



## I-244 - OCORRÊNCIA DE ESTRADIOL, ETINILESTRADIOL E NONILFENOL EM MANANCIAIS DA REGIÃO METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE

### **Davi Silva Moreira**

Químico Industrial (UFOP), Mestre em Engenharia Ambiental pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto (PPGEA - UFOP)

### **Sérgio Francisco de Aquino<sup>(1)</sup>**

Professor Adjunto do Departamento de Química da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

### **Robson José de Cássia Franco Afonso**

Professor Adjunto do Departamento de Química da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

### **Eliane Prado Cunha Costa dos Santos**

Engenheira Civil, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio-Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

### **Valter Lúcio de Pádua**

Professor Adjunto do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Rua Dois, 64 apto 301, Bairro Lagoa, Ouro Preto - MG – CEP:35.400-000 – Brasil - Tel: +55 (31) 3559-1837 - Fax +55 (31) 3559-1636 - e-mail: [sergio@iceb.ufop.br](mailto:sergio@iceb.ufop.br)

### **RESUMO**

Alguns compostos orgânicos classificados como Perturbadores Endócrinos (PE) são encontrados em águas superficiais e têm atraído a atenção da comunidade científica devido à alteração que eles causam no sistema endócrino da fauna aquática e ao potencial risco à saúde humana. Nessa classe de compostos, destacam-se os hormônios (17 $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -etinilestradiol) e subprodutos da degradação de surfactantes não-iônicos (nonilfenol). Dessa forma este trabalho teve como objetivo apresentar resultados do monitoramento, feito por meio de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS), de 17 $\beta$ -estradiol (E2), 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) e nonilfenol (NP) em amostras de água de três mananciais de abastecimento da Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH). Todos os três compostos monitorados foram encontrados em pelo menos uma amostra, sendo que o nonilfenol esteve presente em todas amostras de água bruta, na faixa de concentração de 44 a 1.918 ng/L. Os compostos 17 $\beta$ -estradiol e 17 $\alpha$ -etinilestradiol foram determinados em apenas 15% das amostras, na faixa de concentração de 2 a 54 ng/L. As análises das amostras coletadas nas ETAs após o filtro de areia mostraram que as etapas de pré-cloração, coagulação, sedimentação e filtração não foram capazes de remover, em sua totalidade, os PE monitorados.

**PALAVRAS-CHAVE:** perturbadores endócrinos; nonilfenol; estradióis; tratamento de água

### **INTRODUÇÃO**

Dentre os compostos orgânicos que podem contaminar mananciais de abastecimento, destacam-se os perturbadores endócrinos (PE), que são substâncias que podem provocar alterações no sistema endócrino de animais e de humanos. Os PE constituem uma classe de substâncias não definidas pela sua natureza química, mas pelo seu efeito biológico, que pode causar distúrbios no sistema endócrino mesmo em baixas concentrações. Muitos dos perturbadores endócrinos listados por algumas organizações como a USEPA e a Agência Ambiental do Reino Unido (UKEA), também estão classificados numa série de grupos de compostos orgânicos potencialmente tóxicos, tais como as substâncias tóxicas persistentes (STP), poluentes orgânicos persistentes (POP), poluentes emergentes, dentre outros. A União Européia elaborou um relatório contendo uma vasta lista de 118 compostos suspeitos de interferir no sistema endócrino, tanto de seres humanos como de diferentes espécies animais (Ghiselli e Jardim 2007; Damstra *et al.* 2002).

O interesse no estudo de compostos classificados como PE foi motivado a partir de observações sobre a ocorrência de anormalidades no sistema endócrino e reprodutivo de animais. Os sintomas observados têm sido atribuídos à presença de uma grande variedade de substâncias químicas, mesmo em concentrações-traço, principalmente em sistemas aquáticos naturais (Auger *et al.* 1995; Routledge *et al.* 1998). Uma evidência dos possíveis efeitos dos PE em seres humanos foi obtida a partir da experiência envolvendo mulheres grávidas que tomaram o estrogênio sintético dietilestilbestrol (DES), prescrito para evitar o aborto espontâneo e

promover o crescimento do feto, no período entre 1948 a 1971. Muitas das filhas dessas mulheres são hoje estéreis e, uma minoria, tem desenvolvido um tipo raro de câncer vaginal (Damstra *et al.*, 2002). Homens adultos que foram expostos a estradiol mostram maior incidência de anormalidades em seus órgãos sexuais, apresentam contagem média de espermatozóides diminuída e podem sofrer um risco maior de desenvolver câncer de testículos (Colucci *et al.* 2001; Guillette *et al.* 1996; Legler *et al.* 2002).

