



FENASAN

XXIII Feira Nacional de
Saneamento e Meio Ambiente



XXIII Encontro Técnico
AESABESP

Congresso Nacional de
Saneamento e Meio Ambiente



MARCADORES QUÍMICOS EM ÁGUAS SUPERFICIAIS DO RIO PARAÍBA DO SUL, SP: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

Autores : Caroline Lima de Oliveira ⁽¹⁾

Elaine Arantes Jardim Martins ⁽¹⁾

Hélio Akira Furusawa ⁽¹⁾

Marycel Elena Barboza Cotrim ⁽¹⁾

¹ Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP)

INTRODUÇÃO

- População mundial **triplicou** nos últimos 100 anos;
- Demanda por água limpa se **multiplicou por 6**.
- Abundância do recurso no Brasil: **Inspira atenção!**
 - **75%** das águas dos seus 12 mil rios e córregos → Região norte → bacia do Amazonas → **6 % da população**.
 - Estado de São Paulo → **mais de 20% da população brasileira** → **menos de 2% da água** com qualidade do País.

INTRODUÇÃO

- **Escassez** dos recursos hídricos com qualidade em regiões metropolitanas do Brasil:
 - Falta da preservação dos mananciais:
 - Contaminação gerada pelos efluentes da população urbana, tais como: **esgoto doméstico, industrial e pluvial.**
- Reflexos sobre a manutenção das **condições ideais**:
 - Sobrevivência dos organismos aquáticos;
 - **Saúde pública → Doenças de veiculação hídrica:**
 - **Cólera, Hepatite A, Diarréia, entre outras.**

INTRODUÇÃO



Pesquisa Nacional de Saneamento Básico:

- Municípios brasileiros com coleta de esgoto → **55,2 %** (IBGE, 2008)
- Municípios brasileiros com tratamento de esgoto → **28,5%** (IBGE, 2008).

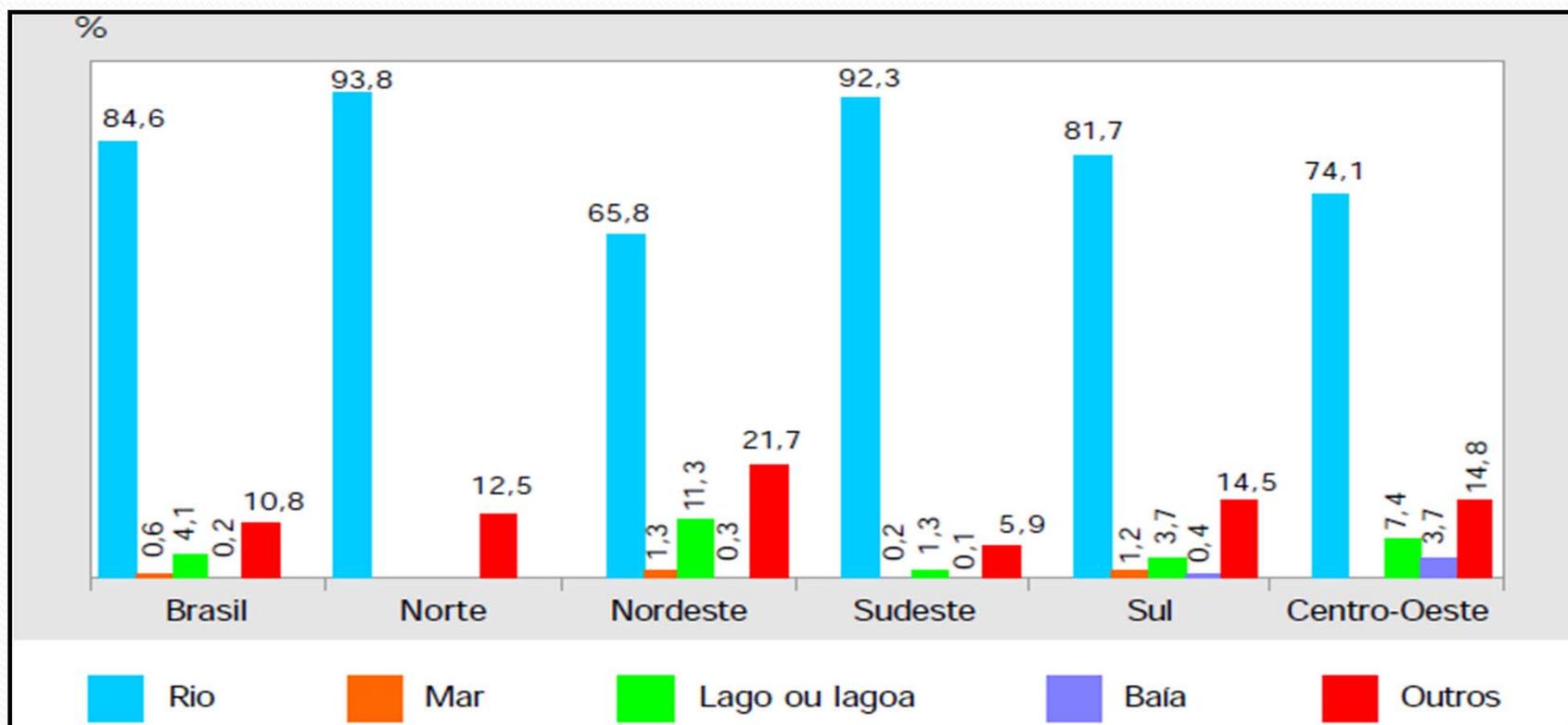


FIGURA 1. Proporção de municípios sem tratamento de esgoto sanitário, por tipo de corpo receptor, segundo as Grandes Regiões – 2000. **Fonte:** Pesquisa Nacional de Saneamento Básico - IBGE (2000).

INTRODUÇÃO



- Uso de **marcadores de poluição** por esgoto doméstico em ambientes aquáticos:
 - Marcadores **microbiológicos**;
 - Marcadores **químicos**.

INTRODUÇÃO



- **Marcadores microbiológicos**

- Representantes: Bactérias coliformes (totais e fecais), *Escherichia coli* e estreptococos.
- Vantagens: Quantificação → **simples, rápida e de baixo custo.**

- Brasil e na maioria dos países → **diretrizes** de qualidade de água.

