

XXIII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS HIDRÍCOS

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ESTRÓGENOS NA ÁGUA NO BRAÇO RIO GRANDE DA REPRESA BILLINGS – SP

*Lucia Helena Gomes Coelho¹; Tatiane Araújo de Jesus¹; Marcio Y. Kohatsu¹; Geovana T. Poccia¹;
Vitor Chicarolli¹; Karin Helwig²; Colin Hunter²; Joanne Roberts²; Paul Teedon²; Ole Pahl²*

RESUMO – Os estrógenos são considerados os responsáveis pela maioria dos efeitos endócrinos desencadeados pela disposição de esgotos sanitários, tratados ou não, em mananciais de abastecimento. O presente estudo avaliou as concentrações dos hormônios 17 β -estradiol (E2, de origem natural) e 17 β -etinilestradiol (EE2, sintético) em águas superficiais do braço Rio Grande, localizado na Região Metropolitana de SP. Avaliaram-se quatro estações de amostragem: (S1 e S2), respectivamente, uma área preservada (referência) e uma de captação de água para abastecimento; (S3 e S4) córregos que afluem para o reservatório e recebem efluentes brutos e tratados, respectivamente, de áreas residenciais da bacia de drenagem do reservatório. Oito campanhas de amostragem foram realizadas entre junho de 2017 e fevereiro de 2018. Para análise dos hormônios, amostras foram pré-concentradas utilizando cartuchos de extração em fase sólida (C₁₈) e analisadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, com limites de quantificação (LOQ) de 100 ng L⁻¹. As variáveis pH, temperatura da água, condutividade elétrica e sólidos totais dissolvidos foram determinadas *in situ*. S1 apresentou concentrações de hormônios abaixo do LOQ; nas outras estações de amostragem, as concentrações de E2 variaram de <LOQ a 1720 ng L⁻¹ e EE2 de <LOQ a 1200 ng L⁻¹, com as maiores concentrações encontradas nos córregos.

ABSTRACT– Estrogens are responsible for most of the endocrine effects triggered by the provision of sanitary sewage, treated or untreated, in water supply sources. The present study evaluated the concentrations of the hormones 17 β -estradiol (E2, of natural origin) and 17 β -ethinylestradiol (EE2, synthetic) in surface waters of the Rio Grande branch, located at Metropolitan Region of Sao Paulo. Four sampling stations were evaluated: (S1 and S2), respectively, a preserved area (reference) and a water supply caption station; (S3 and S4) streams that flow into the reservoir and receive raw and treated effluents, respectively, from residential areas of the reservoir drainage basin. Eight sampling campaigns were carried out between June 2017 and February 2018. For analysis of the hormones, samples were preconcentrated using solid phase extraction cartridges (C₁₈) and analyzed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry, with limits of quantification (LOQ) of 100 ng L⁻¹. The pH, water temperature, electrical conductivity and total dissolved solids variables were determined *in situ*. S1 presented concentrations of hormones below the LOQ; at the other sampling stations, E2 concentrations varied from <LOQ to 1720 ng L⁻¹ and EE2 from <LOQ to 1200 ng L⁻¹, with the highest concentrations found in streams.

Palavras-Chave – disruptores endócrinos; reservatórios urbanos.

1) Universidade Federal do ABC, Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais Aplicadas
Av. dos Estados, 5001 – Santo André – SP
Fone: (11) 4996-8206; e-mail: lucia.coelho@ufabc.edu.br

