µg L⁻¹.

Foram realizadas duas campanhas amostrais, a primeira no mês de outubro de 2007, em um período correspondente ao final da estiagem do ano e, a segunda, em janeiro de 2008, período caracterizado por um grande volume de chuvas.

A água tratada foi amostrada em 10 residências distribuídas em diferentes pontos da cidade e provenientes de todas as ETA, tanto as oriundas do rio Atibaia, como do rio Capivari. A Tabela A1 apresenta os bairros onde foram realizadas as coletas nesta primeira fase do trabalho. As amostras foram coletadas diretamente da tubulação de entrada dos domicílios e, portanto não tiveram contato com as caixas d'água reservatório residenciais. A extração dos analitos se iniciou poucas horas depois da coleta.

Durante a segunda campanha, além da água tratada, foram coletadas águas brutas dos rios Atibaia e Capivari ao lado das estações de captação da SANASA. Nesse caso as amostras foram previamente filtradas em membranas de microfibras de vidro (Millipore) e em seguida em membranas de acetato de celulose de 0,45 µm de porosidade (Sartorius) antes da extração dos analitos por SPE.

Tabela A1: Locais de amostragem de água tratada no município de Campinas.

Pontos amostrais	Bairro	CRD proveniente
P01	Centro	ETA 1 e 2 (rio Atibaia)
P02	Jardim dos Oliveiras	ETA 1 e 2 (rio Atibaia)
P03	Jardim Santa Amália	ETA 3 e 4 (rio Atibaia)
P04	Jardim Bela Vista	ETA 3 e 4 (rio Atibaia)
P05	Barão Geraldo	ETA 3 e 4 (rio Atibaia)
P06	Vila Miguel Vicente Cury	ETA 3 e 4 (rio Atibaia)
P07	Vila 31 de março	ETA 3 e 4 (rio Atibaia)
P08	Sousas	ETA 3 e 4 (rio Atibaia)
P09	Recanto do sol II	ETA Capivari (rio Capivari)
P10	DIC IV	ETA Capivari (rio Capivari)

RESULTADOS

Foram extraídos 3 L de água tratada e 1 L de água bruta previamente percoladas por SPE. Os cartuchos foram condicionados com 6 mL de metanol e 6 mL de água ultrapura. A amostra foi percolada pelo cartucho a uma vazão de 10 mL min⁻¹. A eluição foi feita empregando 8 mL de metanol e 4 mL de acetonitrila. O solvente foi removido com nitrogênio e os analitos redissolvidos em 500 µL de acetonitrila, proporcionando dessa forma um fator de concentração de 6000 vezes para as amostras de água tratada e 2000 vezes para a água bruta.

A extração dos analitos da amostra foi iniciada poucas horas depois da coleta e os extratos ficaram armazenados em temperatura próxima a 4 °C até serem analisados.

A separação dos compostos, realizada por cromatografia líquida, empregando um gradiente de fase móvel variou a concentração de acetonitrila em água de 35 a 100 % em 45 minutos a uma vazão de 0,8 mL min⁻¹ sem o ajuste de pH que portanto, manteve-se em aproximadamente 6,5.

A detecção dos compostos utilizou os detectores de arranjo de diodos e fluorescência. Dois comprimentos de onda (λ) foram ajustados para a detecção utilizando o arranjo de diodos. Em 240 nm foi possível quantificar progesterona, testosterona e dietilestilbestrol, e em 280 nm, estrona, e os cinco ftalatos. A detecção por fluorescência ($\lambda_{\text{excitação}} = 270 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 310 \text{ nm}$) foi empregada na quantificação de estriol, 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol, 4-octilfenol, 4-nonilfenol e bisfenol A. A Figura A1 resume o método analítico empregado e as Figuras A2 e A3 apresentam os cromatogramas para uma solução padrão $10 \mu\text{g L}^{-1}$ contendo os 15 compostos de interesse detectados por arranjo de diodos e fluorescência, respectivamente.

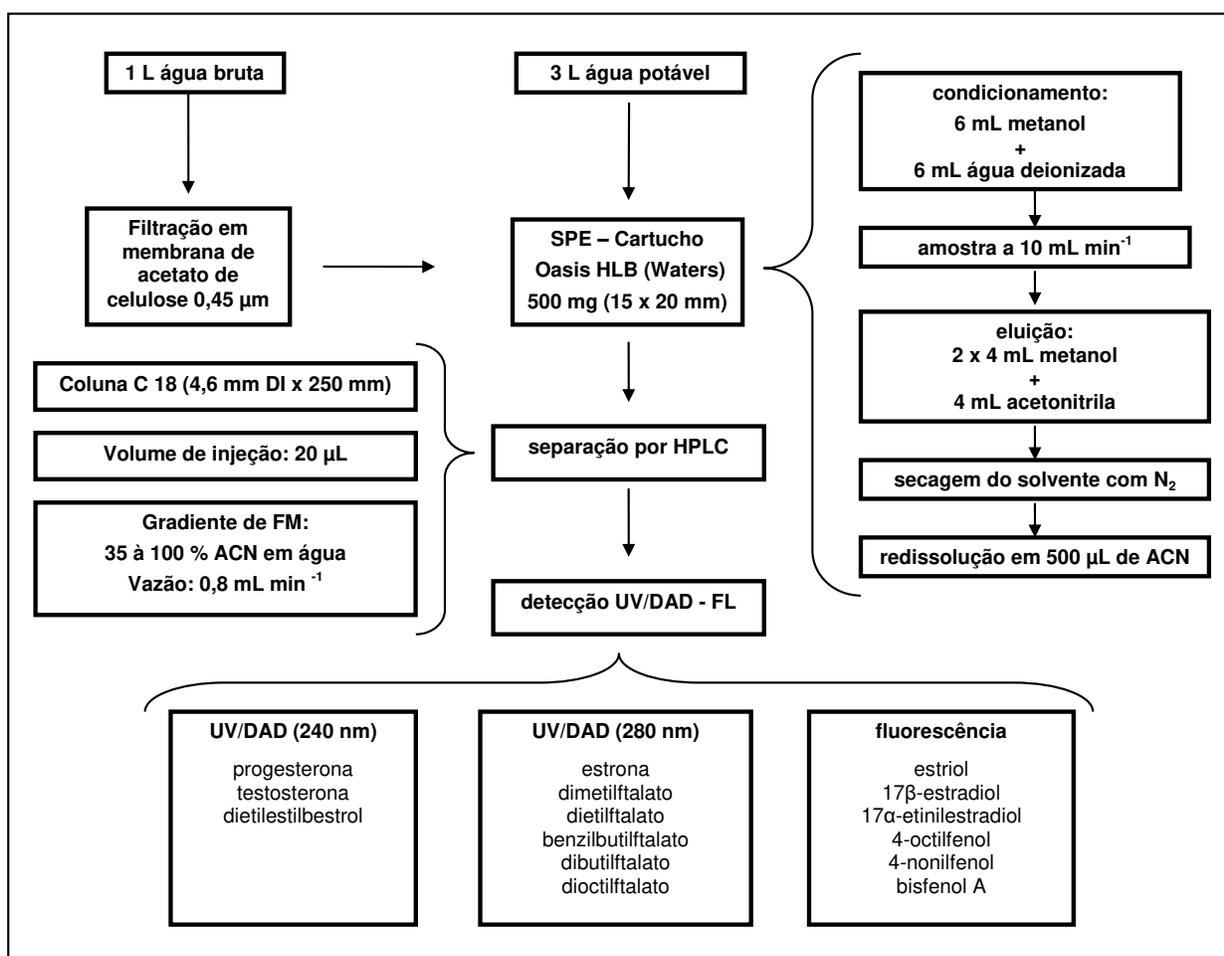


Figura A1: Esquema do método analítico empregado para determinação de contaminantes emergentes em amostras de água bruta e tratada usando SPE- HPLC- DAD-FL.

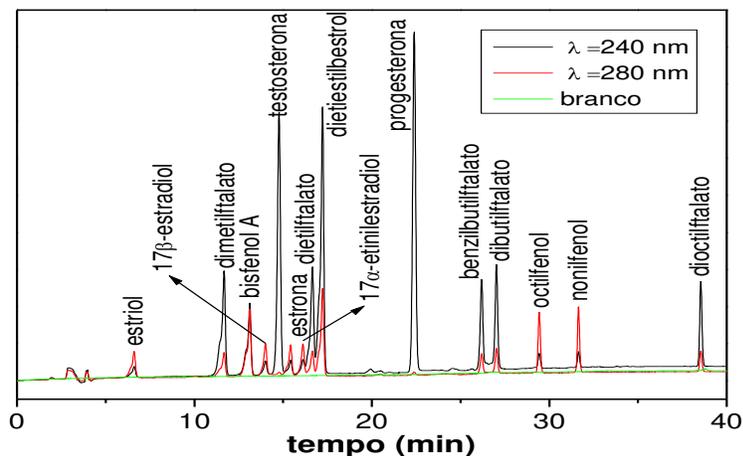


Figura A2: Cromatograma típico da separação dos quinze compostos analisados por HPLC-DAD. Em preto a detecção empregando λ de 240 nm e, em vermelho λ de 280 nm. Em verde, o cromatograma de um extrato branco.

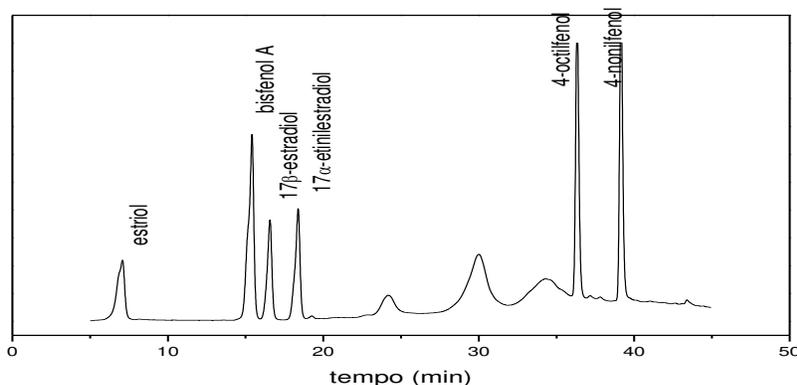


Figura A3: Cromatograma típico da separação dos seis compostos analisados por HPLC-FL. O comprimento de onda de emissão foi 270 nm, e de excitação de 310 nm.

Foram feitos testes de recuperação com duas soluções de 1 L cada contendo 1,0 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos de interesse. A recuperação variou entre 50 e 130 % (Tabela A2) e pôde ser considerada satisfatória dada a complexidade das amostras e a concentração em que são encontradas em matrizes ambientais. O fator de concentração dos compostos para esses testes foi de 2.000 vezes. Um branco foi feito com 3 litros de água deionizada e, a partir dele, não foi encontrado nenhum interferente para essa análise. Na Tabela A2 estão apresentados também os LD calculados por $(3s/b)$ e LQ $(10s/b)$ para as amostras de água tratada, onde 's' é a estimativa do desvio padrão e 'b' é a sensibilidade da curva analítica.

