



XENOESTRÓGENOS FENÓLICOS NAS ÁGUAS DO RIO PARAÍBA DO SUL, SP

RENATA RODRIGUES DE SOUZA¹
ELÂINE ARANTES JARDIM MARTINS²
HELIO AKIRA FURUSAWA³
MARYCEL ELENA BARBOZA COTRIM⁴

INTRODUÇÃO

Os avanços da química orgânica após a Segunda Guerra Mundial beneficiaram a espécie humana de diversas formas, todavia, o uso e o lançamento de compostos sintéticos no ambiente aumentaram drasticamente, e o descaso com a segurança destas substâncias para a saúde do meio ambiente e dos seres humanos, trouxe problemas no âmbito ambiental que só foram conhecidos e discutidos nas últimas décadas, como a degradação dos recursos naturais, entre eles da água.

A preocupação com a disponibilidade dos recursos hídricos justifica-se pelo fato da água desempenhar papel fundamental no desenvolvimento social e econômico da humanidade, além de ser um bem essencial à vida. Em função do crescimento desordenado das cidades e das atividades antrópicas no entorno das bacias hidrográficas, é notório o aumento da poluição das águas superficiais e subterrâneas. Poluição essa, que ocorre principalmente em virtude da descarga, nos corpos receptores, de efluentes sanitários e industriais sem tratamento prévio, ou cujo tratamento é ineficiente, e que compromete um dos usos prioritários deste recurso – o abastecimento público (TUCCI, 2008; REBOUÇAS, 2001).

A introdução constante de contaminantes orgânicos e inorgânicos nos corpos hídricos e os efeitos dessas substâncias sobre a saúde ambiental e pública constituem,



atualmente, o principal desafio do poder público para que garantam a qualidade das águas superficiais e de consumo humano. Os compostos orgânicos contemplados neste trabalho, nonilfenol (NP) e bisfenol A (BPA), assim como outras substâncias com atividade estrogênica, não são abrangidos pela legislação brasileira para águas superficiais – a Resolução nº 357/2005 do CONAMA (BRASIL, 2005). No Canadá a concentração de $1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ é aceita como limite para o NP e seus etoxilados em águas naturais (CANADA, 2002). O BPA, até o momento, não é regulamentado em águas superficiais nas leis nacionais ou internacionais.

Nonilfenol e bisfenol A são contaminantes que têm recebido especial atenção nas últimas décadas pela ampla aplicação, ubiquidade no meio ambiente e por apresentarem a capacidade de mimetizar os estrógenos endógenos, sendo considerados disruptores endócrinos (xenoestrógenos). BPA é um dos compostos químicos de maior produção mundial, tendo sido prevista a síntese de 5 milhões de toneladas para o ano de 2010. Sua principal aplicação é na produção do plástico policarbonato, seguida da síntese de resinas epóxi. Pelo grande volume produzido e pelo uso difundido em diversos produtos, a quantidade de BPA lançado no ambiente é considerável, o que o torna presente em amostras ambientais (BALLESTEROS-GÓMEZ et al., 2009).

O NP é um precursor dos surfactantes não-iônicos, os quais possuem utilização industrial e doméstica em detergentes, solubilizantes, formulações de pesticidas, dentre outras. A principal origem do NP no meio ambiente está relacionada à degradação de nonilfenóis etoxilados (NPEs) em estações de tratamento de efluentes (ETEs) que utilizam o tratamento biológico convencional. Estima-se que entre 30 e 35% dos NPEs são convertidos em NP e NPEs de cadeia curta, sendo estes compostos mais recalcitrantes e mais tóxicos. Por serem mais persistentes, grandes quantidades dessas substâncias podem ser encontradas em águas superficiais que recebem descarga de efluentes, mesmo após o tratamento (SOARES et al., 2008; AHREL et al., 1994).