Dentre a vasta quantidade de PE que já foram avaliados pela comunidade científica, destacam-se o nonilfenol, o estradiol e o etinilestradiol, que são comumente avaliados em diversos trabalhos. O nonilfenol é um subproduto da degradação dos alquilfenóis polietoxilados (APEO), que são agentes surfactantes de amplo uso tanto em processos industriais como em produtos de uso doméstico como os detergentes (USEPA 2001). O  $17\beta$ -estradiol ou estradiol é um hormônio natural que nas mulheres é responsável pela síntese de estrogênio circulante, sendo por isso naturalmente e diariamente excretado na urina humana e, assim, descartado no esgoto doméstico (Bila e Dezotti 2007). Já o  $17\alpha$ -etinilestradiol ou etinilestradiol é um dos estrogênios sintéticos mais usados como contraceptivos orais, na reposição terapêutica na menopausa ou na prevenção do aborto (Bila e Dezotti 2007; Ghiselli e Jardim 2007).

De acordo com trabalhos nacionais e internacionais, compostos classificados como PE têm sido detectados em amostras de águas superficiais, principalmente em função da atividade antrópica (Alda e Barceló 2001). Pesquisas também têm mostrado que substâncias estrogênicas são encontradas em rios receptores de esgotos domésticos, tratados ou *in natura*. Potencialmente danosos à saúde, os PE têm se mostrado resistentes aos processos de tratamento convencionais utilizados nas estações de tratamento de esgotos (ETE) e de águas (ETA), sendo a intensidade de remoção dos PE dependente das condições operacionais impostas no sistema de tratamento. Em relação aos corpos d'água, um fator importante a ser destacado é que pouco se sabe sobre o real impacto desses compostos sobre o ambiente aquático e, principalmente, sobre a saúde humana. No caso do Brasil, a ausência de ETes em grande parte dos municípios brasileiros agrava ainda mais o quadro de possível contaminação das águas superficiais por PE.

Tendo em vista a escassez de dados sobre a prevalência de perturbadores endócrinos em águas brasileiras, o objetivo deste trabalho é apresentar resultados de um ano de monitoramento de estradiol, etinilestradiol e nonilfenol em três mananciais da Região Metropolitana de Belo Horizonte, MG.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de água bruta e parcialmente tratada foram coletadas nas seguintes estações de tratamento da região metropolitana de Belo Horizonte, MG: ETA Rio das Velhas, ETA Vargem das Flores e ETA Morro Redondo. As amostras de água bruta (do manancial) foram coletadas de fevereiro de 2007 a janeiro de 2008, e as amostras do efluente do filtro de areia foram coletadas de junho de 2007 a janeiro de 2008. As amostras foram preservadas *in loco* com metanol 0,5% e transportadas para laboratório onde ocorreu o preparo das amostras para extração dos perturbadores endócrinos (PE) presentes após a remoção dos sólidos presentes (filtração por membrana 0,45  $\mu$ m). A extração dos PE foi feita em cartuchos do tipo C-18, em pH = 3, e a eluição feita com acetato de etila, conforme detalhes apresentados em Wang *et al.* (2005). O procedimento de preparo da amostra permitiu concentrar os PE com um fator teórico de 1000 vezes, e é resumido na Figura 1. Os solventes metanol e acetato de etila foram de grau HPLC e CG respectivamente. Todos os padrões utilizados (estradiol, etinilestradiol e nonilfenol) são de pureza acima de 98% fornecidos pela Sigma-Aldrich. As análises foram realizadas em um equipamento de cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massas (LCMS-IT-TOF) da Shimadzu, de acordo com os procedimentos detalhados em Moreira (2008).