Tabela A2: Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos 15 compostos para amostras de água tratada, considerando um fator de concentração de 6.000 vezes, e a porcentagem de recuperação para amostras fortificadas contendo de 1,0 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Compostos	LD (ng L⁻¹)	LQ (ng L⁻¹)	% recuperação	
			1 $\mu\text{g L}^{-1}$	10 $\mu\text{g L}^{-1}$
Detecção por UV / DAD ($\lambda=240$ nm)				
testosterona	8	27	99,5	93,1
dietilstilbestrol	12	38	72,8	58,9
progesterona	6	19	87,7	83,5
Detecção por UV / DAD ($\lambda=280$ nm)				
estrona	54	178	62,7	86,3
dimetilftalato	72	241	nd	nd
dietilftalato	41	136	46,3	50,4
benzilbutilftalato	56	187	57,2	77,8
dibutilftalato	79	262	130	70,7
diocetilftalato	23	78	111	48,8
Detecção por fluorescência				
estriol	31	368	88,0	75,8
bisfenol A	31	121	99,9	94,2
17 β -estradiol	34	702	87,8	81,4
17 α -etinilestradiol	25	294	87,1	80,9
octilfenol	27	82	47,1	59,7
nonilfenol	29	55	66,7	52,5

Foram realizadas duas campanhas amostrais. A primeira em um período de seca, onde foram coletadas, em 23 de outubro de 2007, seis amostras de água tratada (P01, P05, P06, P07, P08 e P09). Na segunda campanha, realizada em um período de chuvas, as coletas foram realizadas entre os dias 16 e 21 de janeiro de 2008, em que além das amostras coletadas na primeira campanha, foram incluídas mais quatro locais de coleta de água tratada (P02, P03, P04 e P10) e duas amostras de água bruta (ao lado das estações de captação da SANASA nos rios Atibaia e Capivari).

Dentre os quinze compostos analisados, cinco deles foram determinados em amostras de água tratada em concentrações maiores que os limites de quantificação do método. Foram dois plastificantes, o dibutilftalato e o dioctilftalato; dois surfactantes,

octilfenol e o nonilfenol, e um hormônio, o estriol. Nas Tabelas A3 e A4 estão apresentados os resultados obtidos nas duas campanhas. Os compostos não detectados acima dos limites de quantificação do método analítico não foram incluídos nessas Tabelas.

Tabela A3: Concentração (ng L^{-1}) dos 5 compostos determinados nas 6 amostras de água tratada da 1ª campanha amostral realizada em 2007 durante um período de estiagem.

Amostras	<i>dibutilftalato</i> (ng L^{-1})	<i>diocetilftalato</i> (ng L^{-1})	<i>octilfenol</i> (ng L^{-1})	<i>nonilfenol</i> (ng L^{-1})	<i>estriol</i> (ng L^{-1})
P01	8.878	281	< LQ	< LD	< LD
P05	6.105	288	< LQ	< LQ	< LD
P06	4.821	121	< LQ	< LQ	< LD
P07	8.781	< LD	< LQ	< LD	125
P08	5.206	< LD	< LD	< LD	< LD
P09	4.984	< LD	1.137	88	< LD

Tabela A4: Concentração (ng L^{-1}) dos 4 compostos determinados nas 10 amostras de água tratada da 2ª campanha amostral realizada em 2008 em um período de alta pluviosidade.

Amostras	<i>dibutilftalato</i> (ng L^{-1})	<i>diocetilftalato</i> (ng L^{-1})	<i>octilfenol</i> (ng L^{-1})	<i>nonilfenol</i> (ng L^{-1})
P01	9.553	438	< LD	< LD
P02	4.771	475	117	130
P03	5.425	201	115	< LD
P04	6.839	169	< LD	< LD
P05	6.902	419	171	< LD
P06	11.585	249	129	< LD
P07	7.180	193	< LD	< LD
P08	3.427	175	< LD	< LD
P09	7.349	258	127	< LD
P10	9.277	< LD	< LD	< LD

O estriol é um estrogênio natural que é excretado diariamente pela urina dos mamíferos. Foi detectado na amostra P07 (Vila 31 de março, região leste de Campinas) que recebe água proveniente das ETA 3 e 4 do rio Atibaia, porém em concentração inferior ao limite de quantificação do método.

Os surfactantes 4-octilfenol e 4-nonilfenol foram determinados na primeira campanha apenas na amostra P09 (Recanto do Sol II, região sul de Campinas) a qual é proveniente da ETA Capivari. As concentrações desses compostos nesse ponto amostral diminuiram na segunda campanha, ficando menor que o limite de detecção para o 4n-NP. Porém, nesse período de alta pluviosidade, outros quatro locais amostrados apresentaram concentrações entre 115 e 170 ng L⁻¹ desses contaminantes.

O dioctilftalato foi determinado em 50 % das amostras da primeira campanha, e esse índice aumentou para 90 % na segunda campanha, onde também se observou um aumento na concentração desse analito no período de cheia dos rios. O dibutilftalato foi determinado em todas as amostras de água tratada em concentrações que variaram entre 3,4 e 11,5 µg L⁻¹.

Na segunda campanha, além da água tratada, foram analisadas duas amostras de água bruta dos mananciais, rios Atibaia e Capivari. A Tabela A5 apresenta os resultados obtidos para cada um dos quinze compostos de interesse bem como os respectivos limites de detecção e quantificação para um fator de concentração de 2.000 vezes.

No rio Atibaia, principal corpo d'água que abastece o município de Campinas foram determinados os plastificantes dibutilftalato e dioctilftalato além do hormônio testosterona em concentração próxima a 330 ng L⁻¹. No rio Capivari, foram determinados além desses três contaminantes, o estriol e o 4n-octilfenol.

Tabela A5: Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos quinze compostos analisados em 1 litro de água bruta e, concentração (ng L⁻¹) dos contaminantes nas amostras dos rios Atibaia e Capivari durante o período de cheia dos rios.

Compostos	LD (ng L⁻¹)	LQ (ng L⁻¹)	Concentração (ng L⁻¹)	
			rio Atibaia	rio Capivari
estrone	162	534	< LD	< LD
17β-estradiol	102	2.106	< LD	< LD
estriol	93	1.104	< LD	1.398
progesterona	18	57	< LD	< LD
testosterona	24	81	329	175
17α-etinilestradiol	75	882	< LD	< LD
dietilstilbestrol	36	114	< LD	< LD
octilfenol	81	246	< LD	255
nonilfenol	87	165	< LD	< LD
bisfenol A	93	363	< LD	< LD
dimetilftalato	216	723	< LD	< LD
dietilftalato	123	408	< LD	< LD
benzilbutilftalato	168	561	< LD	< LD
dibutilftalato	237	786	3.378	2.953
diocetilftalato	69	234	674	465

CONCLUSÕES SOBRE O USO DO HPLC-DAD E HPLC-FL

O método proposto mostrou-se satisfatório para a determinação dos quinze compostos interferentes endócrinos em água, sendo, os limites de detecção dependentes dos fatores de concentração obtidos durante a etapa de extração. Para 1 L de amostra, os limites de quantificação obtidos entre (57 e 2.106 ng L⁻¹) não atenderam as necessidades principais do projeto relacionadas a quantificação de contaminantes emergentes em concentrações de sub-ng L⁻¹, as quais já são responsáveis por causarem efeitos à saúde em diversos seres vivos expostos cronicamente a essas substâncias.

Por outro lado, o HPLC-DAD e HPLC-FL são ferramentas analíticas mais simples e de menor custo que o LC-MS/MS que podem ser utilizadas na quantificação desses contaminantes em amostras de águas superficiais e de esgoto, onde as concentrações obtidas são de µg L⁻¹.

As concentrações dos cinco compostos determinados nas amostras de água tratada foram consideradas altas para essa matriz, sendo que estas foram ainda maiores nas amostras dos mananciais, o que demonstra uma baixa eficiência de remoção deles pelas estações de tratamento de água.

A partir dessa primeira análise exploratória, foram selecionados dez dos quinze compostos para serem estudados com maiores detalhes ao longo do trabalho. Estes, e outros seis incorporados posteriormente ao método, poderiam ser detectados simultaneamente por LC-MS/MS, o qual foi adquirido pelo LQA durante o Projeto Temático FAPESP 07/58449-2 *“Ocorrência e Atividade Estrogênica de Interferentes Endócrinos em Água para Consumo Humano e em Mananciais do Estado de São Paulo”* e instalado em dezembro de 2008.

Os ésteres ftálicos não foram considerados nas análises futuras, principalmente pelo alto risco de contaminação, uma vez que vários tubos e conexões do equipamento são confeccionados com materiais plásticos e não foi possível obter um branco adequado a quantificação em concentrações traços.

ANEXO 2:

RESULTADOS DO BIOENSAIO PARA ÁGUAS TRATADAS E SUPERFICIAIS

ANEXO 2: Resultados químicos (ng L^{-1}) e biológicos ($\text{ngE2}_{\text{equiv}} \text{L}^{-1}$) obtidos para as amostras de água tratada e superficial. A resposta observada foi obtida por BLYES, e a resposta esperada refere-se à resposta calculada com base nas análises químicas e na potência relativa de cada composto expressa ao lado das concentrações.

Sendo:

1C – 13C: campanhas amostrais;

CE: ponto amostral de água tratada no Centro;

NE: ponto amostral de água tratada no Nova Europa;

MSA: ponto amostral de água tratada no Mansões Santo Antônio;

BV: ponto amostral de água tratada no Jardim Boa Vista;

SS: ponto amostral de água tratada em Sousas;

BG: ponto amostral de água tratada em Barão Geraldo;

RS: ponto amostral de água tratada no Recanto do Sol II;

DIC: ponto amostral de água tratada no DIC IV;

2065: ponto amostral no rio Atibaia à montante do ponto de captação e do aporte do ribeirão Pinheiros;

ATB: ponto amostral no rio Atibaia ao lado da estação de captação de água;

CAP: ponto amostral no rio Capivari ao lado da ETA Capivari.

ANEXO 2: Resultados químicos (ng L⁻¹) e biológicos (ngE_{2equiv} L⁻¹) das amostras de água tratada de Campinas.