Neste contexto, este trabalho apresenta a metodologia desenvolvida para a determinação desses dois poluentes estrogênicos, assim como a avaliação da qualidade das águas superficiais do rio Paraíba do Sul em quatro municípios paulistas localizados às margens do mesmo. Esta importante bacia hidrográfica abrange três estados da região sudeste – São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, e na área amostrada é responsável pelo abastecimento público de mais de 1 milhão de pessoas.

Para a análise dos micropoluentes, utilizou-se um método analítico de alta seletividade e sensibilidade, sendo a determinação por cromatografia gasosa acoplada ao detector de espectrometria de massas (GC/MS), precedida da concentração das amostras pelo método SPE (extração em fase sólida). Contudo, não são suficientes apenas boas técnicas analíticas para garantir a qualidade dos dados gerados e a



confiabilidade dos resultados. Visando atender as exigências de órgãos nacionais e internacionais a metodologia desenvolvida neste estudo passou pelo processo de validação, que visa demonstrar que o método é adequado ao uso pretendido, além agregar valor e segurança aos resultados.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

As amostras de água superficial foram coletadas nos meses de junho, setembro e novembro de 2010, no processo de entrada das Estações de Tratamento de Água (ETAs) dos municípios de Guararema, São José dos Campos, Taubaté e Pindamonhangaba, estado de São Paulo. Seguindo o Guia de coletas da Cetesb (1987), as amostras foram coletadas em frascos de vidro âmbar, e mantidas a temperatura aproximada de 4°C.

Parâmetros físico-químicos

As variáveis pH, temperatura e turbidez foram obtidas por medidas on-line, também nas entradas das ETAs.

Extração do xenoestrógenos por SPE

As amostras foram inicialmente filtradas em membranas de 0,45µm para remoção de partículas em suspensão. Em seguida, ajustou-se o pH para 3 com adição da solução de ácido nítrico (HNO₃/H₂O 1:1, v/v).

Para extração e concentração dos analitos, utilizou-se cartuchos SPE da Sulpeco com capacidade de 6mL preenchidos com 500mg de octadecil. Inicialmente o cartucho foi condicionado com acetato de etila, seguido da solução de metanol/H₂O (1:1, v/v). Percolou-se 1L da amostra acidificada, sendo a eliminação de compostos interferentes realizada na etapa de clean up, onde a solução de metanol/H₂O (1:9, v/v) foi empregada. Para remoção da água, o cartucho foi seco sob vácuo, seguido de centrifugação por 25 minutos. A eluição dos analitos ocorreu com 2 x 3mL de acetato de etila/metanol (60:40,v/v). O extrato foi evaporado em fluxo suave de N₂ até 1mL.

Análise por GC/MS e quantificação das amostras

A análise cromatográfica foi realizada por injeção de 1µL do extrato no equipamento GC/MS da Shimadzu e utilizando uma coluna capilar DB-5. As temperaturas do injetor e da interface do GC/MS foram estabelecidas em 270°C e 290°C, respectivamente. A programação da temperatura do forno teve início em 80°C e foi finalizada em 280°C, com isotermas em 210°C e 240°C.

Os compostos foram identificados por comparação com os padrões analíti-



cos do Bisfenol A e da mistura técnica de isômeros de Nonilfenol, ambos da Aldrich Chemical Co., considerando-se os tempos de retenção e o espectro de massas. Para quantificação, as amostras foram analisadas em triplicata, no modo SIM, monitorando-se os cinco fragmentos listados na Tabela 1. Neste estudo, foi utilizado o método de calibração externa, onde as curvas analíticas foram preparadas com oito concentrações dos padrões adicionadas à matriz.