- Consumo, Contato primário e secundário → número de bactérias presentes.

- Desvantagens : **Susceptibilidade em regiões tropicais:**

- Crescimento e sobrevivência são afetados por fatores ambientais:
 - Temperatura da água, luz solar e precipitação.
- Não são capazes de distinguir as diferentes fontes de contaminação por aporte de esgoto.

INTRODUÇÃO

- **Marcadores químicos** de contaminação por esgoto → alternativa em relação aos métodos microbiológicos.
 - Vantagens: **menos susceptíveis** às mudanças ambientais.
- Classe dos esteróis → Marcadores químicos **mais utilizados** em estudos sobre o aporte de esgoto:
 - Avaliação do histórico de distribuição do esgoto em ambientes aquáticos.
- Representantes da classe dos esteróis:
 - Colesterol;
 - Coprostanol;
 - Colestanol;
 - Estigmasterol.

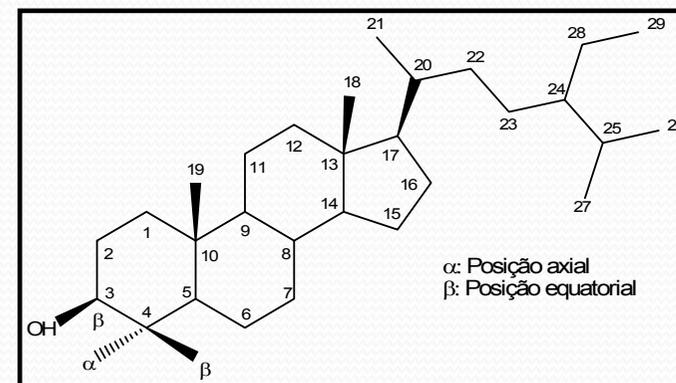


FIGURA 2. Estrutura geral da molécula de esterol.

INTRODUÇÃO

Colesterol (5-colesten-3 β -ol)

- **Principal esteróide** de origem animal.
- Síntese por outros eucariotas → plantas e fungos.
- Matrizes ambientais:
 - Maior proporção: **sedimentos** de vários sistemas aquáticos;
 - Menor proporção: **águas** superficiais.
- Origem: **Natural ou antrópica**

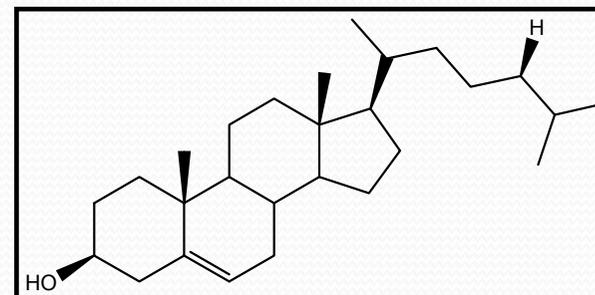


FIGURA 3. Estrutura química do colesterol.

INTRODUÇÃO

Coprostanol (5 β -colestan-3 β -ol) e Colestanol 5 α -colestan-3 β -ol

- Precursor: **colesterol**
 - **Mesmas matrizes** ambientais do precursor;
 - **Gerados e excretados** através do metabolismo do colesterol pelo intestino \rightarrow redução bacteriana;
 - Colestanol \rightarrow Origem biogênica;
 - Coprostanol \rightarrow **Material fecal:**
 - 10x mais coprostanol em fezes humanas.

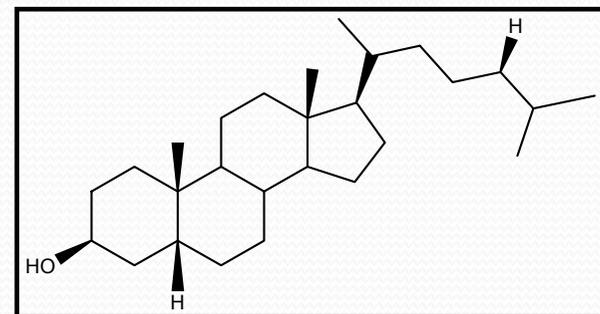


FIGURA 4. Estrutura química do coprostanol.

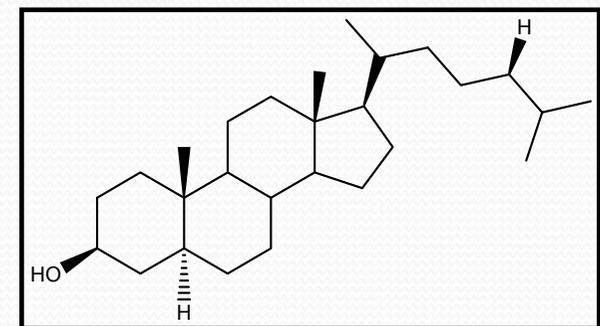


FIGURA 5. Estrutura química do colestanol.

INTRODUÇÃO

Estigmasterol (5,22-colestadien-24-etil-3 β -ol)

- **Principal esteróide** de plantas superiores;
- Origem: **Fontes naturais de matéria orgânica**;
- Marcador de poluição fecal → **Efluentes pecuários**.

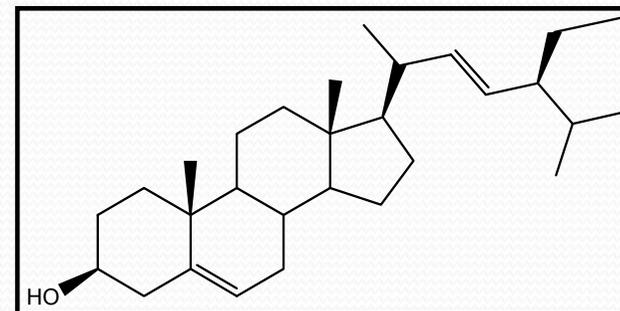


FIGURA 6. Estrutura química do estigmasterol.