Amostra	Resposta observada	Resposta esperada	E1 (0,20)	Phph (2,37E-07)	BPA (4,60E-06)	TCS	ATZ	CAF
1C CE	< 0,01	2,01E-06		8,5 2,0E-06			nd	488
1C NE	< 0,01	1,04E-04		10,8 2,6E-06	22 1,01E-04		nd	665
1C MSA	< 0,01	8,35E-05		14,8 3,5E-06	17,4 8,00E-05	24	nd	794
1C BV	0,01	4,90E-06		20,7 4,9E-06		21	nd	814
1C SS	< 0,01	1,23E-04		13,2 3,1E-06	26 1,20E-04		nd	565
1C BG	< 0,01	1,35E-06		5,7 1,3E-06		17	nd	458
1C RS	0,2	0				22	nd	579
1C DIC	< 0,01	0					nd	829
3C CE	0,02	0						95
3C NE	0,02	0						47
3C MSA	0,1	0						65
3C BV	0,06	0						65
3C SS	0,66	0						77
3C BG	0,01	0						70
3C RS	0,01	0						122
3C DIC	< 0,01	0						93
4C CE	0,08	7,36E-06			1,6 7,36E-06		0,9	1204
4C NE	0,23	1,79E-05			3,9 1,79E-05		1,1	845
4C MSA	1,33	1,43E-05			3,1 1,43E-05		1,4	756
4C BV	0,02	1,01E-05			2,2 1,01E-05		4,1	1409
4C SS	0,04	1,15E-05			2,5 1,15E-05		2,7	1066
4C BG	0,01	0					2,8	1009
4C RS	0,08	0					231	1384
4C DIC	0,01	0					88	1273
9C CE	< 0,01	0					15,6	149
9C NE	< 0,01	0					39	81
9C MSA	< 0,01	0					7,4	261
9C BV	< 0,01	0					7,3	114
9C SS	< 0,01	0					6,6	47
9C BG	< 0,01	0					16	100
9C DIC	0,01	0					28	69
10C CE	0,06	6,90E-06			1,5 6,90E-06	7,1	42	241
10C NE	0,13	1,33E-05			2,9 1,33E-05	16,6	21	304
10C MSA	< 0,01	0					17	444
10C BV	< 0,01	1,70E-05			3,7 1,70E-05		35	239
10C SS	< 0,01	1,15E-05			2,5 1,15E-05		29	686
10C BG	< 0,01	0					38	305
10C RS	< 0,01	0					55	498
10C DIC	< 0,01	1,10E-05			2,4 1,10E-05		68	511
11C CE	< 0,01	1,52E-05			3,3 1,52E-05		14	432
11C NE	0,02	1,29E-05			2,8 1,29E-05		17	414
11C MSA	< 0,01	2,44E-05			5,3 2,44E-05		9,5	510
11C BV	< 0,01	5,98E-06			1,3 5,98E-06		15	671
11C SS	< 0,01	9,66E-06			2,1 9,66E-06		7	1016
11C BG	< 0,01	1,89E-05			4,1 1,89E-05		15,6	458
11C RS	< 0,01	0					520	574
11C DIC	< 0,01	1,38E-05			3 1,38E-05		354	795
12C CE	< 0,01	4,60E-05			10 4,60E-05		13	248
12C MSA	< 0,01	5,06E-05			11 5,06E-05		15	330
12C BV	< 0,01	4,14E-05			9 4,14E-05		30	262
12C SS	< 0,01	3,22E-05			7 3,22E-05		17	364
12C BG	< 0,01	7,82E-05			17 7,82E-05		40	47
12C RS	0,01	9,90E-01	5 0,99		21 9,66E-05		687	801
12C DIC	< 0,01	5,06E-05			11 5,06E-05		684	430
13C CE	< 0,01	9,20E-06			2 9,20E-06		11	431
13C MSA	0,45	2,76E-05			6 2,76E-05		11	561
13C BV	< 0,01	1,84E-05			4 1,84E-05		7	437
13C MSA	< 0,01	4,60E-05			10 4,60E-05		8	398
13C BG	< 0,01	4,60E-05			10 4,60E-05		28	57
13C RS	0,04	3,68E-05			8 3,68E-05		89	428
13C DIC	< 0,01	3,68E-05			8 3,68E-05		81	366

ANEXO 2: Resultados químicos (ng L⁻¹) e biológicos (ngE_{equiv} L⁻¹) das amostras de água superficial de Campinas (SP).

Amostra	Resposta observada	Resposta esperada	E1	0,20	E2	1	E3	3E-03	TTN	2,8E-05	EE2	7,9	BPA	4,6E-06	NP	3,8E-03	Phph	2,4E-07	TCS	ATZ	CAF	OP	
1C 2065	0,07	1,24	6,1	1,21			10,6	0,03					141	0,0006			17,1	4,0E-06	36	nd	919		
3C 2065	0,37	0,06	0,3	0,06									2	9E-06						nd	343		
4C 2065	1,10	3,11	1,5	0,30	2,8	2,8	3,9	0,01					17,3	8E-05						0,8	1907		
5C 2065	1,01	1,91	3,5	0,69	1,2	1,2	5,4	0,02	1,6	5E-05	3,1						1,7	4,0E-07	10	2	9680		
6C 2065	1,37	0,98	4,9	0,97			2,8	0,01	1,6	5E-05			5,2	2E-05					22,5	3	4737		
8C 2065	0,24	1,74	8,8	1,74																6,2	274		
9C 2065	0,36	1,94	9,8	1,94																8,3	279		
10C 2065	0,07	0,85	4,3	0,85									17,6	8E-05						7	645		
11C 2065	0,20	1,17	5,9	1,17									27,5	0,0001					17	7	874		
12C 2065	0,60	0,32	1	0,20			38	0,12					9	4E-05						31	533		
13C 2065	0,53	0,86	4	0,79			23	0,07					21	1E-04						72	402		
1C ATB	0,19	0,93	4,7	0,93									123	0,0006			33	7,8E-06	37,5	nd	700		
3C ATB	46,88	21,88	3,6	0,71	2,1	2,1	2,0	0,01			2,4	19	2	9E-06	27	0,10	1,2	2,8E-07	4,5	nd	366	15	
4C ATB	1,18	3,01	1,5	0,30	2,7	2,7	4	0,01					21	1E-04						7,5	1766		
5C ATB	1,04	2,65	3,2	0,63	2,0	2,0	6,8	0,02	2,4	7E-05	2,7		10	5E-05			2,0	4,7E-07	8	7	8626		
6C ATB	3,88	1,05	5,2	1,03			5,6	0,02	1,2	3E-05			5,2	2E-05					29,5	16	5925		
8C ATB	1,40	2,40	12	2,40																6,7	241		
9C ATB	0,10	1,50	7,6	1,50																11	307		
10C ATB	0,06	0,94	4,5	0,89			17	0,05					26	0,0001					8	13	674		
11C ATB	0,93	1,13	5,7	1,13									22,4	0,0001					12	3	706		
12C ATB	0,34	0,20	1	0,20			31						17	8E-05						31	569		
13C ATB	0,36	0,40	2	0,40			24						96	0,0004						28	511		
1C CAP	3,24	0,05					16,5	0,05													nd	19255	31
3C CAP	0,94	0,02	0,1	0,02									2	9E-06							nd	698	
4C CAP	1,88	2,87	1,3	0,26	2,6	2,6	4,3	0,01					7,7	4E-05						91	6276		
5C CAP	3,14	1,96	2,1	0,42	1,5	1,5	15,2	0,05	3,9	0,0001							1,6	3,8E-07	49	68	41750		
6C CAP	0,94	3,96E-05							1,4	4E-05										8,3	37,5	9676	
8C CAP	0,40	0,00																		2,2	6,3	3047	
9C CAP	0,09	1,60	8,1	1,60									51,4	0,0002					45,5	86	668		
10C CAP	0,29	0,04					11,3	0,04					9,1	4E-05						200	11606		
11C CAP	0,52	9,80E-05											21,3	1E-04						8	10808		
12C CAP	0,38	1,27	6	1,19			25	0,08					34	0,0002						611	3855		
13C CAP	6,54	0,35					114	0,35					35	0,0002						103	22533		

ANEXO 3:

CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS NAS ÁGUAS TRATADAS E SUPERFICIAIS DE CAMPINAS (SP)

ANEXO 3: Concentrações (ng L^{-1}), média, desvio padrão e frequência de detecção dos 16 contaminantes emergentes abordados neste trabalho nas amostras de água tratada e superficial, coletadas nas 13 campanhas amostrais realizadas durante abril de 2010 e abril de 2011.

Sendo:

1C – 13C: campanhas amostrais;

CE: ponto amostral de água tratada no Centro;

NE: ponto amostral de água tratada no Nova Europa;

MSA: ponto amostral de água tratada no Mansões Santo Antônio;

BV: ponto amostral de água tratada no Jardim Boa Vista;

SS: ponto amostral de água tratada em Sousas;

BG: ponto amostral de água tratada em Barão Geraldo;

RS: ponto amostral de água tratada no Recanto do Sol II;

DIC: ponto amostral de água tratada no DIC IV;

ATB2065: ponto amostral no rio Atibaia à montante do ponto de captação e do aporte do ribeirão Pinheiros;

ATB captação: ponto amostral no rio Atibaia ao lado da estação de captação de água;

Capivari: ponto amostral no rio Capivari ao lado da ETA Capivari.

ANEXO 3: Concentrações (ng/L) dos contaminantes emergentes na água tratada de Campinas (SP).