2) Glasgow Caledonian University
Cowcaddens Road, Glasgow, Scotland, UK, G4 0BA

INTRODUÇÃO

O uso de águas superficiais para o consumo humano, bem como a transformação de seus mananciais como receptores de esgotos sanitários tratados ou não, tem sido os principais motivos de preocupação acerca da contaminação das fontes de água. Nas últimas décadas, um dos temas de grande relevância na área ambiental é a questão de contaminação de mananciais com micropoluentes emergentes, ou seja, compostos orgânicos e inorgânicos que mesmo em baixas concentrações (da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1}) apresentam risco potencial para a saúde humana e para o meio ambiente. Esses contaminantes englobam uma grande diversidade de compostos químicos naturais ou sintéticos, nos quais se incluem fármacos, produtos de higiene pessoal, hormônios, surfactantes, retardantes de chama, agrotóxicos e nanopartículas (Quadra *et al.*, 2017). Dentre esses micropoluentes destaca-se um grupo conhecido como desreguladores endócrinos (DEs), que inclui substâncias exógenas que têm a capacidade de alterar as funções do sistema endócrino, provocando assim efeitos adversos à saúde humana e ao ecossistema (Rani & Karthikeyan, 2016).

Dentre os vários DEs, a presença de estrógenos em águas para abastecimento público tem gerado grande preocupação na comunidade acadêmica e na sociedade, uma vez que ainda poucas informações são conhecidas quanto aos problemas que esses hormônios podem ocasionar nos compartimentos ambientais e sobre os mecanismos de transporte e depuração desses compostos no ambiente, reduzindo as concentrações pontuais desses no ambiente (Pereira *et al.*, 2015). Os estrógenos introduzidos no ambiente podem ser naturais, como 17β -estradiol, estriol, estrona ou sintéticos como 17α -etinilestradiol e levonorgestrel (Pereira *et al.*, 2015). A Figura 1 apresenta a estrutura química desses hormônios.

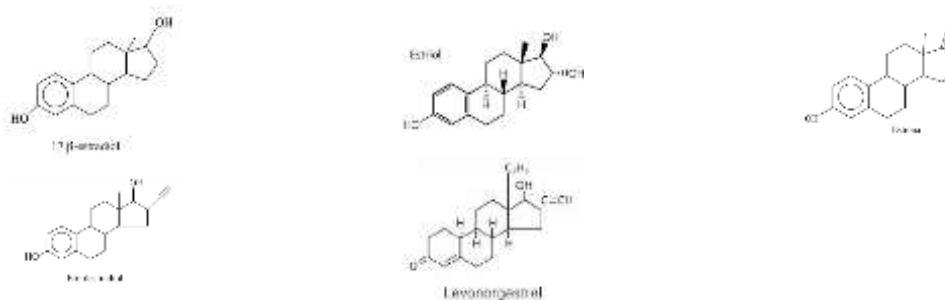


Figura 1: Estrutura química dos principais estrógenos.

Normalmente, os estrogênios atingem os cursos hídricos por contaminação por efluentes domésticos contendo excretas. As mulheres excretam diariamente entre 10 e 100 mg de estrógenos enquanto que grávidas podem excretar até 30 mg de estrogênios por dia (Polloni-Silva *et al.*, 2017). Uma vez lançado nos corpos hídricos, os estrógenos podem ter diferentes comportamentos em virtude de suas propriedades físico-químicas, que irão reger a partição dos compostos entre as

matrizes água, sedimento e biota. Entretanto, quando excretados por mamíferos, esses estrógenos não se encontram em sua forma primária, mas sim em uma forma conjugada (de ácido glucorônico ou conjugados de sulfato) que os tornam de 10 a 50 vezes mais solúveis em água que os compostos originais.

O desenvolvimento de técnicas analíticas mais seletivas e sensíveis permitiu a identificação e quantificação desses compostos estrogênicos ativos em baixas concentrações em ambientes aquáticos, águas residuais, águas superficiais, subterrâneas e água potável (Tuc *et al.*, 2017). Diversos trabalhos têm sido dedicados a desenvolver métodos para determinação e quantificação desses hormônios e avaliação de sua atividade estrogênica em organismos aquáticos (Pereira *et al.*, 2015). Estratégias de preparo de amostras baseadas em extração em fase sólida (SPE), com pré-concentração, aliada às técnicas cromatográficas para identificação e quantificação dos compostos tem sido desenvolvida e implementada para o monitoramento desses compostos em diversas matrizes ambientais (Padhye & Lokesh, 2013).

