

II-088 - OCORRÊNCIA DO MICROPOLUENTE COLESTEROL EM ÁGUAS SUPERFICIAIS

Germana de Paiva Pessoa

Química Industrial pela Universidade Federal do Ceará (UFC)

Mestre e Doutora em Saneamento Ambiental pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Analista Químico da Companhia de Água e Esgoto do Estado do Ceará (CAGECE).

Carla Bastos Vidal⁽¹⁾

Tecnóloga em Processos Químicos pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

Mestre e Doutora em Saneamento Ambiental pela Universidade Federal do Ceará (UFC)

Neyliane Costa Souza

Química Industrial pela Universidade Federal do Ceará (UFC)

Mestre e Doutora em Saneamento Ambiental pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Professora Adjunta da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

André Bezerra dos Santos

Engenheiro Civil pela Universidade Federal do Ceará (UFC)

Mestre em Saneamento Ambiental pela Universidade Federal do Ceará (UFC). Doutor em Saneamento Ambiental pela Wageningen University, Holanda. Professor Adjunto da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Ronaldo Ferreira do Nascimento

Químico pela Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Doutor em química pela Universidade de São Paulo (USP). Professor Titular da Universidade Federal do Ceará (UFC)

Endereço⁽¹⁾: Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Analítica e Físico-Química. Campus do Pici, Bloco 940 Pici, CEP 604519-70 - Fortaleza, CE - Brasil - 9518 - e-mail: carlab.vidal@gmail.com

RESUMO

O micropoluentes colesterol (CHOL) tem sido alvo de investigação devido a sua importância como traçador orgânico antropogênico, sendo considerado um composto tóxico e persistente ou bioacumulativo aos organismos aquáticos e/ou seres humanos. O objetivo do trabalho foi desenvolver uma metodologia analítica para determinar a ocorrência do micropoluentes colesterol em águas superficiais. A metodologia analítica utilizada para concentração do CHOL foi por extração em fase sólida e sua posterior detecção e quantificação foi realizada através da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS) com a etapa prévia de derivatização. Foram realizadas coletas nos rios de maior representatividade no Estado do Ceará, sendo detectado em apenas um ponto de coleta. O colesterol foi quantificado na concentração de 1,175 ppb, indicando a sua provável sedimentação.

PALAVRAS-CHAVE: Micropoluentes, Colesterol, Cromatografia Gasosa.

INTRODUÇÃO

O colesterol (CHOL) tem sido alvo de investigação devido a sua importância como traçador orgânico antropogênico, sendo considerada uma alternativa aos indicadores biológicos convencionais (ARAÚJO et al., 2011; MARTINS et al., 2008). A análise microbiológica convencional requer tempo hábil, devido à impossibilidade de longo período de armazenamento de amostras (ISOBE et al., 2002), tornando o desenvolvimento analítico de esteroides fecais uma interessante ferramenta para o monitoramento de contaminação por seres humanos. Quando comparados às bactérias, os esteroides são mais resistentes às alterações ambientais, como temperatura, salinidade e radiação solar (CHOU; LIU, 2004; DEVANE et al. 2006). Diversos pesquisadores vêm realizando a detecção de CHOL em matrizes ambientais complexas, sendo um dos micropoluentes encontrado com maior frequência e em maior concentração (BECK; RADKE, 2006;

FOCAZIO et al., 2008; BICCHI et al., 2009; HUANG et al., 2010; MOLINER-MARTINEZ et al., 2010; SAHAR et al., 2011; HOPE et al., 2012).

O colesterol pode ter sua origem no corpo humano tanto natural como antrópica, sendo precursor das três principais classes de hormônios, dentre eles os hormônios reprodutivos, como a estrona e o estradiol. O colesterol é primeiro convertido em progesterona, que é então transformada em andrógenos (androstenediona e testosterona). Estes são então convertidos em estrógenos, dos quais o 17β - estradiol é o mais potente (ECKERT et al., 2008).