CE	Phph	TCS	BPA	ATR	CAF	MAS	Phph	TCS	BPA	ATR	CAF	SS	Phph	TCS	BPA	ATR	CAF	RD	E1	TCS	BPA	ATR	CAF
1C	8,5	< 0,2	< 0,5	ND	488	1C	15	24	17	ND	794	1C	13,2	< 0,2	26	ND	565	1C	< 0,8	21,8	< 0,5	ND	579
2C	< 1,1	8,0	< 0,5	ND	1004	2C	< 1,1	6,7	< 0,5	ND	608	2C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	ND	720	2C	< 0,8	< 0,2	< 0,5	ND	539
3C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	ND	95	3C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	ND	65	3C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	ND	77	3C	< 0,8	< 0,2	< 0,5	ND	122
4C	< 1,1	< 0,2	1,6	0,9	1204	4C	< 1,1	< 0,2	3,1	1,4	756	4C	< 1,1	< 0,2	2,5	2,7	1066	4C	< 0,8	< 0,2	< 0,5	231	1384
5C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	11	5845	5C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	17	4733	5C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	6,3	2753	5C	< 0,8	7,8	< 0,5	117	3029
6C	< 1,1	19	< 0,5	14	2025	6C	< 1,1	30	< 0,5	29	1121	6C	< 1,1	37	< 0,5	29	1007	6C	< 0,8	11,1	< 0,5	8,3	750
7C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	8,1	302	7C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	6,7	74	7C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	7,0	316	7C	< 0,8	< 0,2	< 0,5	36	169
8C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	6,8	224	8C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	7,2	59	8C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	4,1	176	8C	< 0,8	< 0,2	< 0,5	12	62
9C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	16	149	9C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	7,4	261	9C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	6,6	47	9C	ND	ND	ND	ND	ND
10C	< 1,1	7,1	1,5	42	241	10C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	17	444	10C	< 1,1	< 0,2	2,5	29	686	10C	< 0,8	< 0,2	< 0,5	55	498
11C	< 1,1	24	3,3	14	432	11C	< 1,1	26	5,3	9,5	510	11C	< 1,1	11	2,1	6,9	1016	11C	< 0,8	20,3	3,0	520	574
12C	< 1,1	< 0,2	10	13	248	12C	< 1,1	< 0,2	11	15	330	12C	< 1,1	< 0,2	7,0	17	364	12C	5,0	< 0,2	21,0	687	801
13C	< 1,1	< 0,2	2,0	11	431	13C	< 1,1	< 0,2	6,0	11	561	13C	< 1,1	< 0,2	10	8,0	398	13C	< 0,8	< 0,2	8,0	89	428
M		15	3,7	14	976	M		21	8,6	12	794	M		24	8,4	12	707	M	5,0	15,3	10,7	195	745
DP		8,3	3,6	11	1561	DP		10	5,7	7,8	1225	DP		19	9,2	9,8	707	DP		6,9	9,3	245	802
NE	Phph	TCS	BPA	ATR	CAF	BV	Phph	TCS	BPA	ATR	CAF	BG	Phph	TCS	BPA	ATR	CAF	DIC	E1	TCS	BPA	ATR	CAF
1C	10,8	< 0,2	22,0	ND	665	1C	21	21	< 0,5	ND	814	1C	5,7	17	< 0,5	ND	458	1C	< 0,8	< 0,2	< 0,5	ND	829
2C	< 1,1	2,4	< 0,5	ND	702	2C	< 1,1	9,3	< 0,5	ND	1112	2C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	ND	508	2C	< 0,8	< 0,2	< 0,5	ND	693
3C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	ND	47	3C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	ND	65	3C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	ND	70	3C	< 0,8	< 0,2	< 0,5	ND	93
4C	< 1,1	< 0,2	3,9	1,1	845	4C	< 1,1	< 0,2	2,2	4,1	1409	4C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	2,8	1009	4C	< 0,8	< 0,2	< 0,5	88	1273
5C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	39	3027	5C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	26	4649	5C	< 1,1	20	< 0,5	24	4100	5C	< 0,8	< 0,2	< 0,5	102	4324
6C	< 1,1	13	< 0,5	28	746	6C	< 1,1	15	< 0,5	9,9	1413	6C	< 1,1	19	< 0,5	4,9	1484	6C	< 0,8	< 0,2	< 0,5	18	633
7C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	8,0	285	7C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	7,6	165	7C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	9,5	97	7C	< 0,8	< 0,2	< 0,5	12	131
8C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	8,0	103	8C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	5,7	102	8C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	3,9	183	8C	< 0,8	< 0,2	< 0,5	11	66
9C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	39	81	9C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	7,3	114	9C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	16	100	9C	< 0,8	< 0,2	< 0,5	28	69
10C	< 1,1	17	2,9	21	304	10C	< 1,1	< 0,2	3,7	35	239	10C	< 1,1	< 0,2	< 0,5	38	305	10C	< 0,8	< 0,2	2,4	68	511
11C	< 1,1	16	2,8	17	414	11C	< 1,1	16	1,3	15	671	11C	< 1,1	15	4,1	16	458	11C	< 0,8	20,0	< 0,5	354	795
12C	ND	ND	ND	ND	ND	12C	< 1,1	< 0,2	9,0	30	262	12C	< 1,1	< 0,2	17	40	47	12C	< 0,8	< 0,2	11	684	430
13C	ND	ND	ND	ND	ND	13C	< 1,1	< 0,2	4,0	7,0	437	13C	< 1,1	< 0,2	10	28	57	13C	< 0,8	< 0,2	8	81	366
M		12	7,9	20	656	M		15	4,0	15	881	M		18	10,4	18	683	M		20,0	7,1	145	786
DP		6,6	9,4	14	836	DP		4,9	3,0	11	1232	DP		2,2	6,5	14	1111	DP		4,4	215	1122	

ANEXO 3: Concentrações (ng/L) dos contaminantes emergentes nos mananciais de Campinas (SP).

ATB2065	E1	E2	E3	PROG	TTN	EE2	MEE	NGT	DES	BPA	OP	NP	TCS	Phph	ATZ	CAF
1C	6,1	< 1,8	10,6	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	141	< 3,2	< 1,5	36	17	ND	919
2C	< 0,8	< 1,8	< 0,3	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	2,6	< 3,2	< 1,5	5,8	< 1,1	ND	1430
3C	0,8	< 1,8	< 0,3	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	2,1	< 3,2	< 1,5	< 0,2	0,7	ND	343
4C	1,5	2,8	3,9	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	17	< 3,2	< 1,5	< 0,2	< 1,1	2,4	1907
5C	3,5	1,8	5,4	< 0,8	1,6	3,1	< 2,6	< 0,3	< 1,0	< 0,5	ND	ND	10	1,7	2,5	9680
6C	4,9	< 1,8	2,8	< 0,8	1,6	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	5,2	< 3,2	< 1,5	23	< 1,1	3,1	4737
7C	2,2	< 1,8	< 0,3	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	< 0,5	< 3,2	< 1,5	< 0,2	< 1,1	4,3	474
8C	8,8	< 1,8	< 0,3	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	< 0,5	ND	ND	< 0,2	< 1,1	6,2	274
9C	9,8	< 1,8	< 0,3	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	< 0,5	ND	ND	< 0,2	< 1,1	8,3	279
10C	4,3	< 1,8	< 0,3	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	18	< 3,2	< 1,5	< 0,2	< 1,1	6,9	645
11C	5,7	< 1,8	< 0,3	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	22	< 3,2	< 1,5	12	< 1,1	2,7	706
12C	1,0	< 1,8	38	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	9,0	< 3,2	< 1,5	< 0,2	< 1,1	31	533
13C	4,0	< 1,8	23	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	21	< 3,2	< 1,5	< 0,2	< 1,1	72	402
Média	4,4	2,3	14		1,6	3,1				26			17	6,5	14	1718
s	2,9	0,7	14		0,0					44			12	9,2	22	2680
ATB	E1	E2	E3	PROG	TTN	EE2	MEE	NGT	DES	BPA	OP	NP	TCS	Phph	ATZ	CAF
1C	4,7	< 1,8	< 0,3	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	123	< 3,2	< 1,5	38	33	ND	700
2C	< 0,8	< 1,8	5,5	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	7,7	< 3,2	< 1,5	20	< 1,1	ND	1988
3C	3,6	2,1	2,0	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	1,9	15	27	4,5	1,2	ND	366
4C	1,5	2,7	4,0	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	21	< 3,2	< 1,5	< 0,2	< 1,1	7,5	1766
5C	3,2	2,0	6,8	< 0,8	2,4	2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	10	ND	ND	8,0	2,0	6,9	8626
6C	5,2	< 1,8	5,6	< 0,8	1,2	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	5,2	< 3,2	< 1,5	30	< 1,1	16	5925
7C	1,9	< 1,8	< 0,3	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	< 0,5	< 3,2	< 1,5	< 0,2	< 1,1	13	554
8C	12	< 1,8	< 0,3	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	< 0,5	ND	ND	< 0,2	< 1,1	6,7	241
9C	7,6	< 1,8	< 0,3	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	< 0,5	ND	ND	< 0,2	< 1,1	11	307
10C	4,5	< 1,8	17	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	26	< 3,2	< 1,5	8,2	< 1,1	13	674
11C	5,9	< 1,8	< 0,3	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	28	< 3,2	< 1,5	17	< 1,1	7,0	874
12C	1,0	< 1,8	31	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	17	< 3,2	< 1,5	< 0,2	< 1,1	31	569
13C	2,0	< 1,8	24	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	96	< 3,2	< 1,5	< 0,2	< 1,1	28	511
Média	4,4	2,3	12		1,8	2,7				34	15	27	18	12	14	1777
s	3,1	0,4	11		0,8					41			12	18	8,8	2556
Capivari	E1	E2	E3	PROG	TTN	EE2	MEE	NGT	DES	BPA	OP	NP	TCS	Phph	ATZ	CAF
1C	< 0,8	< 1,8	17	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	< 0,5	31	< 1,5	289	1,4	ND	19.255
2C	< 0,8	< 1,8	15	1,7	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	< 0,5	< 3,2	< 1,5	77	< 1,1	ND	20.052
3C	0,8	< 1,8	< 0,3	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	1,8	< 3,2	< 1,5	< 0,2	< 1,1	ND	698
4C	1,3	2,6	4,3	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	7,7	< 3,2	< 1,5	< 0,2	< 1,1	91	6.276
5C	2,1	1,8	15	< 0,8	3,9	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	< 0,5	ND	ND	49	1,6	68	41.750
6C	< 0,8	< 1,8	< 0,3	< 0,8	1,4	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	< 0,5	< 3,2	< 1,5	8,3	< 1,1	38	9.676
7C	< 0,8	< 1,8	< 0,3	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	< 0,5	< 3,2	< 1,5	< 0,2	< 1,1	227	2.908
8C	< 0,8	< 1,8	< 0,3	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	< 0,5	ND	ND	2,2	< 1,1	6,3	3.047
9C	8,1	< 1,8	< 0,3	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	51	ND	ND	46	< 1,1	86	668
10C	< 0,8	< 1,8	11	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	9,1	< 3,2	< 1,5	< 0,2	< 1,1	200	11.606
11C	< 0,8	< 1,8	< 0,3	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	21	< 3,2	< 1,5	3,4	< 1,1	7,9	10.808
12C	6,0	< 1,8	25	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	34	< 3,3	< 1,5	< 0,2	< 1,1	611	3.855
13C	< 0,8	< 1,8	114	< 0,8	< 0,5	< 2,7	< 2,6	< 0,3	< 1,0	35	< 3,4	< 1,5	< 0,2	< 1,1	103	22.533
Média	3,7	2,2	29	1,7	2,7					23	31		68	1,5	144	11779,4
s	3,2	0,6	38		1,8					18			101	0,1	180	11683
frequencia de detecção	(29/39)	(7/39)	(21/29)	(1/39)	(6/39)	(2/39)				(26/39)	(2/30)	(1/30)	(19/39)	(8/39)	(30/30)	(39/39)
	74%	18%	54%	3%	15%	5%	0%	0%	0%	67%	7%	3%	49%	21%	100%	100%