INTRODUÇÃO

- **Águas Superficiais → Bacia do rio Paraíba do Sul**
- Área de drenagem → cerca de 62.074 km²
- **Bacia hidrográfica impactada:**
 - 1 bilhão de litros de esgotos domésticos → despejados diariamente na bacia do Paraíba;
 - 90% dos municípios não contam com estação de tratamento de esgotos.

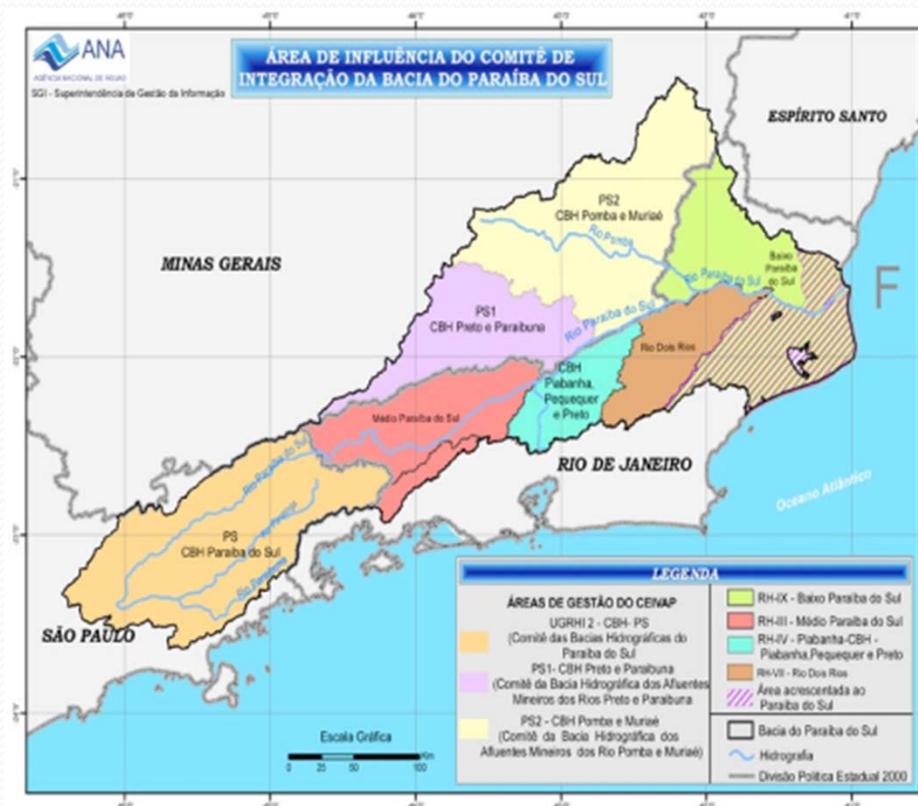


FIGURA 7. Área de abrangência da Bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul. Fonte: CEIVAP-AGEVAP, 2011.

INTRODUÇÃO – Área de estudo



Área de estudo: Região do Vale do Paraíba → Conjunto de problemas ambientais
→ intenso desenvolvimento das atividades urbano-industriais e agropecuárias.



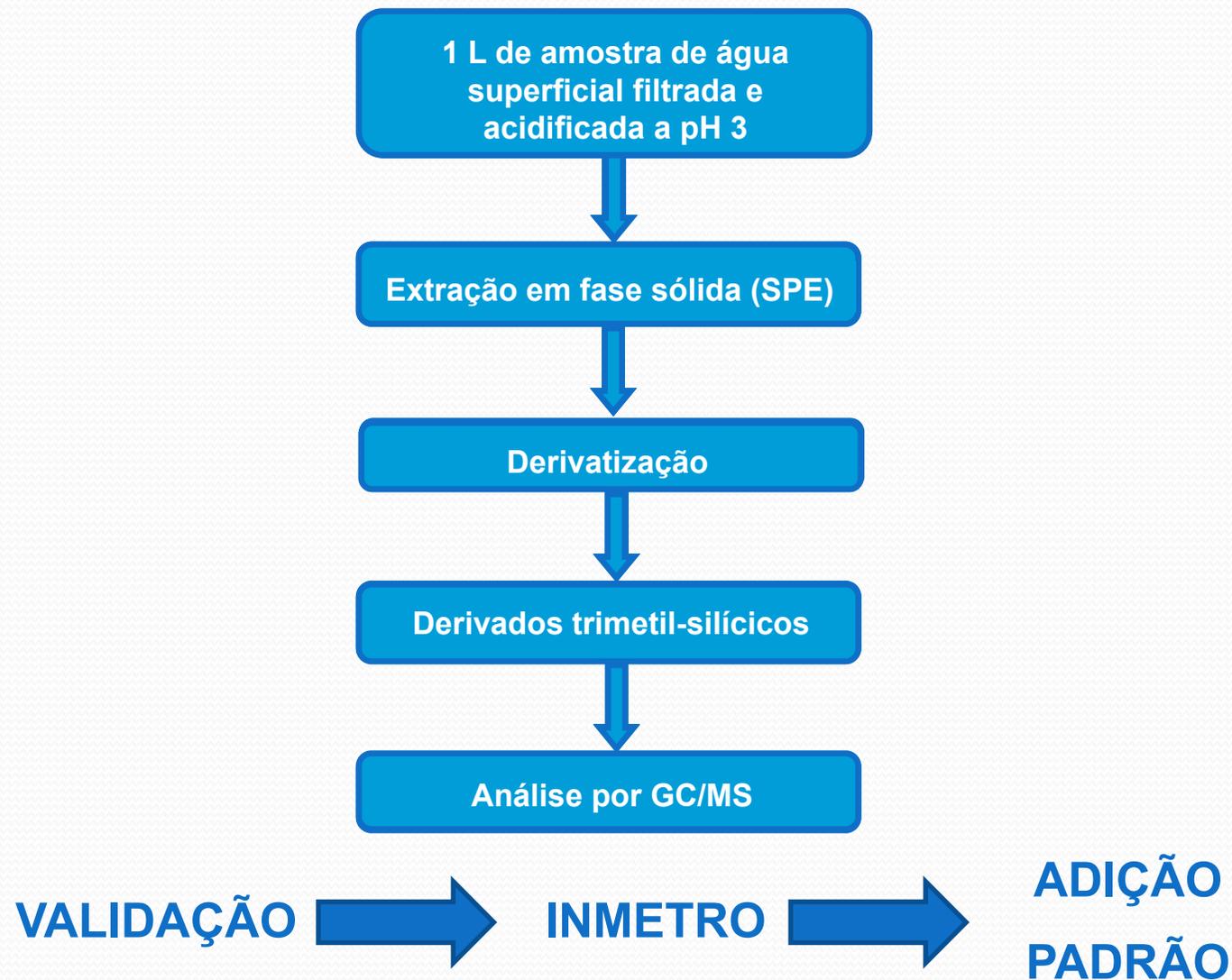
Parceria IPEN - SABESP

FIGURA 8. Porção paulista da Bacia Hidrográfica do rio Paraíba do Sul e os municípios de interesse. Fonte: Novaes, 2006.