Desse modo, o presente estudo teve como objetivo: avaliar as concentrações dos hormônios 17 β -estradiol (E2, de origem natural) e 17 β -etinilestradiol (EE2, sintético) em águas superficiais no braço Rio Grande da Represa Billings – SP e correlacionar essas concentrações desses hormônios com variáveis ambientais Temperatura da Água, pH, Condutividade Elétrica (CE) e Sólidos Totais Dissolvidos (TDS).

METODOLOGIA

Área de estudo

O Braço Rio Grande é um dos principais corpos hídricos formadores do reservatório Billings (Figura 2), e historicamente é nele que ocorre a captação para abastecimento humano. Devido às crises qualitativas ocorridas em 1981, o Braço Rio Grande foi isolado do restante da represa para preservar a qualidade das águas locais, entretanto ainda recebe grandes quantidades de esgoto não tratado ou tratado ineficientemente por residenciais e estabelecimentos comerciais localizados no entorno do reservatório. Ao longo do Braço Rio Grande estão localizadas a ETA Rio Grande, com vazão de captação de água para abastecimento de 5 m³ s⁻¹ (SABESP, 2015) e a ETE Parque Andreense (ETE-PA) ligada ao Serviço Municipal de Saneamento Ambiental de Santo André – SP.

No presente estudo, amostras de águas superficiais foram coletadas em quatro estações de amostragem (Figura 2): (S1) Referência, área menos impactada do Braço Rio Grande; (S2) Captação de água pela Companhia de Saneamento para abastecimento; (S3) Córrego Ribeirão Pires, que recebe esgoto bruto do município de Ribeirão Pires; (S4) Córrego Tubarão que recebe efluentes tratados no nível secundário da ETE-PA.

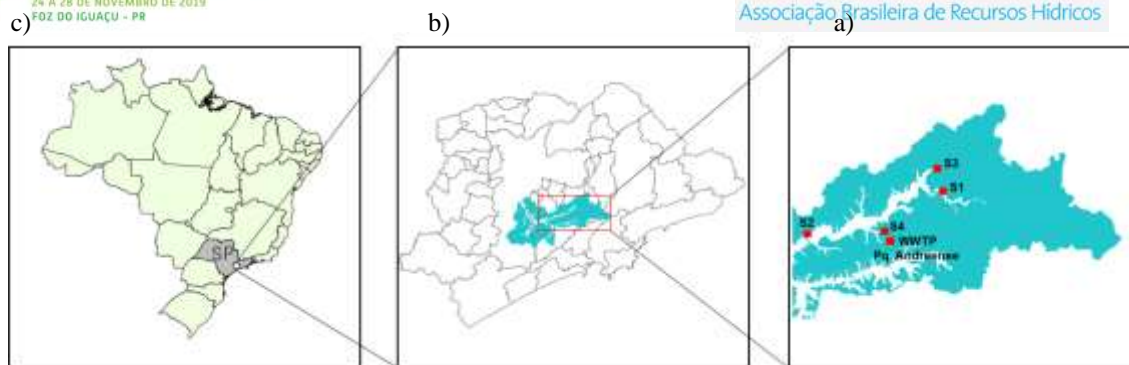


Figura 2. Localização da área de estudo: (a) Estado de São Paulo; (b) Região Metropolitana de São Paulo e Reservatório Billings; (c) Estação de amostragem no Braço Rio Grande. FONTE: Google Earth (2017)

Amostragem

Oito campanhas de amostragem foram realizadas entre junho de 2017 e fevereiro de 2018. A Tabela 1 apresenta as datas de amostragem e uma codificação utilizada para simplificar a apresentação dos resultados: amostragens no período seco (abril a agosto) identificadas com “S” e amostragens na estação chuvosa (setembro a março) identificadas com “C”. Amostras de água de sub-superfície foram coletadas em triplicata ($n = 3$) em garrafa Van Dorn e armazenadas em frascos de polietileno tereftalato (PET) com capacidade para 5 litros previamente lavados com 1 mol L^{-1} de HCl (10% v/v) e enxaguadas com água destilada e água deionizada. As amostras foram mantidas sob refrigeração até a chegada ao laboratório de Análises Ambientais da UFABC.