O hormônio natural, colesterol, foi incluído na lista de poluentes prioritários do estado de Oregon (USA), sendo considerado um composto tóxico e persistente ou bioacumulativo aos organismos aquáticos e/ou seres humanos (HOPE et al., 2010). A ODEQ - Oregon Department of Environmental Quality (Departamento de Qualidade Ambiental de Oregon) estabeleceu o nível máximo de contaminação (trigger levels) em efluentes de sistema de tratamento de esgoto sanitário para poluentes orgânicos persistentes (POPs), sendo a concentração máxima permitida para o colesterol de 3 ng.L^{-1} (HOPE et al., 2012). Adicionalmente, o micropoluentes apresenta um potencial de alterar a densidade populacional e estrutura de comunidades aquáticas. No entanto, a literatura científica é muito limitada quanto as pesquisas voltadas para a toxicidade do colesterol em organismos aquáticos (HASSETT, 2004).

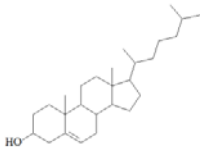
Devido à escassez de dados referentes à detecção em águas superficiais, a presente pesquisa buscou desenvolver uma metodologia para determinar a ocorrência do micropoluentes colesterol em águas superficiais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Características Físico-Químicas do Colesterol

As características físico-químicas do CHOL são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características físico-químicas do colesterol

Parâmetro	Colesterol (CHOL)
Fórmula Química	$\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$
Peso molecular (g/mol)	386,66
CAS-Number	57-88-5
Solubilidade em água a 20°C (mg/L)	0,095 ¹
Log K_{ow}	8,74 ¹
Pka	NR ¹
Estrutura Química	

NR: Não relatado

¹SAHAR et al. (2011)

Descrição dos locais de coleta

Para a detecção do colesterol em águas superficiais foram selecionados dois pontos dos rios Ceará e Cocó (rios de maior representatividade no estado do Ceará), sendo as coletas realizadas durante o mês de dezembro no ano de 2010. As coordenadas UTM (Universal Transversa de Mercator) dos pontos de coletas são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Coordenadas UTM para os pontos de amostragem dos rios Ceará e Cocó

Identificação da amostra	Coordenada – UTM
P1CE	05410/9586467
P2CE	0545721/9591191
P1CC	0562412/9583095
P2CC	0540377/9560264

Para as análises cromatográficas foram adicionados antes da coleta 10 mL de formaldeído por litro de amostra a fim de impedir a biodegradação dos analitos de interesse (PESSOA et al. 2014) e 0,1 mL de solução a 3% de metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) às amostras coletadas. Este último reagente foi utilizado como agente neutralizador de cloro livre, além de prevenir a degradação do colesterol. A remoção de cloro torna-se necessária para evitar que o mesmo cause danos à coluna cromatográfica, uma vez que é um agente fortemente oxidante.

Preparo da amostra

Inicialmente foi realizada a etapa de filtração da amostra em sistema a vácuo (VP-24, Advantec MFS, Dublin, CA, USA) utilizando filtro de fibra de vidro com diâmetro de 0,45 μm (Millipore, Bedford, MA, USA). Após a etapa de filtração o pH da amostra foi ajustado para 3,0 adicionando 50% (v/v) de HCl.

O analito foi concentrado através da extração em fase sólida (SPE) utilizando vacuum manifold (Speed Mate 12-port, Applied Separations, Allentown, PA, USA) e cartucho Oasis® HLB (200 mg/6 mL, Waters, Milford, MA, USA). Os cartuchos foram condicionados com 10 mL de metanol (Grau HPLC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) seguido por 10 mL de água Milli-Q (Gradient, Millipore, Bedford, MA, USA). O volume de amostra foi de 1000 mL para águas superficiais sendo concentrada a um fluxo de 2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (PESSOA et al., 2014)

Os cartuchos foram mantidos sob vácuo para eliminação de água e, posteriormente, eluídos com 4 mL de metanol. Os extratos eram coletados em vials e levados à secar em estufa a uma temperatura de 45°C. O resíduo foi derivatizado através da adição de 50 μL BSTFA (Supelco, Bellefonte, PA, USA) em uma reação de 30 min a 60°C em banho-maria. O extrato era resfriado, re-suspendido com 500 μL de metanol e analisado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/MS).