OBJETIVOS

- **Apresentar metodologia analítica desenvolvida, adaptada e otimizada para a extração, derivatização e quantificação de marcadores químicos da classe dos esteróis – coprostanol, colesterol, colestanol e estigmasterol;**
- **Apresentar parâmetros utilizados para validar a metodologia desenvolvida;**
- **Apresentar os resultados obtidos utilizando a metodologia em amostras de água superficiais provenientes de áreas de captação do Rio Paraíba do Sul coletadas nas ETAs de Guararema, Pindamonhangaba, São José dos Campos e Taubaté.**

MATERIAIS E MÉTODOS



RESULTADOS E DISCUSSÃO

VALIDAÇÃO DO MÉTODO: SELETIVIDADE → 0,4 – 1 µg mL⁻¹

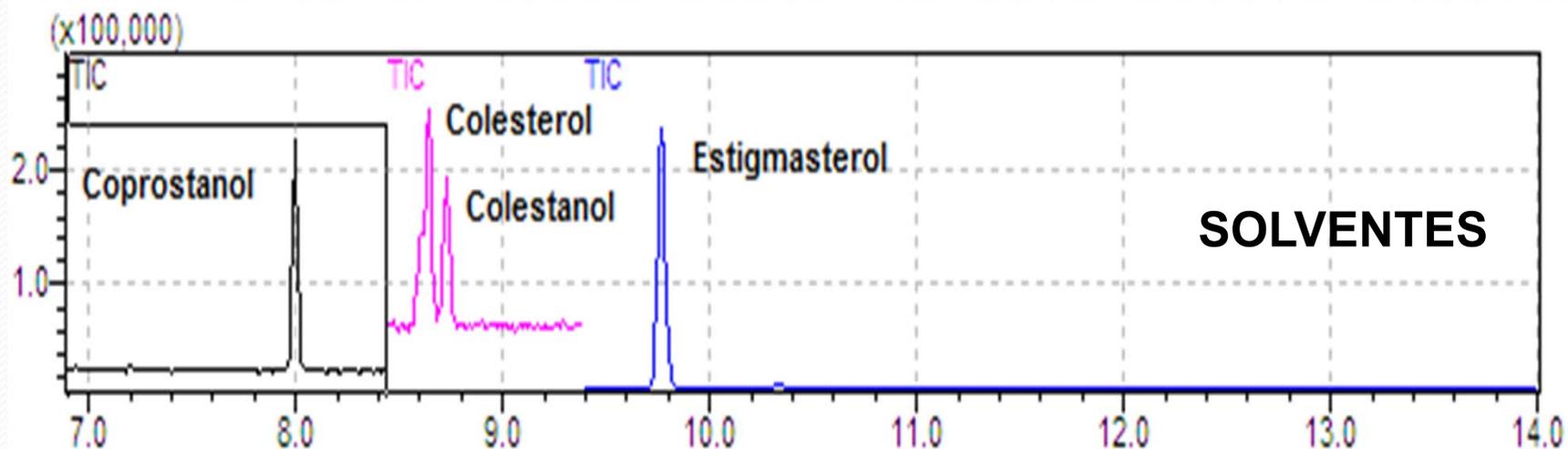


FIGURA 9. Mistura dos compostos estudados em **solventes** obtido no modo SIM.

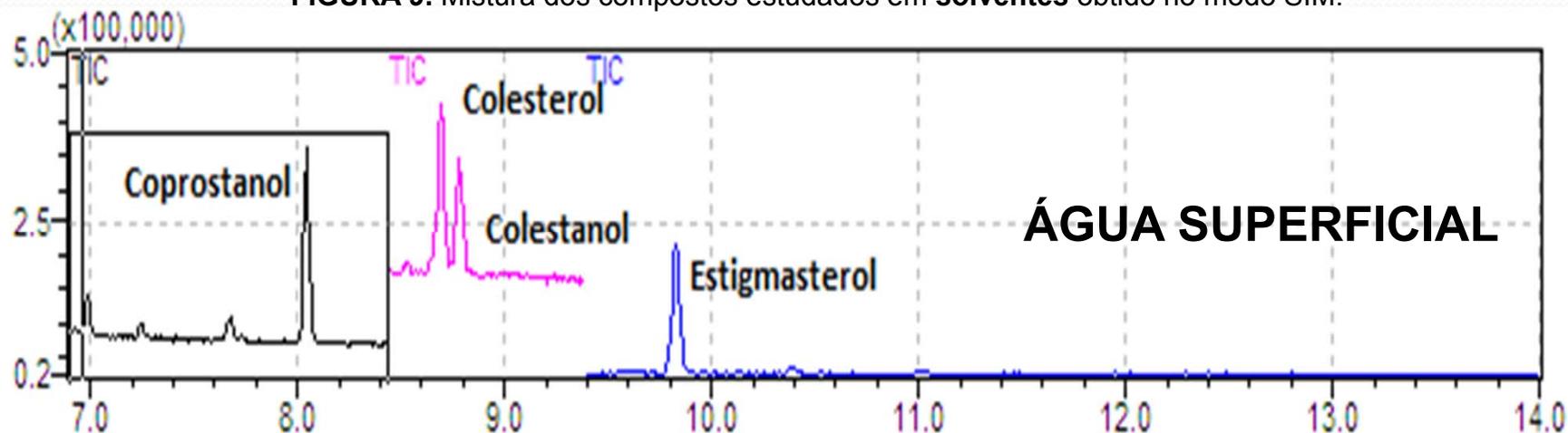


FIGURA 10. Mistura dos compostos estudados na matriz de **água superficial** obtido no modo SIM.