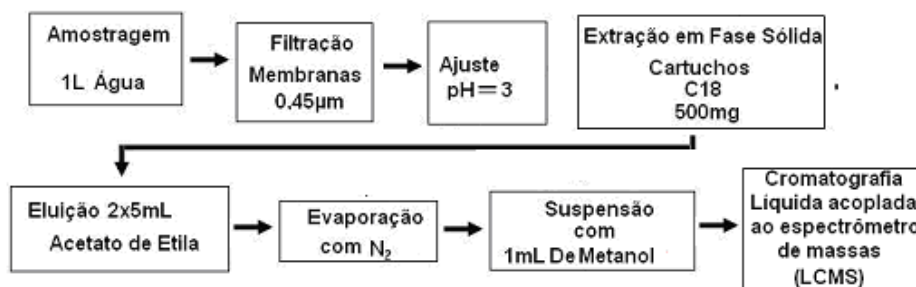
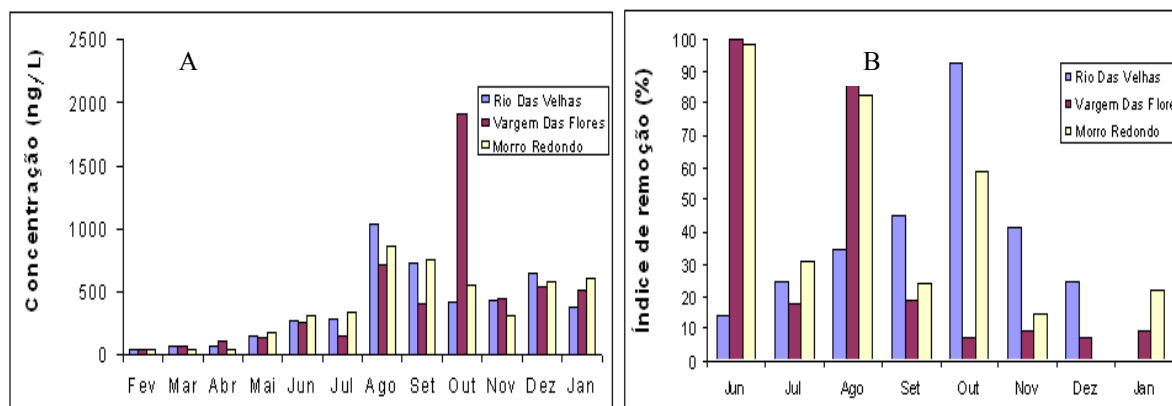


Figura 1: Diagrama geral para preparação das amostras para análise dos perturbadores endócrinos.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

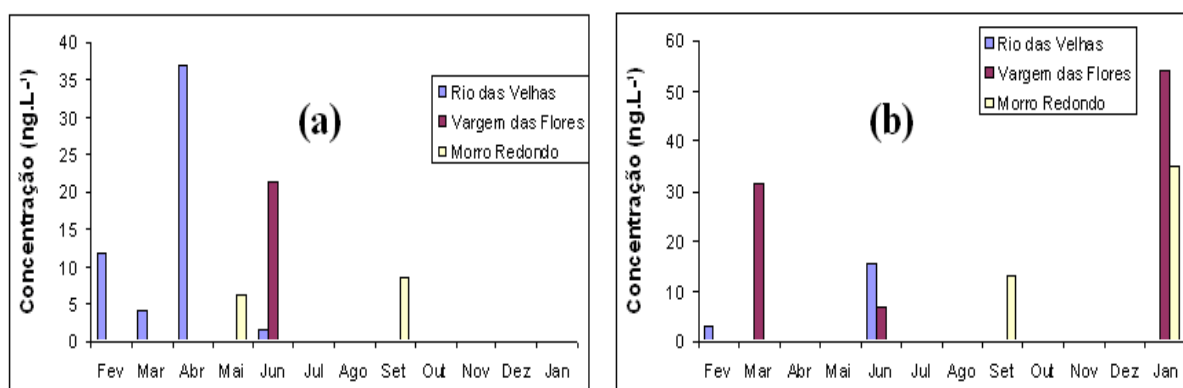
De acordo com a Figura 2A, as concentrações médias de 4-nonilfenol (4-NP) encontradas nos mananciais analisados (entrada das três ETAs), situaram-se na faixa de 44 a 1918 ng.L<sup>-1</sup>. Durante o período de monitoramento (fevereiro/2007 a janeiro/2008) notou-se que o 4-NP foi detectado em todos os pontos amostrais e em todas as campanhas, com exceção na amostra referente ao mês de junho 2007, na saída do filtro de areia da ETA Vargem das Flores. Em um levantamento da ocupação humana na bacia do Rio das Velhas, do sistema Morro Redondo e do reservatório de Vargem das Flores foram observados que em locais afastados das respectivas ETA's, ocorre a emissão de esgotos domésticos e efluentes industriais onde se destacam uma fábrica de reciclagem de plástico e indústrias de produtos de limpeza na bacia do Rio das Velhas.