REFERÊNCIAS

- ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental **(2010)** Subsídios para a legislação nacional de água para consumo humano; *Revista ABES-SP*; 1; 77 pp.
- Aerni H.R., Kobler B., Rutishauser B.V., Wettstein F.E., Fischer R., Giger W., Hungerbühler A., Marazuela M.D., Peter A., Schönenberger R., Vögeli A.C., Suter M.J., Eggen R.I. **(2004)** Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents; *Anal. Bioanal. Chem.*; 378; p 688.
- AGRITEMPO - Sistema de Monitoramento Agrometeorológico, [<http://www.agritempo.gov.br/agroclima/pesquisaWeb?uf=SP>] acessado em junho de 2011.
- Alvarez D.A., Cranor W.L., Perkins S.D., Schroeder V.L., Iwanowicz L.R., Clark R.C., Guy C.P., Pinkney A.E., Blazer V.S. **(2009)** Reproductive health of bass in the Potomac, USA, drainage: Part 2. Seasonal occurrence of persistent and emerging organic contaminants; *Environ. Toxicol. Chem.*; 28; p 108.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária **(2002)** RESOLUÇÃO - RE Nº 571, de 5 de Abril de 2002.
- Aranami K., Readman J.W. **(2007)** Photolytic degradation of triclosan in freshwater and seawater; *Chemosphere*; 66; p 1052.
- Arnold S.F., Robinson M.K., Notides A.C., Guillette L.J., Lachlan J.A. **(1996)** A yeast estrogen screen for examining relative exposure of cells to natural and xenoestrogens; *Environ. Health Persp.*; 104; p 544.
- ASTM - American Society for Testing and Materials **(2006)** *Method WK1521: New Standard Test Method for Determination of Nonylphenol and Nonylphenol Ethoxylates in Environmental Waters.*
- ASTDR - Agency for Toxic Substances and Disease, National Center for Environmental Health **(2008)** *Public Health Statement for Atrazine.*
- Auriol M., Filali-Meknassi Y., Adams C.D., Tyagi R.D. **(2006)** Natural and synthetic hormone removal using the horseradish peroxidase enzyme: Temperature and pH effects; *Water Res.*; 40; p 2847.
- Baig S., Hansmann G., Paolini B. **(2008)** Ozone oxidation of oestrogenic active substances in wastewater and drinking water; *Water Sci. Technol.*; 58; p 451.

- Barron E., Deborde M., Rabouan S., Mazellier P., Legube B. **(2006)** Kinetic and mechanistic investigations of progesterone reaction with ozone; *Water Res.*; 40; p 2181.
- Baugros J-B., Giroud B., Dessalces G., Grenier-Loustalot M-F., Cren-Olive C. **(2008)** Multiresidue analytical methods for the ultra-trace quantification of 33 priority substances present in the list of REACH in real water samples; *Anal. Chim. Acta*; 607, p 191.
- Benotti M.J., Trenholm R.A., van der Ford B.J., Holady J.C., Stanford B.D., Snyder S.A. **(2009)** Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water; *Environ. Sci. Technol.*; 43, p 597.
- Bergamasco A.M.D. **(2010)** Emprego de Bioensaios para Atividade Estrogênica Água para Consumo Humano e Mananciais do Estado de São Paulo; *Dissertação de mestrado; Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; Universidade de São Paulo*; 90 pp.
- Bila D.M., Dezotti M. **(2003)** Fármacos no meio ambiente; *Quím. Nova*; 26; p 523.
- Birkett J.W., Lester J.N. **(2003)** Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes; ISBN 1-56670-601-7; disponível em [www.crcpress.com].
- Bodzek M., Dudziak M. **(2006)** Elimination of steroidal sex hormones by conventional water treatment and membrane processes; *Desalination*; 198; p 24.
- Brian J.V., Harris C.A., Scholze M., Kortenkamp A., Booy P., Lamoree M., Pojana G., Jonkers N., Marcomini A., Sumpter J.P. **(2007)** Evidence of estrogenic mixture effects on the reproductive performance of fish; *Environ. Sci. Technol.*; 41, p 337.
- Broséus R., Vincent S., Aboulfadl K., Daneshvar A., Sauvé S., Barbeau B., Prévost M. **(2009)** Ozone oxidation of pharmaceuticals, endocrine disruptors and pesticides during drinking water treatment; *Water Res.*; 43; p 4707.
- Buerge I.J., Poiger T., Muller M.D., Buser H.R. **(2003)** Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters; *Environ. Sci. Technol.*; 37; p 691.
- Buth J.M., Grandbois M., Vikesland P.J., McNeill K., Arnold W.A. **(2009)** Aquatic photochemistry of chlorinated triclosan derivatives: potential source of polychlorodibenzo-p-dioxins; *Environ. Toxicol. Chem.*; 28; p 2555.
- Campbell C.G., Borglin S.E., Green F.B., Grayson A., Wozel E., Stringfellow W.T. **(2006)** Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: a review; *Chemosphere*; 65; p 1265.

- Carson, R. **(1962)** *Silent Spring*; Ed. Houghton Mifflin.
- CCME – Canadian Council of Minister of the Environment **(2008)** *Drinking Water Guidelines and Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life*.
- CETESB Relatório de qualidade das águas superficiais no Estado de São Paulo **(2009)**, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, Série Relatórios, São Paulo. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/publicacoes/publicacoes.asp>
- Chalew T.E.A., Halden R.U. **(2009)** Environmental exposure of aquatic and terrestrial biota to triclosan and triclocarban; *J. Am. Water Resources Assoc.*; 45; p 4.
- Chang, H., Wan, Y., Hu, J. **(2009)** Determination and source apportionment of five classes of steroid hormones in urban rivers; *Environ. Sci. Technol.*; 43, p 7691.
- Cheek A.O., Vonier P.M., Oberdörster E., Burow B.C., McLachlan J.A. **(1998)** Environmental signaling: a biological context for endocrine disruption; *Environ. Health Perspect.*; 106, p 5.
- Chen M., Ohman K., Metcalfe C., Ikonomidou M.G., Amatya P.L., Wilson J. **(2006)** Pharmaceuticals and endocrine disruptors in wastewater treatment effluents and in the water supply system of Calgary, Alberta, Canada; *Water Qual. Res. J. Canada*; 41, p 351.
- Chen P., Pavelic P., Dillon P., Naidu R. **(2002)** Determination of caffeine as a tracer of sewage effluent in natural waters by SPE-LC-DAD.; *Water Res.*; 36; p 4830.
- Christiansen L.B., Pedersen K.L., Pedersen S.N., Korsgaard B., Bjerregaard P. **(2000)** *In vivo* comparison of xenoestrogens using rainbow trout vitellogenin induction as a screening system; *Environ. Toxicol. Chem.*; 19; p 1867.
- Caliman F.A., Gavrilescu M. **(2009)** Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment – a review; *Clean*; 37; p 277.
- Conley J.M., Symes S.J., Schorr M.S., Richards S.M. **(2008)** Spatial and temporal analysis of pharmaceutical concentrations in the upper Tennessee River basin; *Chemosphere*; 73; p 1178.
- Daston G.P., Gooch J.W., Breslin W.J., Shuey D.L., Nikiforov A.I., Fico T.A., Gorsuch J.W. **(1997)** Environmental estrogens and reproductive health: a discussion of the human and environmental data; *Reprod. Toxicol.*; 11; p 465.
- Daughton C.G., Ternes T.A. **(1999)** Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?; *Environ. Health Perspect.*; 107; p 907.

- Desbrow C., Routledge E.J., Brighty G.C., Sumpter J.P. **(1998)** Identification of estrogenic chemicals in STW effluente. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening.; *Environ. Sci. Technol.*; 32; p 1549.
- Diamanti-Kandarakis E., Bourguignon J.P., Giudice L.C., Hauser R., Prins G.S., Soto A.M., Zoeller R.T., Gore A.C. **(2009)** Endocrine-disrupting chemicals: An endocrine society scientific statement; *Endocr. Rev.*; 30; p 293.
- Diniz M.S., Peres I., Magalhães-Antoine I., Fallab J., Pihan J.C. **(2005)** Estrogenic effects in crucian carp (*Carassius carassius*) exposed to treated sewage effluent; *Ecotoxicol. Environ. Saf.*; 62; p 427.
- Dodds E.C., Lawson W. **(1936)** Syntetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus; *Nature*; 137; p 996.
- Drewes J.E., Hemming J., Ladenburger S.J., Schauer J., Sonzogni W. **(2005)** An assessment of endocrine disrupting activity changes during wastewater treatment through the use of biossays and chemical measurements; *Water Environ. Res.*; 77; p 12.
- Duft M, Schmitt C, Bachmann J, Brandelik C, Schulte-Oehlmann U, Oehlmann J **(2007)** Prosobranch snails as test organisms for the assessment of endocrine active chemicals - an overview and a guideline proposal for a reproduction test with the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*; *Ecotoxicology*; 16; 169-82.
- EC – European Commission **(1998)** The Drinking Water Directive (DWD), Council Directive 98/83/EC.
- Esplugas S., Bila D.M., Krause L.G.T., Dezotti M. **(2007)** Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents; *J. Hazard. Mat.*;149, p 631.
- Fang H., Tong W., Perkins R., Soto A.M., Prechtl N.V., Sheehan D.M. **(2000)** Quantitative comparisons of in vitro assays for estrogenic activities; *Environ. Health Persp.*; 108; p 723.
- Fernández C., González-Doncel M., Pro J., Carbonell G., Tarazona J.V. **(2010)** Occurrence of pharmaceutically active compounds in surface waters of the Henares-Jarama-Tajo River system (Madrid, Spain) and a potential risk characterization; *Sci. Total Environ.*; 408; p 543.
- Fernandez M.P., Buchanan I.D., Ikonomou M.G. **(2008)** Seasonal variability of the reduction in estrogenic activity at a municipal WWTP; *Water Res.*; 42; p 3075.
- Ferreira A.P. **(2005)** Caffeine as an environmental indicator for assessing urban aquatic ecosystems; *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro; 21; p 1884.

- Ferreira C.G., Rocha J.C. **(2004)** *Oncologia Molecular*; Ed. Atheneu, São Paulo, p136.
- Fick J., Lindberg R.H., Parkkonen J., Arvidsson B., Tysklind M., Larsson D.G.J. **(2010)** Therapeutic levels of levonorgestrel detected in blood plasma of fish: results from screening rainbow trout exposed to treated sewage effluents; *Environ. Sci. Technol.*; 44, p 2661.
- Filby A.L., Shears J.A., Drage B.E., Churchley J.H., Tyler C.R. **(2010)** Effects of advanced treatments of wastewater effluents on estrogenic and reproductive health impacts in fish; *Environ. Sci. Technol.*; 44, p 4348.
- Focazio M.J., Kolpin D.W., Barnes K.K., Furlong E.T., Meyer M.T., Zaugg S.D., Barber L.B., Thurman M.E. **(2008)** A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - II) Untreated drinking water sources; *Sci. Total Environ.*; 402; p201.
- Froehner S., Souza D.B., Machado K.S., Rosa E.C. **(2010)** Tracking anthropogenic inputs in Barigui River, Brazil using biomarkers; *Water Air Soil Pollut.*; 210; p 33.
- Fromme H., Kuchler T., Otto T., Pilz K., Muller J., Wenzel A. **(2002)** Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment.; *Water Res.*; 36; p 1429.
- Fukuhara T., Iwasakia S., Kawashima M., Shinohara O., Abe I. **(2006)** Adsorbability of estrone and 17 β -estradiol in water onto activated carbon; *Water Res.*; 40; p 241.
- Gaido K.W., McDonnell D.P., Safe S. **(2001)** Endocrine Disruptors, part I, Ed. Springer-Verlag, Berlin; p 27.
- Garcia-Ac A., Segura P.A., Viglino L., Fürtös A., Gagnon C., Prévost M., Sauvé S. **(2009)** On-line solid-phase extraction of large-volume injections coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantitation and confirmation of 14 selected trace organic contaminants in drinking and surface water; *J. Chromatogr. A*; 1216; p 8518.
- Gardinali P.R., Zhao X. **(2002)** Trace determination of caffeine in surface water samples by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (LC-APCI-MS).; *Environ. Int.*; 28; p 521.
- Gentili A., Perret D.S., Marchese R., Mastropasqua R., Curini A., Di Corcia **(2002)** Analysis of free estrogens and their conjugates in sewage and river waters by solid-phase extraction then liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry; *Chromatographia*; 56; p 25.
- Ghiselli G., Jardim W.F. **(2007)** Interferentes endócrinos no ambiente; *Quim. Nova*; 30; p 695.