RESULTADOS E DISCUSSÃO



- SELETIVIDADE: Teste F - *Snedecor* e teste t - *Student*

TABELA 1. Resultados da seletividade pela aplicação dos testes F e t para os compostos estudados, pela adição padrão somente nos solventes e na matriz de água superficial. Considerando $F_{\text{tabelado}} = 4,28$ e $t_{\text{tabelado}} = 2,179$.

Coprostanol			Colesterol		
Matriz de Água superficial			Matriz de Água superficial		
Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	F_{calc}	t_{calc}	Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	F_{calc}	t_{calc}
0,125	2,3	13	0,05	0,25	8,3
0,25	17	13	0,10	12	8,9
0,50	8,0	16	0,20	3,1	7,2
1,00	9,7	10	0,40	3,5	6,2
2,00	72	21	0,80	32	16
3,50	5,0	24	1,40	2,9	18
5,25	2,0	17	2,10	1,8	10
7,00	22	32	2,80	12	20

- SELETIVIDADE: Teste t – Inclinação e paralelismo e Teste t do intercepto

TABELA 2. Valores de t calculado obtidos para os testes de inclinação e paralelismo e do intercepto pela aplicação do teste t - *Student* na matriz de água superficial, considerando os dois conjuntos de amostras com 7 graus de liberdade e 95% de confiança, onde **2,179** é o valor crítico.

T _{Calculado} – Matriz de água superficial		
Composto	Teste de inclinação e Paralelismo	Teste do Intercepto
Coprostanol	49	2,7
Colesterol	59	3,4
Colestanol	39	2,7
Estigmasterol	53	3,7

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- LINEARIDADE E FAIXA DE TRABALHO – ÁGUA SUPERFICIAL

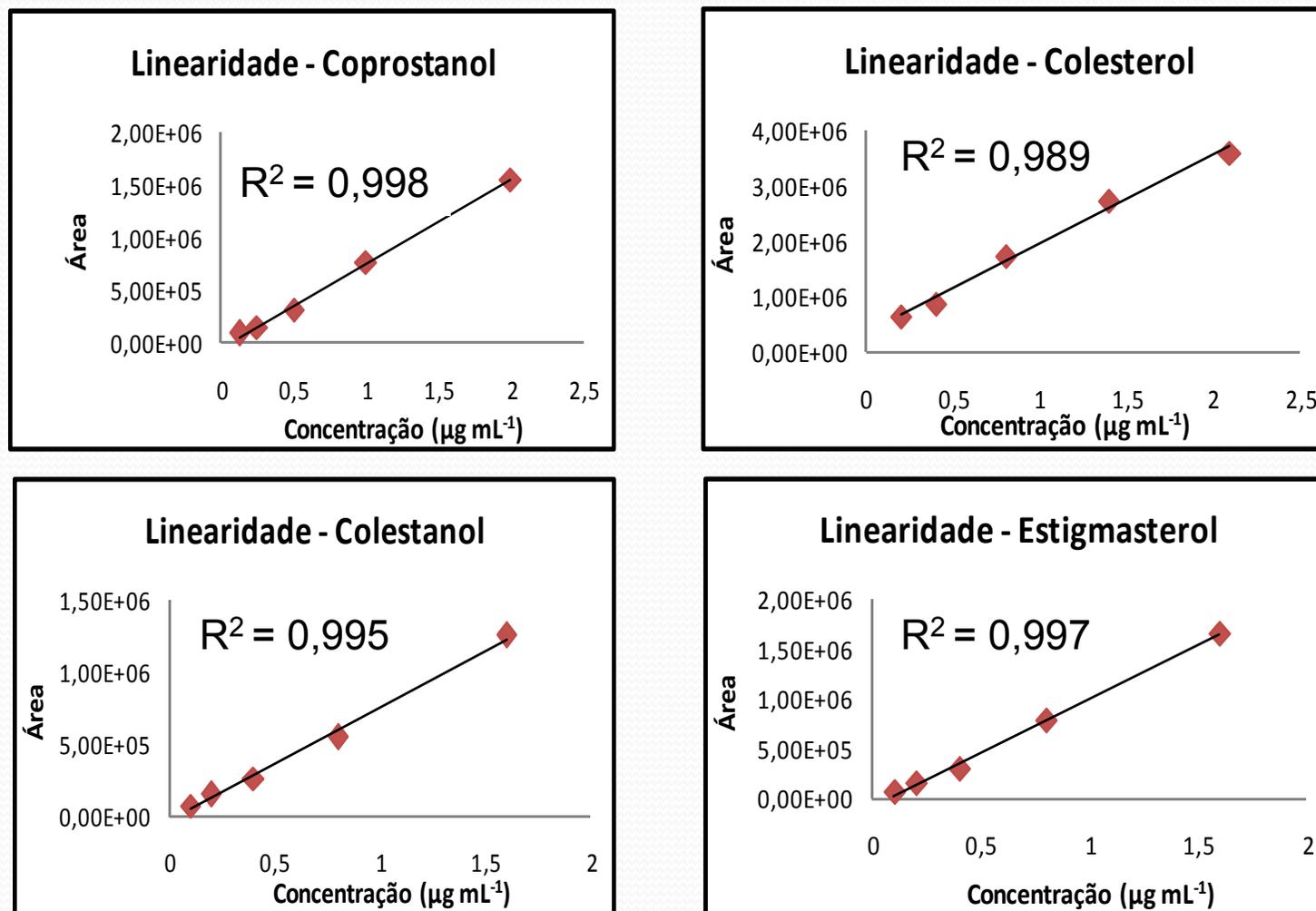


FIGURA 11. Representação gráfica da linearidade para os esteróis de estudo na matriz de água superficial.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)

TABELA 3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para o esteróis de estudo na matriz de água superficial (AS) .