**Figura 2: Variação da concentração de nonilfenol durante o período de monitoramento nos mananciais escolhidos (A) e índice de remoção de nonilfenol durante as campanhas de junho 2007 a janeiro 2008 (B).**

A Figura 2B mostra que a eficiência de remoção do 4-NP pelo tratamento (exceto etapa de desinfecção), foi altamente variável, não apresentando correlação aparente com as condições climáticas (período de seca versus período de chuva) ou com a concentração de 4-NP afluente. A eficiência média de remoção de 4-NP foi de ~ 35%, devendo-se destacar que a etapa de desinfecção (não avaliada) provavelmente contribuiu para a remoção adicional de 4-NP presente no efluente do filtro de areia.

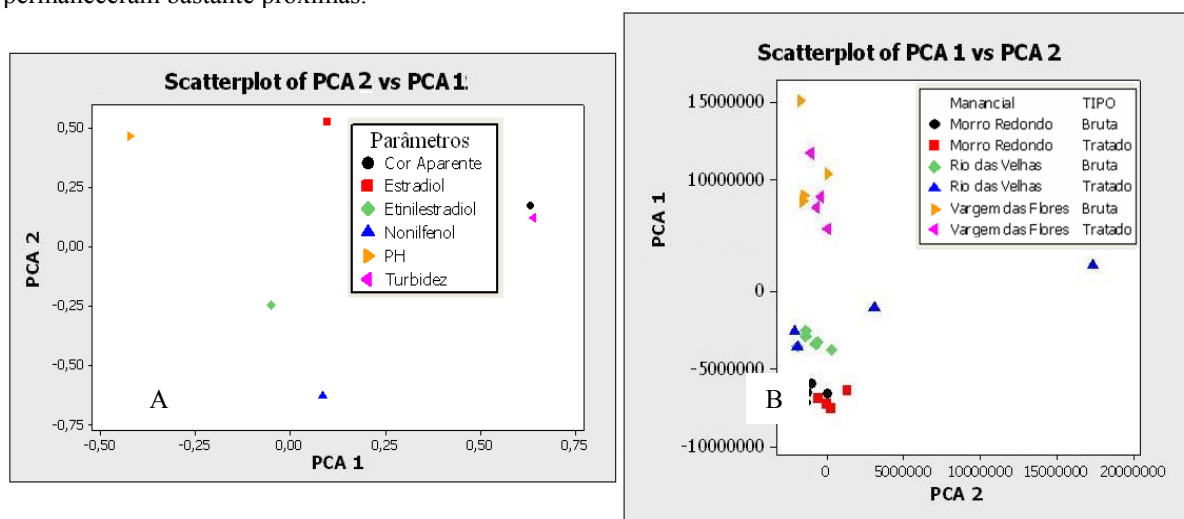
De acordo com a Figura 3 percebe-se que os estradióis foram detectados em poucas amostras e sempre em concentrações menores. O estradiol natural (E2) foi detectado principalmente no Rio das Velhas na faixa de concentração que variou de 1,5 a 36,8 ng/L, ao passo que o etinilestradiol (EE2) foi detectado principalmente em Vargem das Flores na concentração de 3 a 54 ng/L. Tais resultados estão de acordo com a literatura internacional que indica que os estradióis são de mais difícil detecção e estão presentes em menor concentração quando comparado com o 4-nonilfenol. Devido à escassez de dados de estradióis no afluente das três ETAs, a avaliação da eficiência de remoção ficou comprometida.