- Glassmeyer S.T., Furlong E.T., Kolpin D.W., Cahill J.D., Zaugg S.D., Werner S.L., Meyer M.T., Kryak D.D. (2005) Transport of chemical and microbial compounds from known wastewater discharges: Potential for use as indicators of human fecal contamination; *Environ. Sci. Technol.*; 39; p 5157.
- Gonçalves E.S. (2008) Uso da Cafeína como Indicador de Contaminação por Esgoto Doméstico em Águas Superficiais; *Dissertação de mestrado; Universidade Federal Fluminense*, 90 pp.
- Gutendorf B., Westendorf J. (2001) Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens; *Toxicology*; 166; p 79.
- Halling-Sorensen B., Nielsen S.N., Lanzky P.F., Ingerslev F., Lutzhoft H.C.H., Jorgensen S.E. (1998) Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review; *Chemosphere*; 36; p 357.
- Harrison P.T.C., Holmes P., Humfrey C.D.N. (1997) Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure?; *Sci. Total Environ.*; 205; p 97.
- Hayes T.B., Khoury V., Narayan A., Nazir M., Park A., Brown T., Adame L., Chan E., Buchholz D., Stueve T., Gallipeau S. (2010) Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*) *Proceedings Natl. Acad. Sci. USA*; 107; p 4615.
- HC - Guidelines for chemical and physical parameters; Canada: Health Canada (2008) disponível em [<http://hc-sc.gc.ca/>] acessado em janeiro de 2011
- Herman-Giddens M.E. (2007) The decline in the age of menarche in the United States: Should we be concerned?; *J. Adolescent Health*; 40; p 201.
- Hernandez-Raquet G., Soef A., Delgenes N., Balaguer P. (2007) Removal of the endocrine disrupter nonylphenol and its estrogenic activity in sludge treatment processes; *Water Res.*; 41; p 2643.
- Ho L., Grasset C., Hoefel D., Dixon M.B., Leusch F.D.L., Newcombe G., Saint C.P., Brookes J.D. (2011) Assessing granular media filtration for the removal of chemical contaminants from wastewater; *Water Res.*; 45; p 3461.
- Huber M.M., Korhonen S., Ternes T.A., Gunten U. (2005) Oxidation of pharmaceuticals during water treatment with chlorine dioxide; *Water Res.*; 39; p 3607.
- Huerta-Fontela M. Galceran M.T., Ventura F. (2011) Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment; *Water Res.*; 45; p 1432.

- Huerta-Fontela M., Galceran M.T., Ventura F. **(2007)** Ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of stimulatory drugs of abuse in wastewater and surface waters; *Anal. Chem.*; 79; p 3821.
- Ikehata K., El-Din M.G., Snyder S.A. **(2008)** Ozonation and advanced oxidation treatment of emerging organic pollutants in water and wastewater; *Ozone: Sci. Eng.*; 30; p 21.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do meio Ambiente e dos Recursos Renováveis **(2010)** Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil – uma abordagem ambiental; disponível em <http://www.ibama.gov.br>
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Censo **2010**.
- IPCS **(2006)**; International Programme on Chemical Safety, *International Chemical Safety Cards* [<http://www.who.int/ipcs/publications/icsc/en/>] acessado em agosto 2008.
- ISCID – International Society for Complexity Information and Design [http://www.iscid.org/encyclopedia/Universal_Indicatorreferenciada_fenolftaleina] acessado em junho de 2011.
- Jardim W.F., Montagner C.C., Pescara I.C., Umbuzeiro G.A., Bergamasco A.M.D., Eldridge M.L., Sodr  F.F. **(2011)** An integrated approach to evaluate emerging contaminants in drinking water; *Sep. Purif. Technol.*; no prelo.
- Johnson A.C., Belfroid A., Di Corcia A. **(2000)** Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent; *Sci. Total Environ.*; 256; p163.
- Jonkers N., Kohler H-P.E., Dammshausen A., Giger W. **(2009)** Mass flows of endocrine disruptors in the Glatt River during varying weather conditions; *Environ. Pollut.*; 157; p 714.
- Kasprzyk-Hordern B., Dinsdale R.M., Guwy A.J. **(2008)** The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK; *Water Res.*; 42; p 3498.
- Kleywegt S., Pileggi V., Yang P., Hao C., Zhao X., Rocks C., Thach S., Cheung P., Whitehead B. **(2011)** Pharmaceuticals, hormones and bisphenol A in untreated source and finished drinking water in Ontario, Canada - Occurrence and treatment efficiency; *Sci. Total Environ.*; 409; p 1481.
- Kidd K.A., Blanchfield P.J., Mills K.H., Palace V.P., Evans R.E., Lazorchak J.M., Flick R.W. **(2007)** Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen; *Environ. Sci.*; 104; p 8897.

- Klamerth N., Rizzo L., Malato S., Maldonato M.I., Aguera A., Fernández-Alba A.R. **(2010)** Degradation of fifteen emerging contaminants at $\mu\text{g L}^{-1}$ initial concentrations by mild solar photo-Fenton in MWTP effluents; *Water Res.*; 44; p 545.
- Klecka G., Staples C.A., Clark K.E., Van der Hoeven N., Thomas D.E., Hentges S.G. **(2009)** Exposure analysis of bisphenol A in surface water systems in North America and Europe; *Environ. Sci. Technol.*; 43, p 6145.
- Kolpin D. W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B., Buxton H.T. **(2002)** Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance; *Environ. Sci. Technol.*; 36; p 1202.
- Kuch H.M., Ballschmiter K. **(2001)** Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range; *Environ. Sci. Technol.*; 35; p 3201.
- Kuster M., López de Alda M.J., Hernando M.D., Petrovic M., Martín-Alonso J., Barceló D. **(2008)** Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain); *J. Hydrol.*; 358; p 112.
- Lai K.M., Johnson K.L., Scrimshaw M.D., Lester J.N. **(2000)** Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems; *Environ. Sci. Technol.*; 34, p 3890.
- Lange, A., Paull, C.C., Coe, T.S., Katsu, Y., Urushitani, H., Igushi, T., Tyler, C. R. **(2009)** Sexual reprogramming and estrogenic sensitization in wild fish exposed to ethinylestradiol; *Environ. Sci. Technol.*; 43, p 1219.
- Lark S.M. **(1999)** Making the Estrogen Decision; *McGraw-Hill Professional*, ISBN 0879836962 49pp.
- Latch D.E., Packer J.L., Stender B.L., Van Overbeke J., Arnold W.A., McNeill K. **(2005)** Aqueous photochemistry of triclosan: Formation of 2,4-dichlorophenol, 2,8-dichlorodibenzo-p-dioxin, and oligomerization products; *Environ. Toxicol. Chem.*; 24; p 517.
- Layton A.C., Gregory B.W., Seward J.R., Schultz T.W., Saylor G.S. **(2000)** Mineralization of steroidal hormones by biosolids in wastewater treatment systems in Tennessee, USA; *Environ. Sci. Technol.*; 34; p 3925.
- Legler J., Zeinstra L.M., Schuitemaker F., Lanser P.H., Bogerd J., Brouwer A., Vethaak A.D., DeVoogt P., Murk A.J., Van der Burg B. **(2002)** Comparasion of in vivo and in vitro reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity; *Environ. Sci. Technol.*; 36; p 4410.

- Leskinen P., Michelini E., Picard D., Karp M., Virta M. **(2005)** Bioluminescent yeast assay for detecting estrogenic and androgenic activity in different matrices. *Chemosphere*; 61; p 259.
- Levy C.W., Roujeinikova A., Sedelnikova S., Baker P.J., Stuitje A.R., Slabas A.R., Rice D.W., Rafferty J.B. **(1999)** Molecular basis of triclosan activity; *Nature*; 398; p 383.
- Li X., Ying G-G., Su H-C., Yang X-B., Wang L. **(2010)** Simultaneous determination and assessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles; *Environ. Int.*; 36; p 557.
- Lintelmann J., Katayama A., Kurihara N. **(2003)** Endocrine disruptors in the environment.; *Pure Appl.Chem.*; 75; p 631.
- Liu Z., Kanjo Y., Mizutani S. **(2010)** A review of phytoestrogens: their occurrence and fate in the environment; *Water Res.*; 44; p 567.
- Loos R., Locoro G., Contini S. **(2010)** Occurrence of polar organic contaminants in the dissolved water phase of the Danube River and its major tributaries using SPE-LC-MS2 analysis; *Water Res.*; 44; p 2325.
- 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. **(2010b)** Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water; *Water Res.*; 44; p 4115.
- Loos R., Wollgast J., Huber T., Hanke G. **(2007)** Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy; *Anal. Bioanal. Chem.*; 387, p 1469.
- López de Alda M.J., Barceló, D. **(2000)** Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by LC-DAD-MS.; *J. Chromatogr. A*; 892; p 391.
- Lopes L.G., Marchi M.R.R., Souza J.B.G., Moura J.A., Lorenzon C.S., Cruz C., Amaral L.A. **(2010)** Estragênios em águas naturais e tratadas da região de Jaboticabal – São Paulo; *Quím. Nova*; 33; p 639.
- Loraine G.A., Pettigrove M.E. **(2006)** Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in southern California; *Environ. Sci. Technol.*; 40; p 687.
- Matthiessen P. **(2008)** An assessment of endocrine disruption in mollusks and the potential for developing internationally standardized mollusk life cycle test guidelines; *Integr. Environ. Assess. Manag. – SETAC*; 4; p 274.