Esterol	Limites do método – MATRIZ DE AS	
	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Coprostanol	0,029	0,215
Colesterol	0,080	0,250
Colestanol	0,032	0,162
Estigmasterol	0,031	0,134

RESULTADOS E DISCUSSÃO



- PRECISÃO – COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (CV %)

TABELA 4. Coeficientes de variação (CV %) para os compostos em três níveis de concentração no ensaio com matriz de água superficial.

MATRIZ DE ÁGUA SUPERFICIAL				
Coprostanol	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,25	1	5,25
	CV (%)	9,9	11,0	6,7
Colesterol	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,8	1,4	2,1
	CV (%)	10,5	10,5	8,8
Coletanol	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,1	0,8	4,2
	CV (%)	12,3	12,9	5,6
Estigmasterol	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,2	0,8	4,2
	CV (%)	7,6	6,9	6,2

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- EXATIDÃO – ÍNDICE Z (Z SCORE)

TABELA 5. Resultados do índice Z (Z Score) para os esteróis em água superficial.

Composto	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Índice Z (Z Score)
		Matriz água superficial
Coprostanol	0,250	0,32
Colesterol	0,200	0,60
Colestanol	0,200	0,27
Estigmasterol	0,200	0,83

$Z \leq 2$ = Resultado satisfatório;
 $2 < Z \leq 3$ = Resultado questionável;
 $Z > 3$ = Resultado insatisfatório.

- EXATIDÃO – RECUPERAÇÃO

TABELA 6. Resultados dos estudos de recuperação na matriz de água superficial considerando três níveis de fortificação (n=3).

Composto	Recuperação – Matriz Água superficial					
	Nível baixo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Rec %	Nível Médio ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Rec %	Nível Alto ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Rec %
Coprostanol	0,25	113	2,0	65	7,0	111
Colesterol	0,1	154	0,8	60	2,8	102
Colestanol	0,2	92	1,6	63	5,6	99
Estigmasterol	0,2	119	1,6	63	5,6	93

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- ROBUSTEZ – Planejamento Fracionário Saturado

TABELA 7. Fatores selecionados para avaliação da robustez.

Fator	Nominal	Varição
<i>Clean-up</i>	Sim	Não
pH da amostra	3	Original
Temp. de derivatização	100	70
Temp. do injetor	300	280
Temp. da interface	300	280
Fluxo coluna	1,7	1,5
Voltagem do detector	2,5	2,3

RESULTADOS E DISCUSSÃO



- ROBUSTEZ - Significância dos efeitos – Água superficial

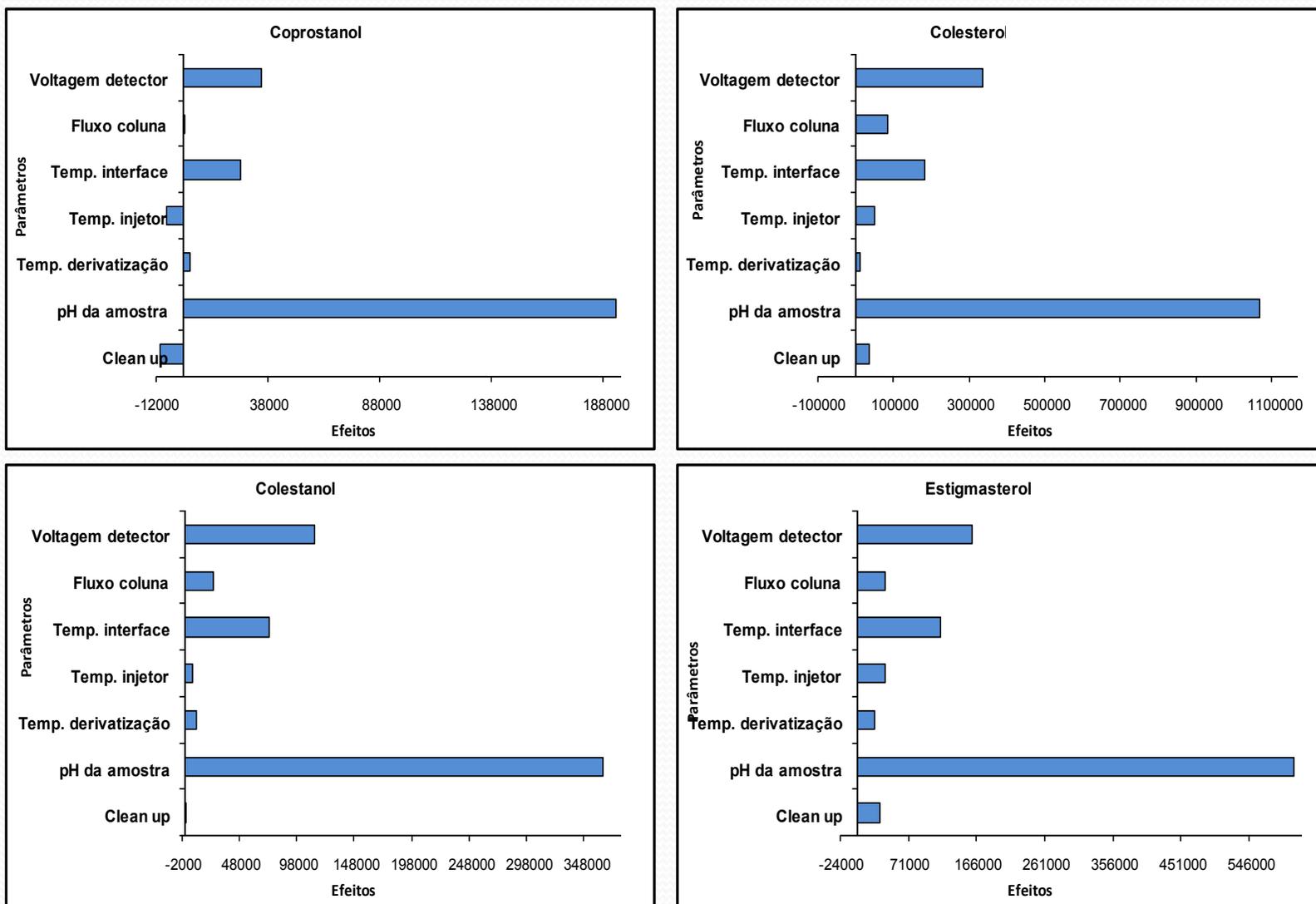


FIGURA 12. Verificação da significância dos efeitos para os esteróis na matriz de água superficial.