Tabela 1. Datas das campanhas de amostragem e codificação usada ao longo do trabalho.

Seco		Chuvoso	
Data	Código	Data	Código
13.06.2017	SI	27.10.2017	CI
19.06.2017	SII	10.11.2017	CII
28.07.2017	SIII	07.12.2017	CIII
23.08.2017	SIV	22.02.2018	CIV

Análise de hormônios estrogênicos

Os materiais utilizados nas análises foram lavados com água da torneira e detergente Extran a 8% (v/v) e depois enxaguados com água deionizada. Para a pré-concentração dos hormônios estrogênicos 17β -estradiol e 17α -etinilestradiol em amostras de água, utilizou-se o método de extração em fase sólida (SPE), conforme descrito por Machado et al. (2014). As amostras coletadas foram filtradas em uma membrana de acetato de celulose (porosidade de $0,45 \mu\text{m}$) para retenção do material particulado. O pH das amostras foi então ajustado para 3,0, para assim obter uma melhor afinidade dos compostos alvo para o cartucho de SPE (C_{18} , 500 mg, 6 mL, Strata Phenomenex). O condicionamento dos cartuchos foi realizado com solventes de polaridade crescente (metanol e água ultrapura) a vazão de 5 mL min^{-1} .

Depois de condicionar os cartuchos de SPE, uma amostra de água filtrada de 1 litro foi passada para o cartucho para extração dos compostos alvo. Os cartuchos foram armazenados em um refrigerador até a análise cromatográfica. Os compostos retidos foram eluídos com volumes de acetonitrila. O solvente foi evaporado numa atmosfera inerte e o conteúdo residual suspenso em 1 mL de metanol (fator pré-concentração 1000X). Testes de recuperação ($n = 6$) foram conduzidos adicionando concentrações de 500 ng L^{-1} dos compostos em amostras de água da estação de coleta S1 para avaliar o efeito da matriz na eficiência da extração.

As concentrações de hormônios estrogênicos foram determinadas em um cromatógrafo líquido (Agilent 1200 Infinity, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo (LC-MS; Agilent 6130, EUA), disponível em modo multiusuário na Universidade Federal do ABC.

A determinação simultânea de 17α -etinilestradiol e 17β -estradiol por LC-MS foi realizada em coluna C_{18} (Zorbax Eclipse Plus, 100 mm x 4,6 mm x 3,5 μm , Agilent, EUA) a 40°C com fluxo de fase móvel constante de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. A fase móvel consistiu de acetonitrila e água acidificada com ácido fosfórico ($\text{pH} = 3$) na proporção de 1: 1 sob eluição isocrática. O volume de injeção foi de 20 μL e o comprimento de onda de detecção a $\lambda = 281 \text{ nm}$. Após a separação cromatográfica, a fase móvel contendo os analitos foi submetida ao estágio de ionização por *electrospray* no espectrômetro de massa. A fonte de ionização foi operada no modo positivo a uma tensão de 4000 V. O gás nitrogênio, produzido por vaporização de N_2 líquido, foi usado como gás de arraste e seco a uma vazão de 10 L min^{-1} e uma temperatura de 350°C . A pressão de N_2 no nebulizador foi estabelecida em 35 psi. Hormônios estrogênicos foram identificados e quantificados pelo método de calibração externa em uma faixa de concentração de 100 a $5000 \mu\text{g L}^{-1}$.