Análise cromatográfica utilizando CG/MS

A determinação do micropoluentes colesterol foi realizada por metodologia adaptada de Pessoa et al., 2014, na qual utilizou-se de cromatógrafo gasoso (CG) conectado ao espectrômetro de massas (MS), com processador de dados X-Calibur 2.0.7 (FOCUS DSQII-230ST, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). O equipamento CG era equipado com coluna capilar SLB™-5MS (5% diphenyl/95% methyl siloxane) com dimensões de 30m×0,25mm I.D.×0,25 μm (Supelco), utilizando Hélio (pureza > 99%) como gás de arraste a um fluxo de 1,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

A temperatura do injetor era mantida a 250°C e o programa de temperatura da coluna foi de: 50°C até 150°C (taxa de 40°C min^{-1}); rampa até 270°C a 40°C min^{-1} , permanecendo por 1 min; rampa até 280°C a 10°C min^{-1} , mantendo por 5 min, rampa até 290°C a 10°C min^{-1} , mantida por 1 min. O modo de injeção foi splitless, utilizando um volume de injeção de 1 μL .

O espectrômetro de massas foi utilizado nas seguintes condições: temperatura da fonte de íons: 290°C; temperatura da linha de transferência: 290°C; modo de ionização: impacto de elétrons positivo, energia: +70 eV; modo de aquisição dos dados: scan full com faixa de relação massa carga de 50-650 m/z.

As análises quantitativas foram realizadas empregando-se o método do padrão externo. A concentração da solução estoque padrão utilizada era de 1000 ng.mL⁻¹, preparada em metanol e armazenada em frascos âmbar a 4°C. A partir da solução derivatizada foram realizadas várias diluições sucessivas para a obtenção da curva de calibração. As soluções foram injetadas em triplicata, sendo a média utilizada para obtenção da curva analítica através da regressão linear (área versus concentração).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3 está apresentado o resultado dos parâmetros analíticos necessários para a validação do método de detecção e quantificação do colesterol.

Tabela 3. Parâmetros de validação do método analítico instrumental para o colesterol

Tabela 3. Parâmetros de validação do método analítico instrumental para o colesterol

Precisão ¹ DPR _{ÁREA} (%)	R	N	Faixa Linear (µg.L ⁻¹)	LD (µg.L ⁻¹)	LQ (µg.L ⁻¹)	Recuperação ² (%)
12,87	0,9900	9	10,0 – 1000	1,065	3,553	54±0,76

DPR_{ÁREA}: desvio padrão relativo da área do pico; R: coeficiente de correlação linear; N: número de pontos utilizados para a curva de calibração; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação.

¹ Injeção de 50 µg L⁻¹ (50ppb) em dez replicatas

² Concentração de 500 ng L⁻¹, matriz: esgoto sanitário

A partir da Tabela 3 pode ser verificado que a repetibilidade do método foi de 12,87% para a área do pico (análise quantitativa), demonstrando uma precisão satisfatória, haja vista que todos os analito apresentou DPR% dentro da faixa predita pela AOAC (1998), que determina que para a faixa de concentração entre 100 - 10 µg.L⁻¹ os valores de DPR% devem estar na faixa de 15-21%, portanto como a concentração do analito analisada foi de 50 µg.L⁻¹ os valores obtidos encontram-se dentro da faixa determinada.

Segundo a Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1998), o valor aceitável de recuperação dependerá do percentual de analito que foi adicionado em relação à amostra como um todo e relação m/v de analito. Para a faixa de concentração adicionada à amostra em estudo, 500 ng.L⁻¹, o percentual m/v será de 10-9 %, o que resulta em uma faixa de recuperação aceitável de 40 a 120%. Assim, observa-se que a recuperação do colesterol de 54% estava dentro da faixa recomendada, sendo, portanto, considerada satisfatória. O método analítico desenvolvido também revelou a capacidade de determinação de baixas concentrações do micropoluinte colesterol, conforme limites de detecção e quantificação apresentados na Tabela 3.