RESULTADOS E DISCUSSÃO



- ROBUSTEZ – Rankit - Água superficial

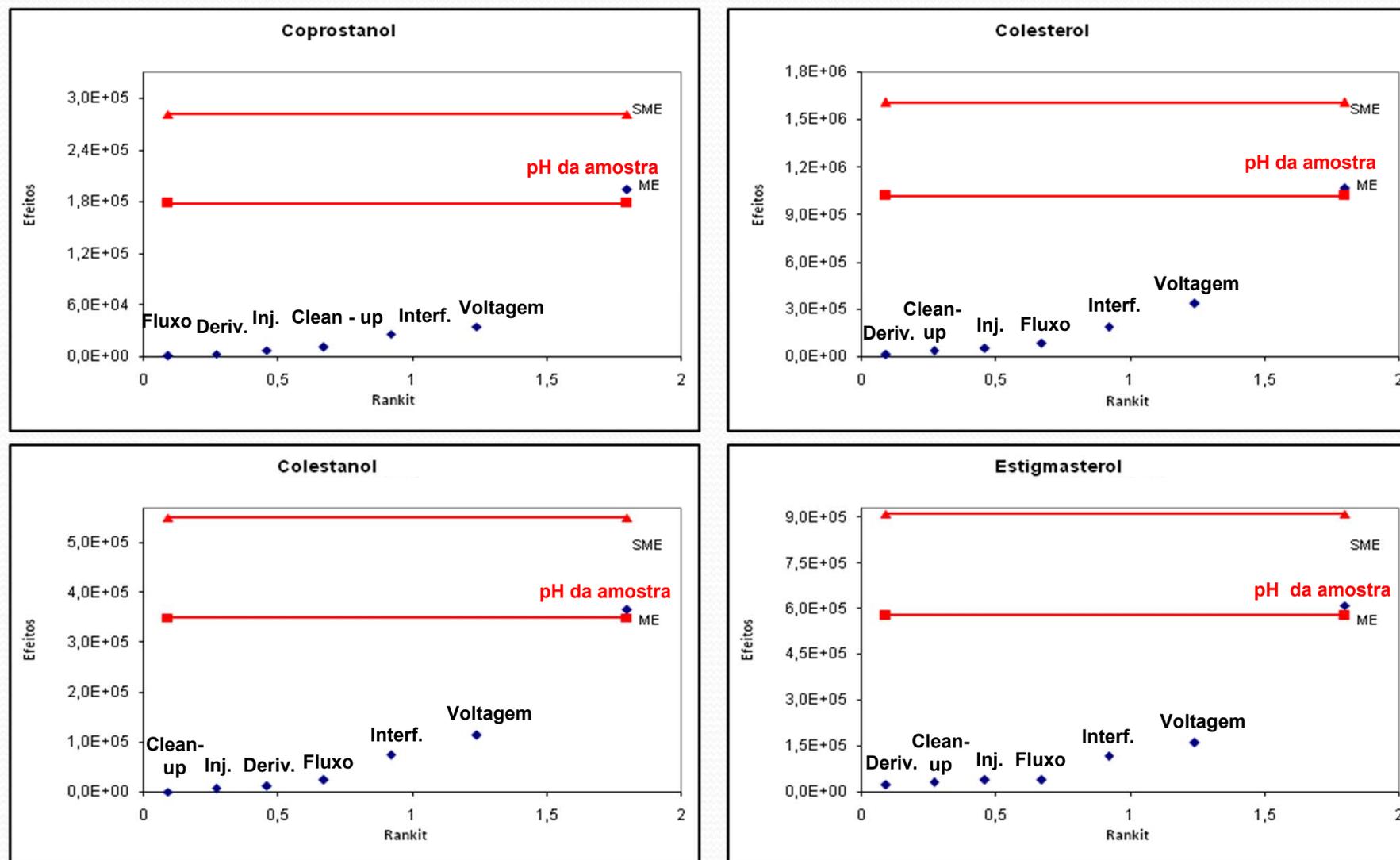


FIGURA 13. Gráficos de rankit para os esteróis na matriz de água superficial.

RESULTADOS E DISCUSSÃO



Aplicação do método

TABELA 8. Resultados das análises das coletas das amostras de água superficial dos quatro municípios de estudo.

1ª Coleta – Junho de 2011 - Concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$ na amostra				
Amostra	Coprostanol	Colesterol	Coletanol	Estigmasterol
ASG	0,48 \pm 0,05	< LD	0,21 \pm 0,03	0,10 \pm 0,02
AST	0,80 \pm 0,02	1,83 \pm 0,02	0,42 \pm 0,01	0,21 \pm 0,01
ASP	1,01 \pm 0,02	0,71 \pm 0,02	0,60 \pm 0,01	0,22 \pm 0,02
ASSJC	0,82 \pm 0,08	1,04 \pm 0,01	0,40 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01

2ª Coleta – Outubro de 2011 - Concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$ na amostra				
Amostra	Coprostanol	Colesterol	Coletanol	Estigmasterol
ASG	< LD	< 0,25	< LD	< 0,13
AST	<0,21	< 0,25	< LD	< LD
ASP	<0,21	< 0,25	< LD	< LD
ASSJC	<0,21	0,58 \pm 0,13	< LD	<0,13

3ª Coleta – Dezembro de 2011 - Concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$ na amostra				
Amostra	Coprostanol	Colesterol	Coletanol	Estigmasterol
ASG	0,45 \pm 0,07	0,29 \pm 0,04	0,52 \pm 0,08	< 0,13
AST	< 0,21	0,27 \pm 0,07	< LD	< LD
ASP	< LD	0,39 \pm 0,08	< LD	< LD
ASSJC	< LD	< 0,25	0,29 \pm 0,04	< LD

Legenda: ASG: Água superficial de Guararema; AST: Água superficial de Taubaté; ASP: Água superficial de Pindamonhangaba; ASSJC: Água superficial de São José dos Campos.
LD: Limite de detecção do método.