Os limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) foram determinados pela injeção de concentrações progressivamente baixas das soluções padrão de E2 e EE2 sob a condição cromatográfica descrita acima. LOD e LOQ foram calculados diretamente do gráfico de calibração.

Variáveis Ambientais

A temperatura da água, pH, Condutividade Elétrica (CE) e Sólidos Totais Dissolvidos (TDS) foram avaliados em campo usando uma sonda multiparamétrica calibrada (Horiba U50, Japão).

Análise Estatística

Análises de correlação, estatísticas ANOVA e Testes de Tukey foram feitas no software Microcal Origin 8.1. Para verificar a relação entre os parâmetros limnológicos (CE, pH e TDS) e concentrações de hormônios, gráficos de correlação simples foram plotados usando o coeficiente de correlação de Pearson-r, assumindo valores entre -1 e +1. Para análise ANOVA, foi considerado um valor de $p < 0,05$ para uma diferença estatística significativa entre os grupos avaliados. Os resultados

do teste de Tukey foram mostrados nos gráficos usando letras diferentes para grupos estatisticamente diferentes (p. ex: a, b, c).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Extração SPE e validação de análises LC-MS

As curvas de calibração lineares LC-MS com coeficientes de correlação Pearson-r foram obtidas para ambos os compostos para o intervalo de concentração. A equação de linearidade de regressão foi $y = 34,4x + 1,24$ com coeficiente de regressão Pearson-r = 0,999 para E2 e $y = 11,8x + 0,48$ com coeficiente de regressão de Pearson-r = 0,997 para EE2. Para ambos os compostos, LOD e LOQ foram $30 \mu\text{g L}^{-1}$ e $100 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Considerando o fator de pré-concentração de 1000 vezes, o método LC-MS permite a quantificação de 100 ng L^{-1} de cada composto nas amostras de água analisadas.

A recuperação média nos cartuchos de SPE para E2 foi $(89,3 \pm 4,1)\%$ e para EE2 $(75,7 \pm 4,5)\%$. Para análise de E2, os critérios de aceitação de EPA variam de 55 a 108% com Desvios Padrão Relativos (DPR) de 30% e de 55 a 110% com DPR de 30% para EE2. Os resultados indicam pouco efeito da matriz amostral no procedimento de extração e a não necessidade de mais etapas de limpeza de amostras que tornem o monitoramento mais trabalhoso, caro e demorado, além de ser uma fonte extra de possível contaminação da amostra.

Análise de hormônios estrogênicos

A Tabela 2 mostra os resultados de E2 e EE2 na água em oito campanhas de amostragem. S1 (Referência) apresentou concentrações abaixo do LOQ (100 ng L^{-1}) em todas as campanhas de amostragem para ambos os compostos. Reflete o status de preservação desta região, que é menos impactada por fontes antropogênicas.

Para S2, próximo à captação de água, apresentou níveis de E2 apenas em três campanhas ($860 - 900 \text{ ng L}^{-1}$) e EE2 em duas ($210 - 630 \text{ ng L}^{-1}$). Para S3, o córrego Ribeirão Pires, apresentou E2 em todas as campanhas ($110 - 1700 \text{ ng L}^{-1}$) e EE2 em seis ($210 - 1200 \text{ ng L}^{-1}$). Já em S4, córrego de Tubarão, apresentou E2 em cinco campanhas ($300 - 1720 \text{ ng L}^{-1}$) e EE2 em sete ($120 - 650 \text{ ng L}^{-1}$).

Essas concentrações são tipicamente maiores que as relatadas na literatura. Este fato é possivelmente devido à entrada de águas residuais brutas ou ineficientemente tratadas no sistema, uma vez que o hormônio E2 é naturalmente excretado pelas mulheres.

Tabela 2: Concentração de hormônios estrogênicos (ng L^{-1}) e seu número de ocorrências em águas superficiais na Região Metropolitana de São Paulo.