**Figura 3: Variação da concentração de estradiol (a) e etinilestradiol (b) durante o período de monitoramento nos mananciais escolhidos. Água Bruta.**

Uma análise estatística dos dados de espectrometria de massas, referentes às amostras de jun/07 a set/07, foi feita para avaliar o perfil químico das amostras analisadas. Os dados são apresentados na Figura 4 onde foi utilizado o método de Análise da Componente Principal (PCA). Com base na Figura 4, pode-se observar que as amostras brutas diferem entre si, pois são formados grupos diferentes em função do manancial. Isso ocorre possivelmente devido à presença de outros compostos orgânicos nos locais, uma vez que os dados compilados são feitos a partir do monitoramento dos íons presentes (provenientes de compostos orgânicos extraídos pelo cartucho C-18 e que tinham relação massa/carga na faixa de 120 a 350) nas amostras estudadas. Além disso, percebe-se que, para um mesmo manancial, as amostras de água bruta e tratada tem perfil químico semelhante (formam *clusters*) indicando que embora o tratamento adotado nas ETAs seja eficiente na remoção de cor e turbidez, é pouco eficiente na remoção dos microcontaminantes orgânicos extraídos pelo cartucho C-18 e detectado no espectrômetro de massas na faixa  $m/z$  de 120 a 350.

Análises físico-químicas de pH, turbidez e cor das amostras também foram avaliadas durante o período de monitoramento e os resultados obtidos utilizados para avaliar possível correlação com as concentrações de PE. A Figura 4 mostra que os parâmetros analisados são independentes entre si, com exceção da turbidez e cor aparente que, como era esperado, são fortemente correlacionados, pois suas coordenadas no gráfico permaneceram bastante próximas.



**Figura 4: Análise quimiométrica dos dados de espectrometria de massas obtidos com as amostras de água bruta e tratada coletadas de jun/07 a set/07.**

O documento preparado pelo Painel Internacional sobre Segurança Química, sob encomenda da Organização Mundial da Saúde (Damstra *et al.*, 2002) apresenta valores limites de PE para verificação de efeito adverso em ratos, e os valores de 0,08 a 8  $\text{mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para 4-NP; 0,003 a 4,12  $\text{mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para E2 e 0,002 a 200  $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para o EE2 são reportados como doses limites para tais PE. Considerando que tais faixas de valores toxicológicos contemplam os divergentes dados da literatura, pode-se estimar o valor de referência (VR) de 4-NP, E2 e EE2 na água para consumo humano utilizando os procedimentos descritos em OMS (2006). Para tanto será utilizado um fator de conversão de 100 (variação intra- e interespecíes), de forma que as doses críticas seriam de 0,8 a 80  $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para o 4-NP; de 0,03 a 41,2  $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para o E2; e de 0,02 a 2.000  $\text{ng.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$  para o EE2. Multiplicando-se os valores limites pelo peso corporal médio de um humano (70  $\text{kg.hab}^{-1}$ ), dividindo-se o valor encontrado pelo consumo médio *per capita* de água por ingestão (2  $\text{L.hab}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ), e assumindo que a ingestão de água contaminada representa 100% da quantidade total assimilada de tais contaminantes, encontra-se os valores de referência (VR) de 4-NP, E2 e EE2 em água para abastecimento. As faixas de VR para tais PE foram calculadas em 28 a 2.800  $\mu\text{g/L}$  para o 4-NP; em 1,05 a 1.442  $\mu\text{g/L}$  para o E2; e em 0,7 a 70.000  $\text{ng/L}$  para o EE2.

De acordo com os dados apresentados, os valores de 4-NP (0,044 a 1,9  $\mu\text{g/L}$ ) encontrados nas águas superficiais da RMBH encontram-se bem abaixo dos valores referência calculados, que seriam supostamente tóxicos para saúde humana. Para os estradióis, sabidamente mais estrogênicos que o nonilfenol, os valores encontrados nos mananciais (3 a 54  $\text{ng/L}$  para E2 e 1,5 a 36  $\text{ng/L}$  para EE2) caem dentro da faixa, próximos ao limite inferior, supostamente tóxica para a saúde humana. Contudo, é preciso salientar que tais compostos foram detectados em poucas amostras e que toda essa análise está sendo feita com os valores encontrados na



água bruta. É bem provável que o processo de cloração da água reduza a concentração dos PE eventualmente detectados na água bruta, muito embora pouco se saiba sobre a toxicidade dos congêneres clorados de tais contaminantes.