RESULTADOS E DISCUSSÃO



TABELA 9. Concentrações dos esteróis de estudo em amostras de águas superficiais (AS) em diferentes regiões do mundo.

Local	Tipo de amostra	Coprostanol ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Colesterol ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Colestanol ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Estigmasterol ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referências Bibliográficas
Brasil (Paraíba do Sul)	AS	< 0,2 a 1,0	< 0,2 a 1,8	< 0,1 a 0,6	< 0,1 a 0,2	Este estudo
Estados Unidos	AS	0,08 a 0,7	0,83 a 1	---	---	Kolpin <i>et al.</i> , 2002.
Austrália	AS	---	1 a 9	---	34	Suprihatin <i>et al.</i> , 2003.
Brasil (Campinas)	AS	5 a 41	9 a 30	< 3 a 40,2	< 4,5 a 85,5	Ghiselli, 2006.
Malásia (Rio Langat)	AS	4 a 26	52 a 59,9	---	1,8 a 7,5	Saim <i>et al.</i> , 2009.
Países da Europa	AS	0,05 a 1,7	< 0,05 a 2,1	0,06 a 0,4	< 0,05 a 7,2	Costa <i>et al.</i> , 2011.
Canadá (Nathan Creek)	AS	< LD *	0,02 a 58,2	< LOQ *	< LOQ *	Furtula <i>et al.</i> , 2012.

AS: Água superficial.

* LOQ descrito pelo autor para todos os esteróis: 0,005 $\mu\text{g L}^{-1}$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Presença dos isômeros coprostanol e colestanol → **descarga de esgoto doméstico**:
 - Parte do esgoto coletado nos municípios de estudo retorna ao corpo hídrico **sem tratamento ou ainda contaminado** com os compostos que não sofreram degradação nas ETEs.
- Presença do colesterol → fontes → naturais ou antrópicas → **Não pode ser utilizado como indicador direto de contaminação por esgotos.**
- Presença do estigmasterol:
 - Nas amostras de **água superficiais** → Contribuição vegetal e descarte de efluentes pecuários.
- **Ausência de legislação nacional ou internacional que contemple os esteróis**:
 - Alternativa: Alguns autores propuseram concentrações máximas para o coprostanol relacionando com o nº de bactérias existentes.
 - Índices envolvendo os esteróis de estudo, cujo resultado indica o impacto causado na região estudada pelo aporte de esgoto doméstico.
- Caracterização preliminar da área de estudo → contaminação por esgoto doméstico → **Nº maior de amostragens → Confirmação de tendências!**

CONCLUSÕES



1. A **metodologia desenvolvida** por este estudo mostrou-se, com base no processo de validação, ser **adequada** para a análise dos esteróis coprostanol, colesterol, colestanol e estigmasterol como marcadores químicos na matriz de água superficial.
2. A metodologia desenvolvida mostrou ser **linear, precisa e exata na faixa de trabalho proposta**.
3. Na matriz de estudo, os esteróis de interesse apresentaram nos três níveis de concentração estudados, **valores de recuperação dentro da faixa recomendada pela literatura**. Observou-se um maior efeito matriz para o nível baixo de concentração para o analito colesterol.
4. A partir dos resultados de robustez, a metodologia foi considerada **robusta**, entretanto, constatou-se que o **parâmetro pH** encontra-se em uma região de atenção o que sugere que a acidez é importante para a robustez do método.
5. Constatou-se pela aplicação da metodologia nas amostras de água provenientes do rio Paraíba do Sul, que **há a ocorrência dos marcadores químicos**, sendo predominante a presença do colesterol. Porém, um número maior de amostragens deve ser estudado para que as tendências sejam confirmadas e, com isso, atestar sobre a eficiência do tratamento realizado pelas ETES da SABESP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CEIVAP – AGEVAP. **Relatório de situação: bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul 2010-2011**. Resende, RJ: CEIVAP – AGEVAP, 2011.
- CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Guia de coleta e preservação de amostras de água**. São Paulo: CETESB, 1987.
- COSTA, T. L. F.; ARAÚJO, M. P.; KNOPPERS, B. A.; CARREIRA, R. S. Sources and Distribution of Particulate Organic Matter of a Tropical Estuarine-Lagoon System from NE Brazil as Indicated by Lipid Biomarkers. **Aquat Geochem**, v. 17, p. 1–19, 2011.
- GHISELLI, G. **Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP)**. 2006. Tese (Doutorado) - Universidade de Campinas, São Paulo.
- INMETRO – Instituto Nacional De Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 01. Mar. 2003.
- FURTULA, V.; OSACHOFF, H.; DERSEN, G.; JUAHIR, H.; COLODEY, A.; CHAMBERS, P. Inorganic nitrogen, sterols and bacterial source tracking as tools to characterize water quality and possible contamination sources in surface water. **Water Research**, v. 46, p. 1079 -1092, 2012.
- LEEMING, R.; NICHOLS, P. D. Concentrations of coprostanol that correspond to existing bacterial indicator guideline limits. **Water Research**, v. 30, n. 12, p. 2997-3006, 1996.
- SAIM, N.; OSMAN, R.; SPIAN, D. R. S. A.; JAAFAR, M. Z.; JUAHIR, H.; ABDULLAH, M.; GHANI, F. A. Chemometric approach to validating faecal sterols as source tracer for faecal contamination in water. **Water Research**, v. 43, p. 5023-5030, 2009.
- SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Occurrence of Emerging Contaminants in Brazilian Drinking Waters: A Sewage-To-Tap Issue. **Water Air Soil Pollut**, v. 206, p. 57-67, 2010b.
- SUPRIHATIN, I.; FALLOWFIELD, H.; BENTHAM, R.; CROMAR, N. Determination of faecal pollutants in Torrens and Patawalonga catchment waters in South Australia using faecal sterols. **Water Science and Technology**, v. 47, n. 7–8, p. 283 – 289, 2003.

AGRADECIMENTOS



Contato: caroline.lima@cemsalab.com.br