Tabela 1. Identificação e relação massa/carga dos íons monitorados no modo SIM

<i>Composto</i>	<i>Número Cas</i>	<i>Massa molecular</i>	<i>Tempo de retenção</i>	<i>Íons monitorados (m/z)</i>
<i>Nonilfenol</i>	84852-15-3	220.35 g.mol ⁻¹	7.08 – 7.90 min.	107, 121, 135, 149, 220
<i>Bisfenol A</i>	80-05-7	228.28 g.mol ⁻¹	12.56 min.	119, 213, 214, 228, 229

Validação da metodologia

A validação do método seguiu as orientações do documento DOQ-CG-CRE-008 do Inmetro (2010). A validação também tem como objetivo avaliar o efeito de interferentes, principalmente durante o processo de extração, separação ou detecção. Como não há uma matriz de referência ou padrão interno adequado para os compostos estudados, para avaliação da seletividade, especificidade, faixa de trabalho e linearidade foi utilizado o método de superposição de matriz, ou seja, utilizou-se uma matriz semelhante à amostra. Mais especificamente, foram realizados ensaios na própria amostra de água bruta e somente no solvente, com um número de repetições estatisticamente significativo ($n=7$) para oito concentrações diferentes. A partir dos dados obtidos e da aplicação de cálculos estatísticos foi possível avaliar cada parâmetro. Os limites de detecção e quantificação foram calculados com base no desvio padrão das replicatas de acordo com o estabelecido no documento DOQ-CGCRE-008 do Inmetro (2010). A recuperação do método foi estimada através da adição da solução dos padrões analíticos em três níveis de concentração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desempenho analítico

A seletividade e a especificidade da metodologia, avaliadas inicialmente pela análise cromatográfica dos padrões diluídos na mistura dos solventes (EtOAc/MeOH) e na matriz, mostraram-se adequadas com uma boa separação e identificação dos compostos.

Pela aplicação dos testes estatísticos F (Snedecor) e t (Student), que avaliam respectivamente, a homogeneidade das variâncias e a diferença significativa das médias, foi possível verificar a interferência da matriz no ensaio e na precisão do método em quase todos os oito pontos considerados e para ambos os compostos, indicando



que para a quantificação dos analitos deve ser utilizada uma curva analítica preparada na própria amostra, ou em matriz semelhante, uma vez que existirá diferença nos resultados obtidos frente a uma curva preparada somente na solução de solventes.

As curvas analíticas dos dois xenoestrógenos apresentaram boa linearidade, com coeficientes de determinação acima de 0,99 nas faixas de trabalho consideradas, como pode ser observado na Tabela 2.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método, considerando a concentração de 1L de amostra, também são apresentados na Tabela 2. O LD foi calculado pela multiplicação do desvio padrão das 7 replicatas da menor concentração pelo valor de t Student com 6 graus de liberdade (n-1) e 95% de confiança. Para o cálculo do LQ considerou-se a média do branco da matriz utilizada mais cinco vezes o desvio padrão dessas determinações.

Tabela 2. Resumo dos resultados do estudo de validação da metodologia

	NP	Bisfenol A
<i>Equação da reta</i>	$y = 4 \text{ E}+06x - 118986$	$y = 1 \text{ E}+06x - 122509$
<i>R²</i>	0,997	0,996
<i>Intervalo linear</i>	0,05 – 2,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	0,10 – 4,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
<i>LD</i>	0,02 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,03 $\mu\text{g.L}^{-1}$
<i>LQ</i>	0,06 $\mu\text{g.L}^{-1}$	0,15 $\mu\text{g.L}^{-1}$

O teste z Score aplicado para avaliação da exatidão resultou em valores <2 , ou seja, os resultados são satisfatórios e o método é exato na faixa de concentração estudada. O desvio padrão relativo (DPR), um indicador da precisão e que para análises traços é aceito em até 20%, ficou abaixo de 10% para o nonilfenol e menor que 20% para o bisfenol A em todas as análises e em todos os pontos considerados.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados das recuperações nos três níveis de concentração avaliados, em triplicata. Como pode ser observado, as recuperações foram muito boas para ambos os compostos e estão dentro da faixa recomendada na literatura (70-120%).