- McAvoy D.C., Schatowitz B., Jacob M., Hauk A., Eckhoff W.S. **(2002)**; Measurement of triclosan in wastewater treatment systems; *Environ. Toxicol. Chem.*; 21; p 1323.
- Mezcua M., Gomez M.J., Ferrer I., Aguera A., Hernando M.D., Fernandez-Alba A.R. **(2004)** Evidence of 2,7/2,8-dibenzodichloro-*p*-dioxin as a photodegradation product of triclosan in water and wastewater samples; *Anal. Chim. Acta*; 524; p 241.
- Milla S., Depiereux S., Kestemont P. **(2011)** The effects of estrogenic and androgenic endocrine disruptors on the immune system of fish: a review; *Ecotoxicology*; 20; p 305.
- Miller J.N., Miller J.C. **(2005)** Statistics and chemometrics for analytical chemistry; *Ed. Pearson*; 285 pp.
- Miodovnik A., Engel S.M., Zhu C., Ye X., Soorya L.V., Silva M.J., Calafat A.M., Wolff M.S. **(2011)** Endocrine disruptors and childhood social impairment; *Neurotoxicology*; 32; p 261.
- Miranda-García N., Suárez S., Sánchez B., Coronado J.M., Malato S., Maldonado M.I. **(2011)** Photocatalytic degradation of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plant effluents using immobilized TiO₂ in a solar pilot plant; *Appl. Catal. B: Environ.*; 103; p 294.
- Montagner C.C., Jardim W.F. (2011) Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia River, São Paulo State (Brazil); *J. Braz. Chem. Soc.*; 22; p 1452.
- Moreira D.S., Aquino S.F., Afonso R.J.C.F., Santos E.P.P.C., de Paula V.L. **(2009)** Occurrence of endocrine disrupting compounds in water sources of Belo Horizonte metropolitan area, Brazil; *Environ. Technol.*; 30, p 1041.
- Mnif W., Hassine A.I.H., Bouaziz A., Bartegi A., Thomas O., Roig B. **(2011)** Effect of endocrine disruptor pesticides: A review; *Int. J. Environ. Res. Public Health*; 8; p 2265.
- Muller S., Schlatter C. **(1998)** Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment.; *Pure Appl.Chem.*; 70; p 1847.
- Murk A.J., Legler J., Van Lipzig M.M., Meerman J.H., Belfroid A.C., Spenkeliink A., Van Der Burg B., Rijs G.B., Vethaak D. **(2002)** Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays; *Environ. Toxicol. Chem.*; 21; p 16.
- Musolf A., Leschik S., Moöder M., Strauch G, Reinstorf F., Schirmer M. **(2009)** Temporal and spatial patterns of micropollutants in urban receiving waters; *Environ. Pollut.*; 157; p 3069.

- Nakada N., Yasojima M., Okayasu Y., Komori K., Tanaka H., Suzuki Y. **(2006)** Fate of oestrogenic compounds and identification of oestrogenicity in a wastewater treatment process; *Water Sci. Technol.*; 53; p 51.
- Ning B., Graham N., Zhang Y., Nakonechny M., El-Din M.G. **(2007)** Degradation of endocrine disrupting chemicals by ozone/AOPs; *Ozone: Sci. Engineer.*; 29; p 153.
- NIST - National Institute of Standards and Technology; disponível em [<http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>] acessado em junho 2011.
- NZMH – New Zealand drinking water standards. New Zealand: Ministry of Health **(2008)** disponível em [<http://www.moh.govt.nz>] acessado em janeiro de 2011.
- Oberdörster E., Rittschof D., LeBlanc G.A. **(1998)** Alteration of [super(14)C]-testosterone metabolism after chronic exposure of *Daphnia magna* to tributyltin; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*; 34; p 21.
- Oehlmann J., Schulte-Oehlmann U., Tillmann M., Markert B. **(2000)** Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (*Mollusca: gastropoda*) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens; *Ecotoxicology*; 9; p 383.
- Oehlmann J., Di Benedetto P., Tillmann M., Duft M., Oetken M., Schulte-Oehlmann U. **(2007)** Endocrine disruption in prosobranch molluscs: evidence and ecological relevance; *Ecotoxicology*; 16; p 29.
- OMS Organização Mundial da Saúde **(2008)** Guidelines for drinking-water quality: incorporating 1st and 2nd addenda: v1-Recommendations, Geneva, 3th ed, 668 p, disponível em [http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/fulltext.pdf], acessado em setembro de 2011.
- Österlund M.K., Hurd Y.L. **(2001)** Estrogen receptors in the human forebrain and relation to neuropsychiatric disorders.; *Prog. Neurobiol.*; 64; p 251.
- Pait A.S., Nelson J.O. **(2003)** Vitellogenesis in male *Fundulus heteroclitus* (killifish) induced by selected estrogenic compounds; *Aquat. Toxicol.*; 64; p 331.
- Pal A., Gin K.Y-H., Lin A. Y-C., Reinhard M. **(2010)** Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects; *Sci. Total Environ.*; 408; p 6062.
- Park B.J., Kidd K. **(2005)** Effects of the synthetic estrogen ethinylestradiol on early life stages of mink frogs and green frogs in the wild and in situ *Environ. Toxicol. Chem.*; 24; p 2027.
- Parks L., LeBlanc G. **(1996)** Reductions in steroid hormone biotransformation/elimination as a biomarker of pentachlorophenol chronic toxicity; *Aquat. Toxicol.*; 34; p 291.

- Pereira R.O., Postigo C., López de Alda M., Daniel L.A., Barceló D. **(2011)** Removal of estrogens through water disinfection processes and formation of by-products; *Chemosphere*; 82; p 789.
- Petrovic, M., Farré, M., Lopez de Alda, M., Perez, S., Postigo, C., Köck, M., Radjenovic, J., Gros, M., Barcelo, D. **(2010)** Recent trends in the liquid chromatography–mass spectrometry analysis of organic contaminants in environmental samples; *J. Chromatogr. A*; 1217, p 4004.
- Petrovic M., Barceló D. **(2006)** Liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of the emerging environmental contaminants; *Anal. Bioanal. Chem.*; 385, p 422.
- Petrovic M., Barceló D., Diaz A., Ventura, F. **(2003)** Low nanogram per liter determination of halogenated nonylphenols, nonylphenol carboxylates, and their non-halogenated precursors in water and sludge by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry; *J. Am Soc Mass Spectrom* 14, p 516.
- Pickering A.D., Sumpter J.P. **(2003)** Comprehending endocrine disrupters in aquatic environments; *Environ. Sci. Technol.*; 37; p 331.
- Piocos E.A., de la Cruz A.A. **(2000)** SPE-HPLC-DAD of chemical indicators of human fecal contamination in water.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*; 23; p 1281.
- Purdom C.E., Hardiman P.A. **(1994)** Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works; *Chem. Ecol.*; 8; p 275.
- Quednow K., Püttmann W. **(2008)** Endocrine disruptors in freshwater streams of Hesse, Germany: Changes in concentration levels in the time span from 2003 to 2005; *Environ. Pollut.*; 152, p 476.
- Quintana J., Martí I., Ventura F. **(2001)** Monitoring of pesticides in drinking and related waters in NE Spain with a multiresidue SPE-GC–MS method including an estimation of the uncertainty of the analytical results; *J. Chromatogr. A*; 938; p 3.
- Raimundo C.C.M. **(2007)** Ocorrência de Interferentes Endócrinos e Produtos Farmacêuticos nas Águas Superficiais na Bacia do Rio Atibaia. *Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas*, 140 pp.
- Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M. **(1997)** Farmacologia, *Guanabara Koogan, Rio de Janeiro*.
- Ribeiro C., Pardal M.A., Martinho F., Margalho R., Tiritan M.E., Rocha E., Rocha M.J. **(2009)** Distribution of endocrine disruptors in the Mondego River estuary, Portugal; *Environ. Monit. Assess.*; 149, p 183.
- Ribeiro M.L., Lourenceti C., Pereira S.Y., Marchi M.R.R. **(2007)** Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: uma avaliação preliminar; *Quim. Nova*; 30; p 688.

- Richardson S.D. **(2009)** Water analysis: Emerging contaminants and current issues; *Anal. Chem.*; 81; p 4645.
- Richardson S.D., Ternes T.A. **(2011)** Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues; *Anal. Chem.*; 83, p 4614.
- Rodil R., Quintana J.B., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodríguez D. **(2009)** Multi-residue analytical method for the determination of emerging pollutants in water by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry; *J. Chromatogr. A*; 1216; p 2958.
- Rodgers-Gray T.P., Jobling S., Morris S., Kelly C., Kirby S., Janbakhsh A., Harries J.E., Waldock M.J., Sumpter J.P., Tyler C.R. **(2000)** Long-term temporal changes in the estrogenic composition of treated sewage effluent and its biological effects on fish; *Environ. Sci. Technol.*; 34, p 1521.
- Rodrigues-Mozaz S., López de Alda M.J., Barceló D. **(2004)** Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by SPE-LC-MS; *J. Chromatogr. A*; 1045; p 85.
- Rodrigues-Mozaz S., López de Alda M.J., Barceló D. **(2005)** Analysis of bisphenol A in natural waters by means of an optical immunosensor; *Water Res.*; 39; p 5071.
- Rosenfeldt E.J., Chen P.J., Kullman S., Linden K.G. **(2007)** Destruction of estrogenic activity in water using UV advanced oxidation; *Sci. Total Environ.*; 377; p 105.
- Rossner A., Snyder S.A., Knappe D.R.U. **(2009)** Removal of emerging contaminants of concern by alternative adsorbents; *Water Res.*; 43; p 3787.
- Routledge E.J., Sumpter J.P. **(1996)** Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast assay; *Environ. Toxicol. Chem.*; 15; p 241.
- Routledge E.J., Sheahan D., Desbrow C., Brighty G.C., Waldock M., Sumpter J.P. **(1998)** Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach; *Environ. Sci. Technol.*; 32; p 1559.
- Salo H.M., Hebert N., Dautremepuits C., Cejka P., Cyr D.G., Fournier M. **(2007)** Effects of Montreal municipal sewage effluents on immune responses of juvenile female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*); *Aquatic Toxicol.*; 84; p 406.
- Salste L., Leskinen P., Virta M., Kronberg L. **(2007)** Determination of estrogens and estrogenic activity in wastewater effluent by chemical analysis and the bioluminescent yeast assay; *Sci. Total Environ.*; 378; p 343.
- SANASA; Sociedade de Abastecimento e Saneamento S/A **(2011)**; [http://www.sanasa.com.br/analiseagua/ana_con1.asp?f=l&tm=l] acessado em junho de 2011.