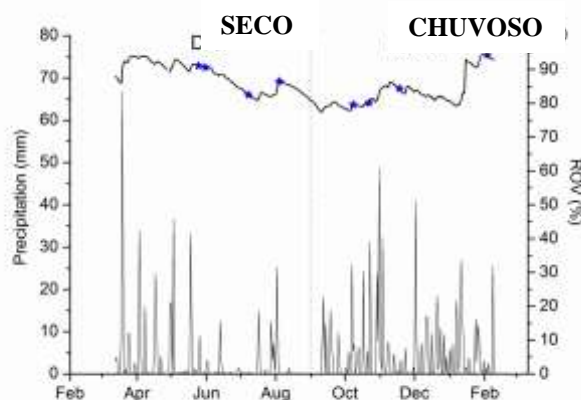
Período Seco	Período Chuvoso
--------------	-----------------

Estação de Amostragem	Campanha de Amostragem	E2 (ng L ⁻¹)	EE2 (ng L ⁻¹)	Campanha de Amostragem	E2 (ng L ⁻¹)	EE2 (ng L ⁻¹)
S1	SI	<LOQ	<LOQ	CI	<LOQ	<LOQ
S2		860	630		<LOQ	<LOQ
S3		1700	1200		180	300
S4		<LOQ	200		<LOQ	250
S1	SII	<LOQ	<LOQ	CII	<LOQ	<LOQ
S2		<LOQ	<LOQ		890	<LOQ
S3		160	460		250	<LOQ
S4		710	340		630	320
S1	SIII	<LOQ	<LOQ	CIII	<LOQ	<LOQ
S2		<LOQ	<LOQ		900	210
S3		110	<LOQ		110	210
S4		300	120		1720	250
S1	SIV	<LOQ	<LOQ	CIV	<LOQ	<LOQ
S2		<LOQ	<LOQ		<LOQ	<LOQ
S3		360	450		450	240
S4		<LOQ	650		870	<LOQ
S1	Número de ocorrências	0	0	Número de ocorrências	0	0
S2		1	1		2	1
S3		4	3		4	3
S4		2	4		3	3

Variáveis Ambientais

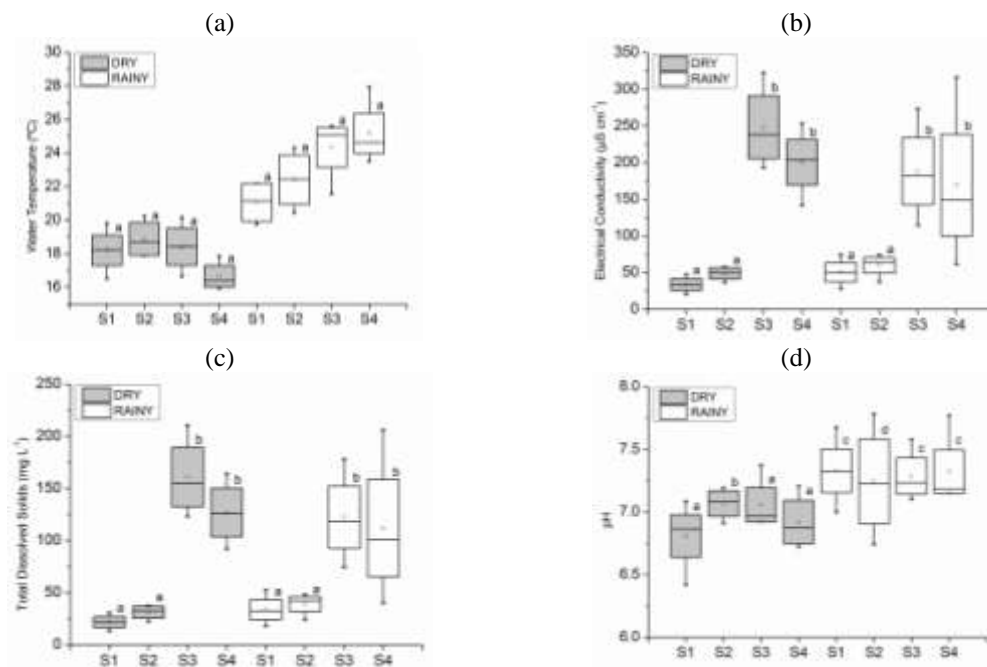
Dados de precipitação (mm) na área de estudo e Volume Operacional do Reservatório Rio Grande (ROV, em %) das campanhas de amostragem são apresentados na Figura 3. Dados de precipitação seguiram o perfil esperado para a região: estação seca entre abril e agosto e estação chuvosa entre setembro e março. No entanto, o ROV (%) apresentou um padrão diferente, com valores mais altos nas datas de amostragem DI e DII, semelhante à amostragem chuvosa RIV.