Tabela 3. Resultados dos ensaios de recuperações dos analitos na matriz de água bruta para os três níveis de fortificação avaliados

	<i>Nível 1</i>	<i>Recuperação</i>	<i>Nível 2</i>	<i>Recuperação</i>	<i>Nível 3</i>	<i>Recuperação</i>
NP	0,15 $\mu\text{g.L}^{-1}$	95 %	0,80 $\mu\text{g.L}^{-1}$	81 %	2,00 $\mu\text{g.L}^{-1}$	70 %
BPA	0,30 $\mu\text{g.L}^{-1}$	116 %	1,60 $\mu\text{g.L}^{-1}$	110 %	4,00 $\mu\text{g.L}^{-1}$	71 %

Variáveis físico-químicas

Os resultados dos parâmetros de qualidade de água avaliados são referentes às médias dos dias de coleta. Conforme os dados expostos na Tabela 4, as variáveis estão em conformidade com os padrões estabelecidos para águas doces classe 2.

Variável	Guararema			São José dos Campos			Taubaté			Pindamonhangaba			CONAMA 357/05
	Jun	Set	Nov	Jun	Set	Nov	Jun	Set	Nov	Jun	Set	Nov	Classe 2
Temp. (°C)	-	19	21	-	19	22	-	20	24	-	19	25	-
pH	6,9	7,7	7,1	-	7,4	7,1	6,6	6,9	7,1	-	7,5	7,5	6,0 a 9,0
Turbidez (UNT)	21	5	6	24	17	16	32	28	34	42	28	32	≤ 100

Determinação dos compostos estudados nas águas superficiais do Paraíba do Sul

Foram analisadas 12 amostras de água bruta em quatro municípios do Vale do Paraíba paulista no ano de 2010. Os resultados apresentados na Tabela 5 são referentes à média de três análises para cada ponto. No caso de falso positivo ou negativo, foram realizadas adições padrão a fim de confirmar os valores.

Bisfenol A e isômeros do nonilfenol foram detectados em todas as amostras e nos três períodos de amostragem. As concentrações mais elevadas para ambos os compostos foram observadas em junho, o que pode ser atribuído à menor precipitação do período. Entre os municípios investigados, São José dos Campos, apresentou os maiores valores de contaminação por bisfenol A e nonilfenol. Dentre as quatro cidades, este é o município mais desenvolvido e com maior número de habitantes.

Tabela 5. Resultados obtidos para NP (LQ = 0,06 µg.L⁻¹) e BPA (LQ = 0,15 µg.L⁻¹) nas três coletas de 2010, nos pontos de captação de água superficial do rio Paraíba do Sul, utilizando 1L de amostra

Município	Nonilfenol (NP)		
	Junho	Setembro	Novembro
	Concentrações (µg.L ⁻¹)		
<i>Guararema</i>	0,247 ± 0,020	0,144 ± 0,046	0,085 ± 0,014
<i>São José dos Campos</i>	0,802 ± 0,056	0,684 ± 0,058	0,289 ± 0,029
<i>Taubaté</i>	0,592 ± 0,050	0,463 ± 0,068	0,162 ± 0,009
<i>Pindamonhangaba</i>	0,612 ± 0,036	0,399 ± 0,018	0,230 ± 0,022
Município	Bisfenol A (BPA)		
	Junho	Setembro	Novembro
	Concentrações (µg.L ⁻¹)		
<i>Guararema</i>	0,276 ± 0,018	< 0,15	< 0,15
<i>São José dos Campos</i>	0,206 ± 0,007	0,181 ± 0,013	< 0,15
<i>Taubaté</i>	0,256 ± 0,008	0,164 ± 0,006	< 0,15
<i>Pindamonhangaba</i>	0,265 ± 0,007	0,184 ± 0,003	< 0,15



As concentrações de NP variaram entre 0,085 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 0,802 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os níveis encontrados para este xenoestrógeno são similares a outros estudos realizados em bacias hidrográficas da região sudeste (MOREIRA et al., 2009). Se comparado ao valor guia adotado pelo Canadá, de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de NP em águas naturais, os níveis encontrados no Paraíba do Sul estão abaixo deste limiar.