- Sanseverino J., Eldridge M.L., Layton A.C., Easter J.P., Yarbrough J., Schultz T.W., Sayler G.S. (2009) Screening of potentially hormonally active chemicals using bioluminescent yeast bioreporters; *Toxicol. Sci.*; 107; p 122.
- Sanseverino J., Gupta R.K., Layton A.C., Patterson S.S., Ripp S.A., Saidak L., Simpson M.L., Schultz T.W., Sayler G.S. (2005) Use of *Saccharomyces cerevisiae* BLYES expressing bacterial bioluminescence for rapid, sensitive detection of estrogenic compounds; *Appl. Environ. Microbiol.*; 71; p 4455.
- Schechter A., Malik N., Haffner D., Smith S., Harris T.R., Paepke O., Birnbaum L. (2010); Bisphenol A (BPA) in U.S. Food; *Environ. Sci. Technol.*; 44; p 9425.
- Schueler F.W. (1946) Sex hormonal action and chemical constitution; *Science*; 103; p 221.
- Schultis T., Metzger J.W. (2004) Determination of estrogenic activity by LYES-assay (yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase); *Chemosphere*; 57; p 1649.
- SEMAE; Serviço Municipal de Água e Esgoto de Piracicaba; Boletim de análises rio Corumbataí (2011); [http://www.semaepiracicaba.org.br/site/attachments/7919_Conama%20357%2020Corumbataí%20%2029.06.2010.pdf]
- Shanle E.K., Xu W. (2011) Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: identification and mechanisms of action; *Chem. Res. Toxicol.*; 24; p 6.
- Shao B., Hu J., Yang M., An W., Tao S. (2005) Nonylphenol and nonylphenol etoxylates in river water, drinking water, and fish tissues in the area of Chongqing, China; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*; 48; p 467.
- Shappell N.W., Billey L.O., Forbes D., Matheny T.A., Poach M.E., Reddy G.B., Hunt P.G. (2007) Estrogenic activity and steroid hormones in swine wastewater through a lagoon constructed-wetland system; *Environ. Sci. Technol.*; 41; p 444.
- Sharpe R.M., Skakkebaek N.E. (1993) Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?; *Lancet*; 341; p 1392.
- Sluczewski A., Roth P. (1948) Effects of androgenic and estrogenic compounds on the experimental metamorphoses of amphibians; *Gynecol. Obstet.*; 47; p 164.
- Snyder S.A. (2008) Occurrence, treatment, and toxicological relevance of EDCs and pharmaceuticals in water; *Ozone: Sci. Eng.*; 30; p 65.
- Snyder S.A., Adham S., Redding A.M., Cannon F.S., DeCarolis J., Oppenheimer J., Wert E.C., Yoon Y. (2007) Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals; *Desalination*; 202; p 156.

- Snyder S.A., Keith T.L., Verbrugge D.A., Snyder E.M., Gross T.S., Kannan K., Giesy J.P. (1999) Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures; *Environ. Sci. Technol.*; 33; p 2814.
- Sodré F.F., Montagner C.C., Locatelli M.A.F., Jardim W.F. (2007) Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil); *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*; 2; p 187.
- Sodré F.F., Locatelli M.A.F., Jardim W.F. (2010) Sistema limpo em linha para extração em fase sólida de contaminantes emergentes em águas naturais; *Quim. Nova*; 33; p 216.
- Stackelberg P.E., Gibs G., Furlong E.T., Meyer M.T., Zaugg S.D., Lippincott R.L. (2007) Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds; *Sci. Total Environ.*; 377, p 255.
- Stumm-Zollinger E., Fair G.M. (1965) Biodegradation of steroid hormones; *J. Water Pollut. Control Fed.*; 37; p 1506.
- Sui Q., Huang J., Deng S., Yu G., Fan Q. (2010) Occurrence and removal of pharmaceuticals, caffeine and DEET in wastewater treatment plants of Beijing, China; *Water Res.*; 44; p 417.
- Sumpter J.P., Johnson A.C. (2005) Lessons learned from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment; *Environ. Sci. Technol.*; 39; p 4321.
- Suzuki Y., Maruyama T. (2006) Fate of natural estrogens in batch mixing experiments using municipal sewage and activated sludge; *Water Res.*; 40; p 1061.
- Tabak H.H., Bunch R.L. (1970) Steroid hormones as water pollutants. I. Metabolism of natural and synthetic ovulation-inhibiting hormones by microorganisms of activated sludge and primary settled sewage; *Dev. Ind. Microbiol.*; 11; p 367.
- Tanner J.M. (1973) Trend towards earlier menarche in London, Oslo, Copenhagen, the Netherlands, and Hungary; *Nature*; 243; p 95.
- Ternes T.A., Stumpf M., Mueller J., Haberer K., Wilken R.D., Servos M. (1999) Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil; *Sci. Total Environ.*; 225; p 81.
- Tixier C., Singer H.P., Canonica S., Muller S.R. (2002) Phototransformation of triclosan in surface waters: A relevant elimination process for this widely used biocide- Laboratory studies, field measurements, and modeling; *Environ. Sci. Technol.*; 36; p 3482.
- Togola A., Budzinski H. (2008) Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples; *J. Chromatogr. A*; 1177; p 150.

- Toppari J., Larsen J.C., Christiansen P., Giwercman A., Grandjean P., Guillette Jr., L.J., Jégou B., Jensen T.K., Jouannet P., Keiding N., Leffers H., McLachlan J.A., Meyer O., Müller J., Meyts E.R., Scheike T., Sharpe R., Sumpter J., Skakkebaek N.E. **(1996)** Male Reproductive Health and Environmental Xenoestrogens; *Environ. Health Perspectives*; 741; p 741.
- USEPA United States Environmental Protection Agency **(2011)** Water: Unregulated Contaminant Monitoring Rule 3 (UCMR 3); disponível em <http://water.epa.gov/lawsregs/rulesregs/sdwa/ucmr/ucmr3/index.cfm>; acessado em agosto de 2011.
- USEPA United States Environmental Protection Agency **(2009)** Water: Contaminant Candidate List 3 – CCL; disponível em <http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/dws/ccl/ccl3.cfm>; acessado em agosto de 2011.
- USEPA United States Environmental Protection Agency **(2009)** Final List of Initial Pesticide Active Ingredients and Pesticide Inert Ingredients to be screened Under the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act, disponível em [<http://www.epa.gov/endo/>], acessado em agosto de 2011.
- USEPA United States Environmental Protection Agency **(1997)** Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis; *Washington, DC: Office of Research and Development EPA/630/R-96/012*.
- Vandenberg L.V., Hauser R., Marcus M., Olea N., Welshons W.V. **(2007)** Human exposure to bisphenol A (BPA); *Reprod. Toxicol.*; 24; p 139.
- Vanderford B.J., Pearson R.A., Rexing D.J., Snyder S.A. **(2003)** Analysis of endocrine disruptors, pharmaceuticals, and personal care products in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry; *Anal. Chem.*; 75; p 6265.
- Vulliet E., Cren-Olivé C., Grenier-Loustalot M.F. **(2011)** Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface waters; *Environ. Chem. Lett.*; 9; p 114.
- Verliefde A., Cornelissen E., Amy G., Bruggen B.V., Dijk H. **(2007)** Priority organic micropollutants in water sources in Flanders and the Netherlands and assessment of removal possibilities with nanofiltration; *Environ. Pollut.*; 146; p 281.
- Wan Y., Choi K., Kim S., Ji K., Chang H., Wiseman S., Jones P.D., Khim J.S., Park S., Park J., Lam M.H.W., Giesy J.P. **(2010)** Hydroxylated polybrominated diphenyl ethers and bisphenol A in pregnant women and their matching fetuses: placental transfer and potential risks; *Environ. Sci. Technol.*; 44; p 5233.

- Wang C., Shi H., Adams C.D., Gamagedara S., Stayton I., Timmons T., Ma Y. **(2011)** Investigation of pharmaceuticals in Missouri natural and drinking water using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *Water Res.*; 45, p 1818.
- Weber R.F.A, Pierik F.H., Dohle G.R., Burdorf A. **(2002)** Environmental influences on male reproduction, *BJU Int.*; 89; p 143.
- Wester P.W., Canton J.H. **(1986)** Histopathological study of *Oryzias latipes* (medaka) after long-term beta-hexachlorocyclohexane exposure; *Aquatic Toxicol.*; 9; p 21.
- Westerhoff P., Yoon Y., Snyder S., Wert A. **(2005)** Fate of endocrine-disruptor, pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes; *Environ. Sci. Technol.*; 39; p 6649.
- Wise A., O'Brien K., Woodruff T. **(2011)** Are oral contraceptives a significant contributor to the estrogenicity of drinking water?; *Environ. Sci. Technol.*; 45; p51.
- Wolff M.S., Toniolo P., Lee E., Rivera M., Dubin N. **(1993)** Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer; *J. Natl. Cancer Inst.*; 85; p 648.
- Wollenberger, L. **(2005)** Toxicity Tests with Crustaceans for Detecting Sublethal Effects of Potential Endocrine Disrupting Chemicals; Ph.D. Thesis; Lyngby; Environment & Resources, Technical University of Denmark.
- Yamamoto A., Kakutani N., Yamamoto K., Kamiura T., Miyakoda H. **(2006)** Steroid hormone profiles of urban and Tidal Rivers using LC/MS/MS equipped with electrospray ionization and atmospheric pressure photoionization sources; *Environ. Sci. Technol.*; 40; p 4132.
- Yeo M-K., Kang M. **(2006)** Photodecomposition of bisphenol A on nanometer-sized TiO₂ thin film and the associated biological toxicity to zebrafish (*Danio rerio*) during and after photocatalysis; *Water Res.*; 40; p 1906.
- Yoon Y., Westerhoff, P., Snyder S.A., Wert E.C. **(2006)** Nanofiltration and ultrafiltration of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products, *J. Membr. Sci.*; 270; p 88.
- Yoon Y., Westerhoff P., Snyder S.A., Esparza M. **(2003)** HPLC-fluorescence detection and adsorption of bisphenol A, 17 β -estradiol, and 17 α -ethynylestradiol on powdered activated carbon.; *Water Res.*; 37; p 3530.
- Young T.A., Heidler J., Matos-Perez C.R., Sapkota A., Toler T., Gibson K.E., Schwab K.J., Halden R.U. **(2008)** Ab initio and in situ comparison of caffeine, triclosan, and triclocarban as indicators of sewage-derived microbes in surface waters; *Environ. Sci. Technol.*; 42; p 3335.

- Zhang Y., Zhou J.L., Ning B. **(2007)** Photodegradation of estrone and 17 β -estradiol in water; *Water Res.*; 41; p 19.
- Zhang Y., Zhou J.L. **(2005)** Removal of estrone and 17 β -estradiol from water by adsorption; *Water Res.*; 39; p 3991.
- Zhao J-L., Ying G-G., Liu Y-S., Chen F., Yang J-F., Wang L. **(2010)** Occurrence and risks of triclosan and triclocarban in the Pearl River system, South China: from source to the receiving environment; *J. Hazard. Mater.*; 179; p 215.
- Zhao J-L., Ying G-G., Wang L., Yang J-F, Yang X-B, Yang L-H., Li X. **(2009)** Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface water of the Pearl Rivers in South China by gas chromatography–negative chemical ionization–mass spectrometry; *Sci. Total Environ.*; 407; p 962.