Figura 3. Precipitação (mm) na área estudada e Volume Operacional no Reservatório Rio Grande (ROV,%) nas estações secas e chuvosas.



A Figura 4 mostra os gráficos do tipo boxplot, com os resultados de ANOVA e teste de Tukey para as variáveis limnológicas. A temperatura da água foi maior na estação chuvosa do que na seca, mas nenhuma diferença estatística foi observada espacialmente. Considerando a variação sazonal, não foi observada diferença estatística para CE e TDS, que pode ter sido influenciada pela variabilidade do ROV. No entanto, ANOVA apresentou diferenças significativas entre as estações localizadas no reservatório (S1 e S2) e os córregos (S3 e S4) para CE e TDS, evidenciando a contribuição dos córregos para entrada de poluentes no reservatório e seus efeitos sendo minimizados pela diluição.

Figure 4. Gráficos Boxplot a) Temperatura da água (°C); (b) Condutividade Elétrica (CE, $\mu\text{S cm}^{-1}$), (c) Sólidos totais dissolvidos (TDS, mg L^{-1}); (d) pH nos períodos seco e chuvoso, totalizando oito campanhas de amostragem.



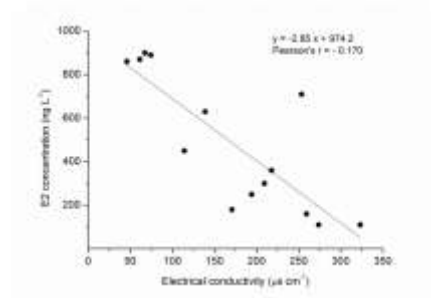
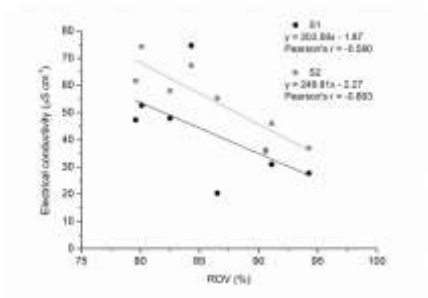
O pH apresentou diferenças sazonais, sendo maior na estação chuvosa. Os resultados de pH do S2 foram estatisticamente diferentes das outras estações. Esta estação está próxima da captação de água para abastecimento humano e, frequentemente, ocorre a proliferação de algas nessa região. Assim, a Companhia de Saneamento aplica sulfato de cobre e peróxido de hidrogênio para controle de algas (SABESP, 2015) na área S2, o que poderia contribuir para o aumento do pH.

A Figura 5 mostra a correlação entre as concentrações de hormônios estrogênicos, ROV e CE.

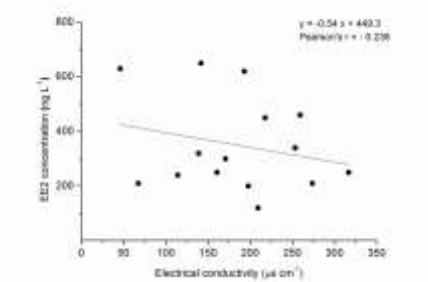
Figura 5. Correlações de Pearson do ROV (%), concentrações de hormônios estrogênicos (E2 e EE2, ng L^{-1}), e condutividade elétrica (CE, $\mu\text{S cm}^{-1}$).