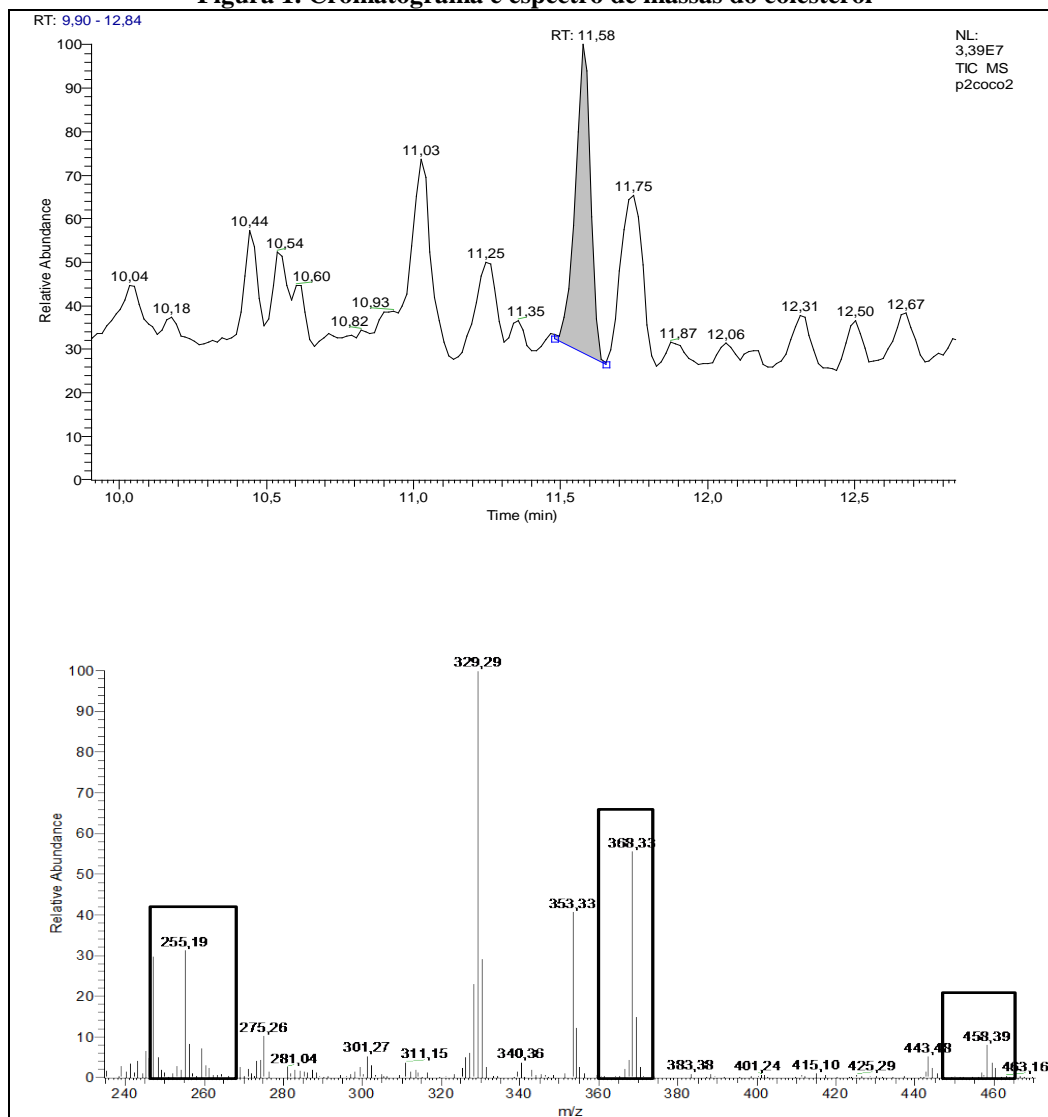
Na análise de águas superficiais o composto foi detectado apenas em um ponto de coleta, provavelmente devido ao fator de diluição ser elevado em corpos receptores, ou ainda, devido à sedimentação, uma vez que a solubilidade do CHOL em água é baixa (0,095 mg.L⁻¹). Segundo dados publicados pela USEPA (2009) o esteóide colesterol pode ainda encontrar-se adsorvido à biomassa de estações de tratamento de esgotos na concentração média de 1129 µg.kg⁻¹ dw (dry weight – massa seca).

