

IV-197 - AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE CONTAMINANTES EMERGENTES EM AMOSTRAS DE ESGOTO E ÁGUA

Amanda Gonçalves Kieling⁽¹⁾

Dr^a. em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Professora nos cursos de graduação de Engenharia Ambiental e Gestão Ambiental da UNISINOS.

Evelin Maira Goldmeyer⁽²⁾

Engenheira Ambiental pela Universidade do Vale do Rio dos Sinos.

Julia Flores da Silva Toller⁽³⁾

Engenheira Ambiental pela Universidade do Vale do Rio dos Sinos.

Gabriela Kern⁽⁴⁾

Graduanda do curso de Engenharia Química da Universidade do Vale do Rio dos Sinos

Endereço⁽¹⁾: Av. Unisinos, 950, Cristo Rei – São Leopoldo - RS - CEP: 93022-000 - Brasil - Tel: (51) 3591-1122- e-mail: amandag@unisinos.br

Endereço⁽²⁾: Av. Unisinos, 950, Cristo Rei – São Leopoldo - RS - CEP: 93022-000 - Brasil - Tel: (51) 3591-1122- e-mail: evelin.m.g@hotmail.com

Endereço⁽³⁾: Av. Unisinos, 950, Cristo Rei – São Leopoldo - RS - CEP: 93022-000 - Brasil - Tel: (51) 3591-1122- e-mail: juuhhtoller@hotmail.com

Endereço⁽⁴⁾: Av. Unisinos, 950, Cristo Rei – São Leopoldo - RS - CEP: 93022-000 - Brasil - Tel: (51) 3591-1122- e-mail: gabrielakern@unisinos.br

RESUMO

Os contaminantes emergentes são uma nova classe de contaminantes que são encontrados em águas de corpos hídricos receptores como rios e lagos, cujas concentrações são muito pequenas, na ordem de microgramas e nanogramas. O bisfenol-A, 17 β -estradiol e cafeína são alguns exemplos de contaminantes emergentes que estão presentes nos esgotamentos sanitários e que acabam se deslocando para os corpos hídricos receptores. Os tratamentos de águas e esgotos, muitas vezes, são ineficientes para a remoção parcial ou total desses contaminantes, fazendo com que fiquem presentes nas águas de abastecimento público. Os riscos associados a esses contaminantes ainda são, de maneira geral, desconhecidos. No entanto, em estudos realizados em animais, os mesmos apresentaram danos nos seus sistemas reprodutores, feminização dos machos, câncer, entre outros. Com isso o presente trabalho teve como objetivo avaliar a presença de contaminantes emergentes em amostras de águas do Rio dos Sinos no município de São Leopoldo e em amostras de esgoto de uma Estação de Tratamento de uma universidade também localizada no município. Os contaminantes analisados neste estudo foram o bisfenol-A, cafeína e 17 β -estradiol, sendo suas quantificações realizadas por meio da técnica de extração por fase sólida (SPE) e cromatógrafo líquido com espectrômetro de massas acoplado. Foi realizada uma campanha amostral em 2 pontos de coleta na estação de tratamento de esgotos da universidade, um ponto no corpo hídrico receptor do esgoto tratado e 2 pontos no Rio dos Sinos. Os resultados obtidos mostram a presença de bisfenol-A e 17 β -estradiol todos os pontos de coleta, a cafeína só não foi identificada em um ponto. O contaminante que apresentou maior concentração foi a cafeína, com 17,11 $\mu\text{g/L}$ na amostra de esgoto bruto. Este estudo proporcionou realizar a avaliação da presença dos contaminantes emergentes nas matrizes água e esgoto, indicando que mesmo após o tratamento de águas e esgotos, os contaminantes emergentes persistem.

PALAVRAS-CHAVE: Contaminantes Emergentes, recursos hídricos, esgoto.

INTRODUÇÃO

Os contaminantes emergentes podem ser definidos como substâncias que nos últimos anos vem gerando cada vez mais pesquisas e estudos. Nem sempre a definição de contaminante emergente está relacionado com uma substância recentemente produzida, mas que já estava presente no ambiente há algum tempo, porém sua presença foi identificada recentemente, cujos efeitos ainda são incertos. São contaminantes que estão divididos em algumas classes, como fármacos, produtos de higiene pessoal, pesticidas, plastificantes, entre outros, a fim

de definir um ramo de estudo. As principais classes investigadas são a dos fármacos, produtos de higiene pessoal, plastificantes e os agrotóxicos (SANTANA, 2013).