(a)

(b)



©



CONCLUSÃO

No presente estudo foi possível quantificar níveis de E2 e EE2 em águas superficiais do reservatório Billings, Braço Rio Grande, e dois córregos adjacentes. Não foi possível estabelecer nenhuma tendência sazonal dos níveis de estrógenos devido a variabilidade do volume operacional do reservatório.

As concentrações de E2 variaram de <LOQ a 1.720 ng L^{-1} a EE2 a partir de <LOQ e 1.200 ng L^{-1} . Número de ocorrências de hormônios estrogênicos: S1 nunca detectado, S2 apresentou E2 em três campanhas e EE2 em duas campanhas. Em S3, todas as campanhas de amostragem apresentaram níveis de E2 e em 6 deles o EE2 foi detectado, assim como o S4, o E2 foi encontrado em 5 campanhas de amostragem e o EE2 em 7 delas.

Logo, o resultado encontrado na pesquisa evidencia a importância da avaliação de córregos em estudos de monitoramento da qualidade da água de reservatórios urbanos e a influência deles na contaminação do reservatório.

AGRADECIMENTOS – Os autores agradecem ao British Council, ao Newton Fund e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo financiamento de projetos (processo número 004/16), bem como à FAPESP pela Bolsa de Iniciação Científica concedida a M.Y.K. (Processo 2017/082341). Agradecemos também às instalações da Central Experimental Multiusuário da UFABC e aos estagiários por suporte de campo e laboratorial.

REFERÊNCIAS

MACHADO, K.S.; CARDOSO, F.D.; AZEVEDO, J.C.R. (2014). “*Occurrence of female sexual hormones in the Iguazu river basin, Curitiba, Parana State, Brazil*”. *Acta Scientiarum Technology* 36, pp. 421-427.

PADHYE, L.P.; LOKESH, U. (2013). “*Fate of Environmental Pollutants*”. *Water Environment Research* 85, pp. 1734-1785.

PEREIRA, L.C.; DE SOUZA, A.O.; BERNARDES, M.F.F.; PAZIN, M.; TASSO, M.J.; PEREIRA, P.H.; DORTA, D.J. (2015). “*A perspective on the potential risks of emerging contaminants to human and environmental health*”. *Environmental Science and Pollution Research* 22, pp. 13800-13823.

POLLONI-SILVA, J.; VALDEHITA, A.; FRACACIO, R.; NAVAS, J.M. (2017). “*Remediation efficiency of three treatments on water polluted with endocrine disruptors: Assessment by means of in vitro techniques*”. *Chemosphere* 173, pp. 267-274.

QUADRA, G.R.; DE SOUZA, H.O.; COSTA, R.D.; FERNANDEZ, M.A.D. (2017). “*Do pharmaceuticals reach and affect the aquatic ecosystems in Brazil? A critical review of current studies in a developing country*”. *Environmental Science and Pollution Research* 24, pp. 1200-1218.

RANI, C.N.; KARTHIKEYAN, S. (2016). “*Endocrine disrupting compounds in water and wastewater and their treatment options - a review*”. *International Journal of Environmental Technology and Management* 19, pp. 392-431.

SABESP (2015) Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (Sabesp) <http://site.sabesp.com.br/site/imprensa/noticias-etilhe.aspx?secaoId=65&id=6449>. Acessado em 12.05.2019.

TUC, D.Q.; ELODIE, M.G.; PIERRE, L.; FABRICE, A.; MARIE-JEANNE, T.; MARTINE, B.; JOELLE, E.; MARC, C. (2017). “*Fate of antibiotics from hospital and domestic sources in a sewage network*”. *Science of the Total Environment* 575, pp. 758-766.