Em 58% das amostras ($n=12$) foram obtidas concentrações acima do limite de quantificação (0,15 $\mu\text{g.L}^{-1}$) para o BPA, sendo o valor de 0,276 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a maior concentração avaliada. Outros estudos realizados em corpos hídricos no estado de São Paulo identificaram concentrações de BPA tanto superiores (LEANDRO, 2006) quanto inferiores (SODRÉ et al., 2010) às encontradas no Paraíba do Sul por este estudo.

CONCLUSÕES

- A metodologia analítica proposta para determinação dos compostos nonilfenol e bisfenol A em águas superficiais mostrou-se adequada ao uso, e pode ser evidenciado pelos resultados dos parâmetros avaliados na validação do método.

- As variáveis de qualidade de água demonstraram que as águas superficiais do rio Paraíba do Sul são de boa qualidade, e se enquadram nos padrões da Classe 2 para águas doces segundo a legislação vigente (CONAMA 357/05).

- Ambos contaminantes estrogênicos (NP e BPA) foram detectados em 100% das amostras de água bruta, demonstrando que as atividades antrópicas na região influenciam a qualidade das águas deste recurso hídrico.

- O monitoramento das águas da bacia hidrográfica do Paraíba do Sul deverá ser estendido à água potável a fim de verificar a eficácia do tratamento quanto à remoção destas substâncias e garantir o não comprometimento do abastecimento público.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à SABESP pelo apoio durante as coletas e aquisição dos dados físico-químicos, ao IPEN-CNEN/SP pela viabilização desta pesquisa e ao CNPq pelo apoio financeiro e pela bolsa.

NOTAS

1. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN – CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, CQMA, 05508-000, São Paulo, SP, Brasil,



- re_rodrigues_souza@yahoo.com.br, bolsista de mestrado – autor correspondente
2. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN – CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, CQMA, 05508-000, São Paulo, SP, Brasil, elaine@ipen.br, pesquisadora
 3. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN – CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, CQMA, 05508-000, São Paulo, SP, Brasil, helioaf@ipen.br, pesquisador
 4. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN – CNEN/SP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, CQMA, 05508-000, São Paulo, SP, Brasil, mecotrim@ipen.br, pesquisadora-coordenadora

REFERÊNCIAS

AHEL, M.; SCULLY, F.E.; HOIGNÉ, J.; GIGER, W. Photochemical degradation of nonylphenol and nonylphenol polyethoxylates in natural waters. *Chemosphere*, v.28, 1994.

BALLESTEROS-GÓMEZ, A.; RUBIO, S.; PÉREZ-BENDITO, D. Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, 2009.

BRASIL. Ministério do desenvolvimento urbano e meio ambiente. Conselho nacional do meio ambiente (CONAMA). Resolução n. 357, D.O.U. de 17/03/05, Brasília.

CANADA. Canadian Environmental Quality Guidelines. Canadian Water Quality Guidelines for the protection of aquatic life. Nonylphenol and its ethoxylates. 2002.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Guia de coleta e preservação de amostras de água. São Paulo, 1987.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 03. Fev. 2010.

LEANDRO, F.Z. Bisfenol A: validação de método e ocorrência em água superficial e tratada da cidade de Araraquara. Dissertação de mestrado – Universidade Estadu-

MOREIRA, D.S.; AQUINO, S.F.; AFONSO, R.J.C. F.; SANTOS, E.P.P.C.; PÁDUA, V.L. Occurrence of endocrine disrupting compounds in water sources of Belo Horizonte Metropolitan Area, Brazil. *Environmental Technology*, v. 30, n.10, 2009.

REBOUÇAS, A.D. Água e desenvolvimento rural. *Estudos Avançados*, v.15, n.43, 2001.

SOARES, A.; GUIEYSSE, B.; JEFFERSON, B.; CARTMELL, E.; LESTER, J.N. Nonyphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*, v.34, p.1033-1049, 2008.

SODRÉ, F.F.; PESCARA, I.C.; MONTAGNER, C.C.; JARDIM, W.F. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*, v. 96, p. 92-98, 2010.

TUCCI, C.E.M. Águas urbanas. *Estudos Avançados*, v. 22, n. 63, 2008.