Considerada um contaminante emergente, a cafeína é um composto químico mundialmente consumido. É classificada como um alcaloide, quimicamente conhecida como 1,3,7 – trimetilxantina. Possui efeitos sobre a função mental e comportamental, produzindo excitação, euforia, redução da sensação de fadiga e aumento da sensibilidade motora (SILVA, 2016). As propriedades de elevada solubilidade em água, 20 g L⁻¹, pressão de vapor de 4,7x10⁻⁶ Pa e um coeficiente de partição octanol/água de 0,81, faz com que a cafeína ainda seja encontrada no efluente tratado, posteriormente descartado em corpos hídricos (CANELA et al., 2014).

O bisfenol é um nome genérico dado a um grupo de difenilalcanos frequentemente utilizado na produção de plásticos, sendo o bisfenol-A o principal representante deste grupo. Pelo fato deste composto ser muito empregado em processos industriais e por participar das formulações de produtos de uso doméstico, suas principais fontes no meio ambiente são os efluentes industriais, esgotos domésticos e lodos provenientes de ETEs (GHISELLI et al., 2007). É classificado como desregulador endócrino, podendo estar associado a alterações no organismo de seres humanos e animais aquáticos. O composto é utilizado para a síntese de plásticos de policarbonatos e resinas epóxi, como também para revestimentos de embalagens de alimentos e bebidas (MONTAGNER, 2010).

Dentre os hormônios sexuais, os estrógenos vêm recebendo grande atenção por serem muito ativos biologicamente e estarem relacionados a causa de vários tipos de cânceres. Os estrógenos naturais 17 β -estradiol, estriol, estrona e o sintético 17 α -etinilestradiol são os mais preocupantes, tanto pela potência quanto pela quantidade inserida continuamente no meio ambiente. Estes compostos são excretados pelo corpo humano através da urina e fezes, liberados no esgoto, chegam às ETEs e posteriormente são despejados em ambientes aquáticos. O déficit de infra-estrutura em saneamento e a ineficiência tecnológica e operacional das ETEs são os principais fatores que contribuem para contaminação hídrica. Apesar de possuírem meia vida relativamente curta quando comparados com outros compostos orgânicos, o fato dos estrógenos naturais serem constantemente lançados no ambiente, lhes concede um caráter de persistência (FILHO et al., 2006).

De acordo com Raimundo (2011), o sistema de tratamento de esgoto realizado no Brasil por utilizar o método convencional não faz a remoção de diversos contaminantes, dentre eles os contaminantes emergentes. Com isso, estes contaminantes entram em contato com os recursos hídricos, onde são captados e enviados para consumo humano sem nenhum método de tratamento aprimorado para sua remoção, pois não há nenhuma avaliação e quantificação destas substâncias nas águas de abastecimento.

OBJETIVOS

Avaliar e quantificar a presença dos contaminantes emergentes cafeína, bisfenol-A e 17 β -estradiol em amostras de esgoto (bruto e tratado) e em amostras de água superficial.

METODOLOGIA

A metodologia para análises dos contaminantes foi realizada por meio da coleta das amostras de esgoto bruto e esgoto após o tratamento em uma ETE de uma universidade localizada no município de São Leopoldo, água do corpo receptor onde o efluente tratado é lançado, água do Rio dos Sinos e água no ponto de captação do SEMAE também no município de São Leopoldo.

O tratamento utilizado nesta ETE é realizado através de gradeamento e desarenador (tratamento preliminar), reator anaeróbio tipo UABS e contator biológico rotatório (tratamento secundário), decantadores e ozonização (tratamento terciário). Após o tratamento, o efluente é despejado em arroio próximo, porém, é válido ressaltar que também há outras fontes que também despejam esgotos neste arroio.

Para verificar a presença e quantificar os contaminantes foi realizada a técnica de extração por fase sólida (SPE) e análise cromatográfica.