## CONCLUSÕES

O presente trabalho monitorou a concentração dos perturbadores endócrinos estradiol (E2), etinilestradiol (EE2) e nonilfenol (4-NP) em mananciais de abastecimento da região metropolitana de Belo Horizonte, MG. O 4-NP foi o composto que esteve presente em praticamente todas as amostras e em concentrações que variaram de 44 a 1918 ng.L<sup>-1</sup> ao passo que os estradióis natural (E2) e sintético (EE2) estiveram presentes em apenas 15% das amostras analisadas em concentrações bem menores, na faixa de 3 a 54 ng/L para E2 e 1,5 a 36 ng/L para EE2.

Em relação à remoção dos compostos durante o tratamento nas ETAs (exceto etapa de desinfecção), pode-se concluir que as etapas de pré-cloração, de coagulação, sedimentação e filtração em areia não removeram, em sua totalidade, os PE estudados, e que a remoção foi altamente variável e independente da concentração aflrente do PE e das condições ambientais prevalentes.

## AGRADECIMENTOS

FINEP-PROSAB (Edital 5); UFOP (Bolsa Mestrado); COPASA-MG.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALDA, M. J. L., e BARCELÓ, D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extraction–liquid chromatography–diode array detection. *Journal of Chromatography A*, v.911, p.203-210, 2001.
2. AUGER, J., KUNSTMANN, J. M., CZYGLIK, F., e JOUANNET, P. Decline in Semen Quality among Fertile Men in Paris during the Past 20 Years. *N. Engl. J. Med.*, v.332, n.5, p.281-285, 1995.
3. BILA, D. M., e DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*, v.30, n.3, p.651-666, 2007.
4. COLUCCI, M. S., BORK, H., e TOPP, E. Persistence of Estrogenic Hormones in Agricultural Soils: I. 17beta-Estradiol and Estrone. *Journal Environment Quality*, v.30, p.2070-2076, 2001.
5. DAMSTRA, T. et al. Global Assessment of the state-of-the-science of Endocrine Disruptors. International Programme on Chemical Safety. World Health Organization. WHO/PCS/EDC/02.2. 180 p.
6. GHISELLI, G., e JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. *Química Nova*, v.30, n.3, p.695-706, 2007.
7. GUILLETTE, L. J., PICKFORD, D. B., CRAIN, D. A., ROONEY, A. A., e PERCIVAL, H. F. Reduction in Penis Size and Plasma Testosterone Concentrations in Juvenile Alligators Living in a Contaminated Environment. *General and Comparative Endocrinology*, v.101, p.32-42, 1996.
8. LEGLER, J., DENNEKAMP, M., VETHAAK, A. D., BROUWERA, A., KOEMANA, J. H., VAN DER BURGB, B., e MURKA, A. J. Detection of estrogenic activity in sediment-associated compounds using in vitro reporter gene assays. *The Science of the Total Environment*, v.293, p.69-83, 2002.
9. MOREIRA, D. S. Desenvolvimento de Metodologia Analítica por Cromatografia/Espectrometria de massas para avaliação da ocorrência de Perturbadores Endócrinos em Mananciais de Abastecimento na Região Metropolitana de Belo Horizonte. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto – MG, 2008.
10. ROUTLEDGE, E. J., SHEAHAND, D., C. D., BRIGHTY, G. C., WALDOCK, M., e SUMPTER, J. P. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach. *Environmental Science & Technology*, v.32, p.1559-1565, 1998.
11. USEPA. Removal of Endocrine Disruptor Chemicals Using Drinking Water Treatment Processes. v.EPA/625/R-00/015, p.Washington DC, 2001.
12. WANG, Y., HU, W., CAO, Z., FU, X., e ZHU, T. Occurrence of endocrine-disrupting compounds in reclaimed water from Tianjin, China. *Anal Bioanal Chem*, v.383, p.857–863, 2005.