Na Figura 1 é apresentado o cromatograma obtido durante a análise do ponto 2 de coleta do rio Cocó, destacando o composto colesterol. Além do cromatograma, pode ser visualizado o espectro de massas obtido e em destaque as razões massa-carga (m/z) para a identificação do composto.

A concentração detectada, de 1,175 µg.L⁻¹ (valor calculado com o fator de correção da recuperação – ou seja, foi quantificado na curva de calibração), corrobora com o resultado reportado por Focazio et al. (2008), os quais detectaram a concentração de 2,000 µg.L⁻¹ do esteróide natural em águas superficiais nos EUA, sendo

esse detectado com maior frequência ao serem analisados 100 compostos orgânicos. Em uma pesquisa realizada no sul do Brasil, Froehner et al. (2009) reportaram concentrações de até $25,9 \mu\text{g.g}^{-1}$ dw (dry weight – massa seca) em sedimentos de rio. Outro estudo também realizado no Brasil reportou a concentração de $7,8 \mu\text{g.g}^{-1}$ dw em sedimentos na Baía de Guanabara, no estado do Rio de Janeiro (CARREIRA et al., 2004).

Figura 1. Cromatograma e espectro de massas do colesterol



O resultado obtido indica que as águas superficiais analisadas provavelmente são utilizadas como corpos receptores de esgoto in natura. Tal fato torna o cenário apresentado preocupante devido ao uso das águas por parte da população, como foi relatado por moradores próximos aos pontos de amostragem. Ressalta-se que a exposição da população a esse composto pode trazer malefícios à saúde humana na exposição em longo prazo.