Extração por fase sólida (SPE)

A técnica de extração foi realizada conforme a tabela 1, onde utilizou-se cartuchos de extração Bond Elut Certify da marca Agilent que foram fixados em um sistema Manifold (Supelco), com capacidade para 12 cartuchos, acoplado a uma bomba de vácuo modelo TE-058 da marca Tecnal.

Tabela 1 - Metodologia de Extração por SPE

Etapa	Método
Cartucho	C8
1ª etapa (ativação do cartucho)	7 mL de Acetonitrila grau HPLC; 5 mL de Metanol Absoluto grau HPLC; 5 mL de Água Ultrapura
2ª etapa (amostra)	1.000 mL
3ª etapa (secagem do cartucho)	5 min – Vácuo
4ª etapa (clean-up)	5 mL de Água Ultrapura
5ª etapa (secagem)	5 min – Vácuo
6ª etapa (eluição do analito)	10 mL de Acetonitrila grau HPLC
7ª etapa (evaporação)	Concentração dos analitos
8ª etapa (ressuspensão dos analitos na amostra eluída)	1 mL de Metanol Absoluto grau HPLC

Fonte: Adaptado de Schmitt, 2018

Desde a ativação dos cartuchos (1ª etapa) até a passagem de 1 litro de amostra (2ª etapa), tomou-se cuidado para que o mesmo não secasse. Após a passagem da amostra pelo cartucho foi realizada a etapa de secagem, onde os cartuchos foram deixados 5 minutos na bomba de vácuo. Em seguida foi realizada a etapa de clean-up, onde foi percolado 10 mL de água ultrapura, esta etapa é de suma importância, pois remove os possíveis interferentes que possam ter ficado retidos nas paredes do cartucho. Quando a passagem da água ultrapura é finalizada, o cartucho passa pela etapa de secagem com bomba de vácuo novamente. Após a última secagem foi iniciado a eluição, onde foi percolado 10 mL de acetonitrila com um tubo de ensaio acoplado para realizar a coleta da amostra eluída. Nesta etapa, a acetonitrila realiza o desprendimento dos analitos de interesse da camada absorvente. Logo após a eluição dos analitos de interesse, ocorre a etapa de evaporação, onde o tubo de ensaio com a acetonitrila foi deixado em banho seco até sua completa evaporação. Com a amostra totalmente evaporada, ocorreu a ressuspensão com 1 mL de metanol absoluto em um vial (Agilent Technologies) e, as amostras foram analisadas em um cromatógrafo líquido com espectrômetro de massas acoplado.

Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massas (LC-MS)

A quantificação da cafeína, bisfenol-A e 17β-estradiol presente nas amostras foi realizada por meio da cromatografia líquida com espectrômetro de massas acoplado (LC-MS). Foi utilizado o equipamento Cromatógrafo Líquido (LC), marca Agilent Technologies, modelo 1260 com detector de espectro de massas (MS) single quadruplo, também da marca Agilent Technologies, modelo 6120. A coluna, fase estacionária, utilizada para a separação dos analitos foi a Zorbax XDB-C18 (2,1 x 150 mm x 5 µm). Para a fase móvel, foi utilizado uma solução de formiato de amônio 5 mmol da marca VETEC, ácido acético glacial 0,1 % da marca Synth, sendo que ambos possuem grau analítico e acetonitrila grau HPLC.

A partir do modo SCAN foi possível identificar os analitos e os seus tempos de retenção, para tornar esse método mais seletivo, foi realizada a corrida no modo SIM (Single Ion Monitoring), onde somente os íons dos analitos de interesse seriam identificados e quantificados.

O detector do espectrômetro de massas possui uma fonte de ionização eletro Spray (Electro Spray Ionization – ESI), na qual opera nos modos positivo (ESI+) e negativo (ESI -). O presente trabalho utilizou o modo positivo (ESI +) para a identificação da cafeína e 17β-estradiol e para a identificação do bisfenol – A foi utilizado o modo negativo (ESI -), perdendo um elétron. As amostras foram injetadas no cromatógrafo líquido por meio do amostrador automático.

A Figura 1 apresenta o cromatograma referente aos contaminantes emergentes monitorados. O cromatograma foi obtido através da injeção de padrões internos de diferentes concentrações para verificar o respectivo tempo de retenção de cada composto.

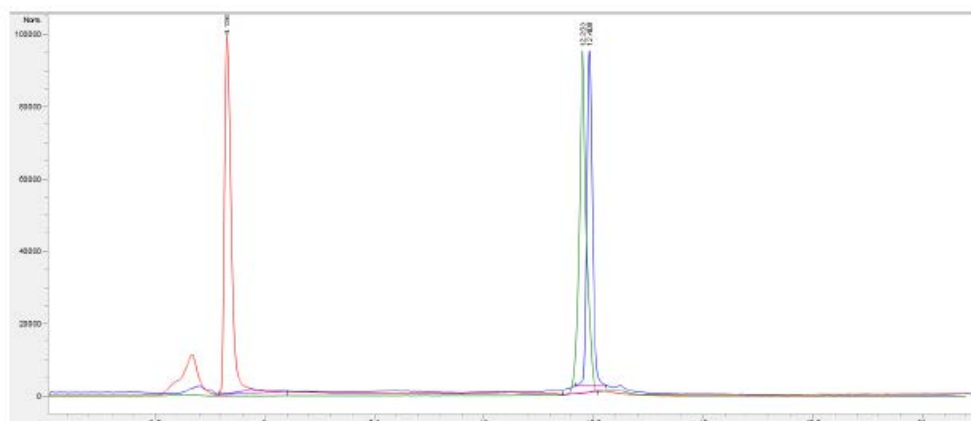


Figura 1: Cromatograma Cafeína, Bisfenol-A e 17 β -estradiol

O pico cromatográfico em vermelho representa a cafeína com tempo de retenção de 4,136 minutos, o pico em azul representa o 17 β -estradiol e seu tempo de retenção de 12,408 minutos e o pico em verde representa o bisfenol-A com tempo de retenção de 12,253 minutos

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Presença da Cafeína

Na tabela 2 são apresentados os resultados obtidos após a cromatografia líquida. Esses valores são expressos conforme a média aritmética das duas injeções aplicadas no cromatógrafo.

Tabela 2 - Concentração de cafeína

Amostras	Esgoto bruto	Esgoto tratado	Água do corpo receptor	Água do Rio dos Sinos	Água do ponto de captação do SEMAE
Concentração final ($\mu\text{g/L}$)	17,1144	1,2423	0,2745	0,093	Não detectado

Fonte: elaborado pelas autoras

As altas concentrações de cafeína no esgoto bruto, 17,1144 $\mu\text{g/L}$, já eram esperadas, uma vez que a cafeína é amplamente consumida pelos estudantes e demais pessoas que circulam pela universidade diariamente. Dentre o consumo da cafeína na universidade pode-se citar cafés, chás, refrigerantes e medicamentos.

Comparando com estudo realizado por Souza (2011), as concentrações de cafeína em esgoto bruto das ETEs avaliadas variaram de 7,26 a 65,08 $\mu\text{g/L}$ e no esgoto tratado 2,72 a 12,97 $\mu\text{g/L}$, o que indica que os resultados obtidos neste trabalho, tanto as concentrações de esgoto bruto quanto esgoto tratado encontram-se semelhantes ao resultado obtidos de Souza.

Os valores obtidos nas águas do Rio dos Sinos no município de São Leopoldo, com exceção do ponto de captação do SEMAE, encontram-se acima dos resultados obtidos por Weigel et al., (2002), onde esses autores avaliaram e quantificaram a cafeína na Alemanha, o resultado obtido por eles foi de 16,1 ng/L . Outro estudo realizado por Guiselli e Jardim (2006) realizado em diversos corpos hídricos em Campinas/SP encontrou a presença de cafeína em quantidades de 1,1 a 106 $\mu\text{g/L}$. Comparando esses resultados pode-se perceber uma variação conforme os pontos de amostragem.

Também é possível perceber que a concentração de cafeína na água do corpo receptor do efluente tratado pela ETE é superior a concentração encontrada na água do Rio dos Sinos. Este fato por ser explicado por causa do lançamento de esgoto tratado pela universidade, visto que este tratamento não remove todo composto, bem como o esgoto oriundo do bairro localizado ao lado da universidade, o qual é despejado diretamente neste arroio. Além disso, várias referências trazem que as concentrações de cafeína em águas superficiais podem variar dependendo da época do ano, nível e vazão do corpo hídrico.