CONCLUSÃO

A metodologia analítica utilizada para concentração do CHOL por extração em fase sólida e sua posterior detecção e quantificação realizada através da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS) com a etapa prévia de derivatização mostrou-se adequada e eficiente para determinação e quantificação do composto em águas superficiais, sendo o valor máximo obtido nas águas superficiais foi de $1,175 \mu\text{g.L}^{-1}$.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Peer-Verified Methods Program: Manual on Policies and Procedures, Arlington, VA. 1998.
2. ARAUJO, M.P.; COSTA, T.L.F.; CARREIRA, R.S. Esteróis como indicadores do acúmulo de esgotos domésticos em sedimentos de um sistema estuarino-lagunar tropical (Mundaú-Manguaba, AL). *Química Nova*, v. 34, n. 1, 2011, p.64-70.
3. BECK, M.; RADKE, M. Determination of sterols, estrogens and inorganic ions in waste water and size-segregated aerosol particles emitted from waste water treatment. *Chemosphere*, v. 64, 2006, p.1134-40.
4. BICCHI, C.; SCHILIRÓ, T.; PIGNATA, C.; FEA, E.; CORDERO, C.; CANALE, F.; GILLI, G. Analysis of environmental endocrine disrupting chemicals using the E-screen method and stir bar sorptive extraction in wastewater treatment plant effluents. *Science of Total Environment*, v.407, 2009, p. 1842-51.
5. CARREIRA, R. S.; WAGENER, A. L. R.; READMAN, J. W. Sterols as markers of sewage contamination in a tropical urban estuary (Guanabara Bay, Brazil): space-time variations. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, v. 60, 2004, p.587-98.
7. CHOU, C. C.; LIU, Y. P. Determination of fecal sterols in the sediments of different wastewater outputs by GC-MS. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v.84, 2004, p.379-88.
8. DEVANE, M., SAUNDERS, D., & GILPIN, B. Faecal sterols and fluorescent whiteners as indicators of the source of faecal contamination. *Chemistry in New Zealand*, v.October, 2006, p.74-7.
9. ECKERT, R.; RANDALL, D. J.; BURGGREN, W. W.; FRENCH, K. *Fisiologia animal: mecanismos e adaptações*. Rio de Janeiro, 729 p. ISBN 978-85-277-0594-3, 4ª Ed, 2008.
10. FOCAZIO, M.J.; KOLPIN, D.W.; BARNES, K.K.; FURLONG, E.T.; MEYER, M.T.; ZAUGG, S.D.; BARBER, L.B.; THURMAN, M.E. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States – II) Untreated drinking water sources. *Science of the Total Environment*, v. 402, 2008, p. 201-16.
11. FROEHNER, S.; MARTIN, R. F.; ERRERA, M. R. Assessment of fecal sterols in Barigui River sediments in Curitiba, Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, v.157, 2009, p. 591-600.
12. HASSETT, R.P. Supplementation of a diatom diet with cholesterol can enhance copepod egg-production rates. *Limnology Oceanography*, v. 49, n. 2, 2004, p.488-94.
13. HOPE, B.K.; STONE, D.; FUJI, T.; GENSEMER, R.W.; JENKINS, J. Meeting the challenge of identifying persistent pollutants at the state level. *Integrated Environmental Assessment and Management*, v. 6, n.4, 2010, p.735-748.
14. HOPE, B.K.; PILLSBURY, L.; BOLING, B. A state-wide survey in Oregon (USA) of trace metals and organic chemicals in municipal effluent. *Science of the Total Environment*, v. 417-418, 2012, p.263-72.
15. HUANG, M-H.; LI, Y-M.; GU, G-W. Chemical composition of organic matters in domestic wastewater. *Desalination*, v. 262, 2010, p. 36-42.
16. ISOBE, K.O.; TARAO, M.; ZAKARIA, M.P.; CHIEM, N.H.; MINH, L.Y.; TAKADA, H. Quantitative Application of Fecal Sterols Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry To Investigate Fecal Pollution in Tropical Waters: Western Malaysia and Mekong Delta, Vietnam. *Environmental Science & Technology*, v. 36, 2002, p. 4497-4507.
17. MARTINS, C.C.; GOMES, F.B.A.; FERREIRA, J.A.; MONTONE, R.C. Marcadores orgânicos de contaminação por esgotos sanitários em sedimentos superficiais da Baía de Santos, São Paulo. *Química Nova*, v. 31, n. 5, 2008, p.1008-14.
18. MOLINER-MARTINEZ, Y.; HERRÁEZ-HERNANDEZ, R.; MOLINS-LEGUA, C.; CAMPINS-FALCÓ, P. Improving analysis of apolar organic compounds by the use of a capillary titania-based column: Application to the direct determination of faecal sterols cholesterol and coprostanol in wastewater samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, 2010, p.4682-87.
19. NIVEN, S.J.; SNAPE, J.; HETHERIDGE, M.; EVANS, M.; MCEVOY, J.; ROWLANDA, S.J. Investigations of cholesterol transformation during sewage treatment: relevance to estrogen formation pathways? *The Science of the Total Environment*, v. 279, 2001, p.75-86.
20. PESSOA, G.P.; SOUZA, N.C.; VIDAL, C.B.; ALVES, J.A.C.; FIRMINO, P.I.M.; SANTOS, A.B. dos; NASCIMENTO, R.F. Occurrence and removal of estrogens in Brazilian wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, v. 490, 2014, p. 288-295.
21. SAHAR, E.; DAVID, I.; GELMAN, Y.; CHIKUREL, H.; AHARONI, A.; MESSALEM, R.; BRENNER, A. The use of RO to remove emerging pollutants following CAS/UF or MBR treatment of municipal wastewater. *Desalination*, v. 273, 2011, p.142-47.



22. USEPA, Targeted National Sewage Sludge Survey Statistical Analysis Report. United States Environmental Protection Agency Office of Water. Report nº EPA-822-R-08-018. Washington, DC, 2009.