O tratamento realizado na ETE mostrou uma eficiência de remoção de aproximadamente 93% da cafeína. Em um estudo realizado por IDE, por mais que suas ETEs atendam populações e vazões superiores a ETE do presente estudo, chegou-se a eficiência de remoção de 87% e 95%, respectivamente, valor semelhante a eficiência de remoção da cafeína do presente estudo.

Presença do Bisfenol-A

Na tabela 3 são apresentados os resultados obtidos após a cromatografia líquida. Na tabela abaixo encontram-se os valores de concentrações de acordo com as médias aritméticas das injeções.

Tabela 3 - Concentração de bisfenol-a

Amostras	Esgoto bruto	Esgoto tratado	Água do corpo receptor	Água do Rio dos Sinos	Água do ponto de captação do SEMAE
Concentração final (µg/L)	2,4658	0,0524	0,1704	0,055	0,428

Fonte: elaborado pelas autoras

Sodré et al., (2007) em seu estudo realizado em um rio em Campinas/SP obteve uma concentração de bisfenol-a de 1,76 µg/L, valor que se encontra superior aos obtidos nesse trabalho quando comparado aos resultados obtidos na mesma matriz aquosa. Devido a região de Campinas ser mais populosa que a região do município de São Leopoldo já se era esperado um valor superior. Segundo Vrooman et al. (2015), o BPA e outros produtos químicos, considerados desreguladores endócrinos, estão induzindo efeitos negativos em uma ampla gama de processos fisiológicos, incluindo a reprodução. O estudo deste autor foi realizado utilizando ratos durante o desenvolvimento neonatal, onde foram expostos ao BPA de 1 a 12 dias após o nascimento. Os resultados mostraram que estes ratos sofreram alteração permanente na espermatogênese.

De acordo com os resultados obtidos, percebe-se que elevada eficiência de remoção do bisfenol-a na ETE. Porém, embora o trabalho apresente esta eficiência, percebe-se que já há grandes concentrações deste composto em corpos hídricos, a água do corpo receptor, Rio dos Sinos e ponto de captação do SEMAE apresentaram, respectivamente, concentrações de 0,1704, 0,055 e 0,428 µg/L.

Presença do 17β-estradiol

Na tabela 4 são apresentados os resultados obtidos após a cromatografia líquida.

Tabela 4 - Concentração de 17β-estradiol

Amostras	Esgoto bruto	Esgoto tratado	Água do corpo receptor	Água do Rio dos Sinos	Água do ponto de captação do SEMAE
Concentração final (µg/L)	0,3858	0,3639	0,4642	0,610	1,013

Fonte: elaborado pelas autoras

No estudo realizado por Sodré et al., (2007) em Capinas/SP foi constatado somente no mês de agosto as concentrações de 0,038, 0,051 e 2,51 µg/L de 17β-estradiol, nos meses de março e junho não foi detectado nenhuma concentração. Belfroid et al., (1999) obtiveram concentrações de 17β-estradiol de 0,0055 µg/L, em águas superficiais de Amsterdã, na Holanda.

Algumas concentrações para este composto já encontradas em esgotos bruto foram no trabalho de Sodré et al. (2010), o qual encontrou 0,0056 µg/L, Muller et al. (2008) encontrou concentrações que variaram de 0,013 a 0,028 µg/L, Ghiselli (2006) obteve a concentração de 6,7 µg/L e Souza (2011) encontrou 7,4 µg/L. No estudo realizado por Ternes et al., (1997) em amostras de esgoto bruto na ETE de Penha/RJ foi detectado a concentração de 0,021 µg/L. Isso nos mostra a variedade de concentrações que se pode ser obtida dependendo do local de estudo.

Segundo Rogers (1996), a tendência de um composto para acumular nos sólidos de lodo de esgoto pode ser avaliada usando as seguintes relações: $\log K_{ow} < 2,5$: baixo potencial de sorção; $\log K_{ow} < 2,5$ e $< 4,0$: médio potencial de sorção e $\log K_{ow} > 4,0$: alto potencial de sorção. Como os valores de K_{ow} para o 17β-estradiol variam de 3,9 a 4,1, pode-se sugerir que parte da remoção deste composto presente no efluente deve-se a uma provável sorção ao lodo.

Também se encontrou esse composto no corpo receptor, com uma concentração de 0,4642 µg/L. Machado (2010) relatou que a detecção de hormônios em águas superficiais é um grande indício de contaminação por aporte de esgoto. Em seu estudo, o hormônio 17β-estradiol foi o que apresentou maior concentração e frequência nas amostras coletadas do Rio Iguaçu, Curitiba, Paraná, variando de <0,10 a 13,45 µg/L.

CONCLUSÃO

A partir da área de estudo abordada e dos pontos de coleta definidos, foi possível avaliar a presença dos contaminantes emergentes em amostras de esgoto bruto e tratado e, em águas do corpo hídrico receptor e do Rio dos Sinos.

Nas amostras de esgoto, corpo hídrico receptor e do Rio dos Sinos, foi possível avaliar a presença dos contaminantes emergentes abordados, segundo a metodologia adotada. Cada ponto de coleta apresentou concentrações expressivas.

Foi possível perceber a contaminação tanto do esgoto bruto e tratado quanto das águas de uso para abastecimento público por bisfenol-A, cafeína e 17β-estradiol. A presença desses contaminantes nas águas indicam que os tratamentos realizados não são eficientes para remoção de tais contaminantes. Com isso, esses contaminantes estão sendo distribuídos pelas redes de abastecimento de água sem nenhum método visando a sua remoção.

A identificação destes contaminantes nas matrizes aquáticas é considerada preocupante, pois mesmo com um sistema de tratamento de água não foi possível remover por completo esses contaminantes. Pouco se sabe sobre os efeitos adversos a longo prazo ao meio ambiente e aos seres humanos, devido a isso se dá a importância da realização de mais estudos visando a verificação e quantificação dos contaminantes emergentes e suas possíveis formas de remoção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BELFROID, A. C., et al., 1999, Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. **Sci. Total Environ.**, 225: 101- 108
2. CANELA, M. C. et al. **Cafeína em águas de abastecimento público no Brasil** – Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas – INCTAA. São Carlos: Editora Cubo, 2014.
3. FILHO, R. W. R.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E. M. **Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos**. Química Nova, v. 29, n. 4, p. 817-822, 2006.
4. GHISELLI, Gislaine; JARDIM, Wilson F. **Interferentes endócrinos no ambiente**. São Paulo. Química Nova, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.
5. GHISELLI, Gislaine; JARDIM, Wilson F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 695-706, June 2007. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000300032&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 31 Out. 2018.

6. MONTAGNER, Émerson. **Determinação de bisfenol A em água: uma investigação na cidade de Campo Grande – MS.** Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química - Universidade Estadual Paulista, 2010.
7. RAIMUNDO, C. C. M. **Contaminantes emergentes em água tratada e seus mananciais: sazonalidade, remoção e atividade estrogênica.** Tese (Doutorado em Química Analítica). Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas, 2011. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/bitstream/reposip/249643/1/raimundo_cassianacarolinamontagner_d.pdf>. Acesso em: 18 mai. 2018.
8. SANTANA, J. S. **Determinação de contaminantes emergentes em mananciais de água bruta e na água para consumo humano do Distrito Federal.** 2013.101f. Dissertação de metrado - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2013. Disponível em: <http://www.repositorio.unb.br/bitstream/10482/13822/1/2013_JoyceSilvaSantana.pdf>. Acesso em 23 março 2018.
9. SCHMITT, G. T. **Avaliação da remoção de 17 β -estradiol em água por adsorção, biodegradação e biofiltração.** 2018. 105 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Ambiental) – Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS, São Leopoldo, 2018.
10. SILVA, R. F.; SILVA, G. L.; Silva, P. T. S.; Silva, V. L. **Identificação e Quantificação de Contaminantes Emergentes em Estações de Tratamento de Esgoto.** Revista Viltual de Química, v. 8, n. 3, p. 702-715, 2016.
11. SODRÉ, F. F. et al. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Campinas, São Paulo, v. 2, p. 187-196 maio, 2007.
12. TERNES, T. A; et al., Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants — I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 81-90, jan. 1999.
13. WEIGEL, S; KUHLMANN, J; HÜHNERFUSS, H. Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea. **The Science of the Total Environment**, Hamburg, Germany, v. 295, p. 131-141, fev. 2002.